

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ХІМІЇ**

**ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО
ВИЗНАЧЕННЯ ДІЮЧИХ РЕЧОВИН В
КОМБІНОВАНИХ ТАБЛЕТКАХ L-
АРГІНІНУ З ТІОТРИАЗОЛІНОМ**

Доповідач:

Запорізький науково-дослідний експертно-криміналістичний центр,
старший судовий експерт сектору фізико-хімічних досліджень,
кандидат біологічних наук

Павлюк Іван

АКТУАЛЬНІСТЬ

Захворювання серцево-судинної системи займають друге місце в структурі інвалідизації та смертності населення багатьох розвинених країн. Незважаючи на досягнуті успіхи в області медикаментозної кардіопротекції, смертність від захворювань серця залишається високою. Тому розробка засобів лікування цих патологій серцево-судинної системи є актуальним завданням сучасної медицини. Для нового комбінованого лікарського препарату "Аргітрил" (L-аргінін та тіотриазолін у співвідношенні 4:1) була обрана раціональна лікарська форма – таблетки. Попередньо нами була розроблена методика стандартизації діючих речовин L-аргініну з тіотриазоліном в модельній суміші, таблетковій масі та таблетках. Тому актуальним і своєчасним завданням стала валідація цієї методики. Згідно вимог діючого законодавства всі методики стандартизації повинні бути валідовані. Валідація є гарантом достовірності та точності будь-яких методик. Її присутність гарантує аналітичним методикам гідне місце в системі забезпечення якості, а також відповідність своєму призначенню. Згідно вимог ДФУ валідацію методик проводять за такими показниками: специфічність, лінійність, діапазон застосування, точність, правильність та робастність.

МЕТА

**Метою нашої
роботи є валідація
розробленої
методики
кількісного
визначення
таблеток L-аргініну
з тіотриазоліном.**



МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

При проведенні досліджень використовували сертифіковані субстанції L-аргініну (виробник: «Sigma-Aldrich», США) та тіотриазоліну (виробник: Державне підприємство «Завод хімічних реактивів» Науково-технологічного комплексу «Інститут монокристалів» НАН України). Дослідження проводили з використанням хроматографу моделі LC-20 Prominence Shimadzu в наступній комплектації: два насоси LC-20AD, автосамплер SIL-20A, детектор SPD-20AV, термостат CTO-20A, системний контролер CBM-20 ALITE; колонки Hypersil ODS-C18-5 μ , 4,6 x 250 мм, діаметр часток 5 мкм; елюєнт: водний розчин 3,4 г/л Cu_4NHSO_4 та 0,05% трифтороцтової кислоти; швидкість рухомої фази: 1 мл/хв; аналітична довжина хвилі детектора: 220 нм; об'єм проби: 20 мкл.

Готували досліджуваний розчин та розчин порівняння L-аргініну та тіотриазоліну проводили відповідно до методики: в 10 мірних колб місткістю 25.0 мл поміщають вказані в табл. кількості L-аргініну та тіотриазоліну, в кожену колбу додають по 15 мл води очищеної, перемішують протягом 20 хв, доводять об'єм сумішей тим же розчинником до мітки та перемішують ще 5 хв. 5.0 мл отриманого розчину переносять в мірну колбу на 50.0 мл і доводять водою до мітки.

Модельні суміші

№ модельного зразку	L-аргінін		Тіотриазолін	
	Маса наважки (мг)	Вміст, в % від номінального значення	Маса наважки (мг)	Вміст, в % від номінального значення
1	2	3	4	5
1	160,00	80	40,00	80
2	170,00	85	42,50	85
3	180,00	90	45,00	90
4	190,00	95	47,50	95
5	200,00	100	50,00	100
6	210,00	105	52,50	105
7	220,00	110	55,00	110
8	230,00	115	57,50	115
9	240,00	120	60,00	120

Крім того, була розроблена методика валідаційних досліджень таблеток L-аргініну з тіотриазоліном: 250 мг суміші L-аргініну та тіотриазоліну в співвідношенні 4:1 розчиняють в 10 мл води в мірній колбі на 25,0 мл і доводять водою до мітки. 5,0 мл отриманого розчину переносять в мірну колбу на 50,0 мл і доводять водою до мітки.

1. 8 мл робочого розчину переносять в мірну колбу на 100,0 мл і доводять водою до мітки. (80%).
2. 8,5 мл робочого розчину переносять в мірну колбу на 100,0 мл і доводять водою до мітки. (85%).
3. 9 мл робочого розчину переносять в мірну колбу на 100,0 мл і доводять водою до мітки. (90%).
4. 9,5 мл робочого розчину переносять в мірну колбу на 100,0 мл і доводять водою до мітки. (95%).
5. 10 мл робочого розчину переносять в мірну колбу на 100,0 мл і доводять водою до мітки. (100%).
6. 10,5 мл робочого розчину переносять в мірну колбу на 100,0 мл і доводять водою до мітки. (105%).
7. 11 мл робочого розчину переносять в мірну колбу на 100,0 мл і доводять водою до мітки. (110%).
8. 11,5 мл робочого розчину переносять в мірну колбу на 100,0 мл і доводять водою до мітки. (115%).
9. 12 мл робочого розчину переносять в мірну колбу на 100,0 мл і доводять водою до мітки. (120%).

Специфічність методики визначення ідентифікації та кількісного визначення L-аргініну та тіотриазоліну продемонстрована на рис.

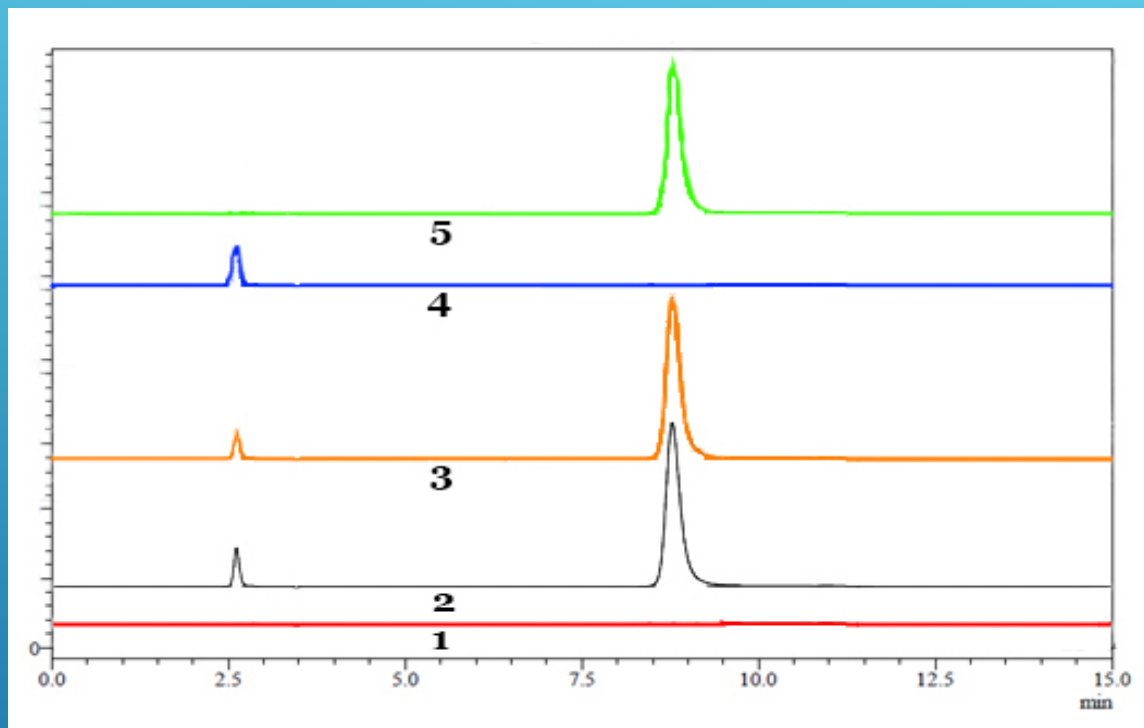
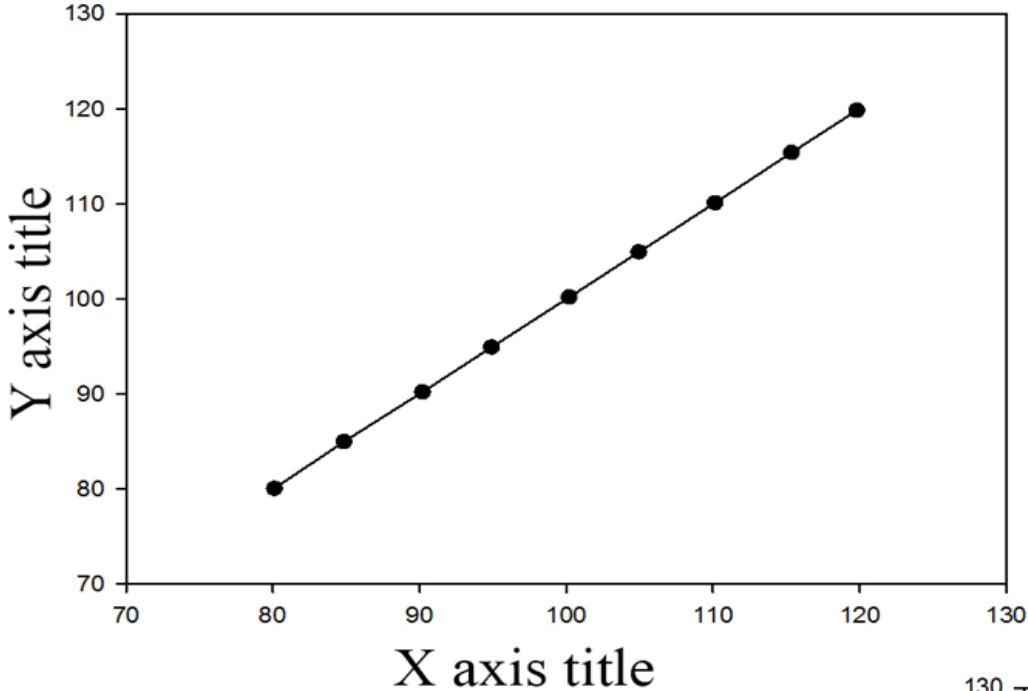
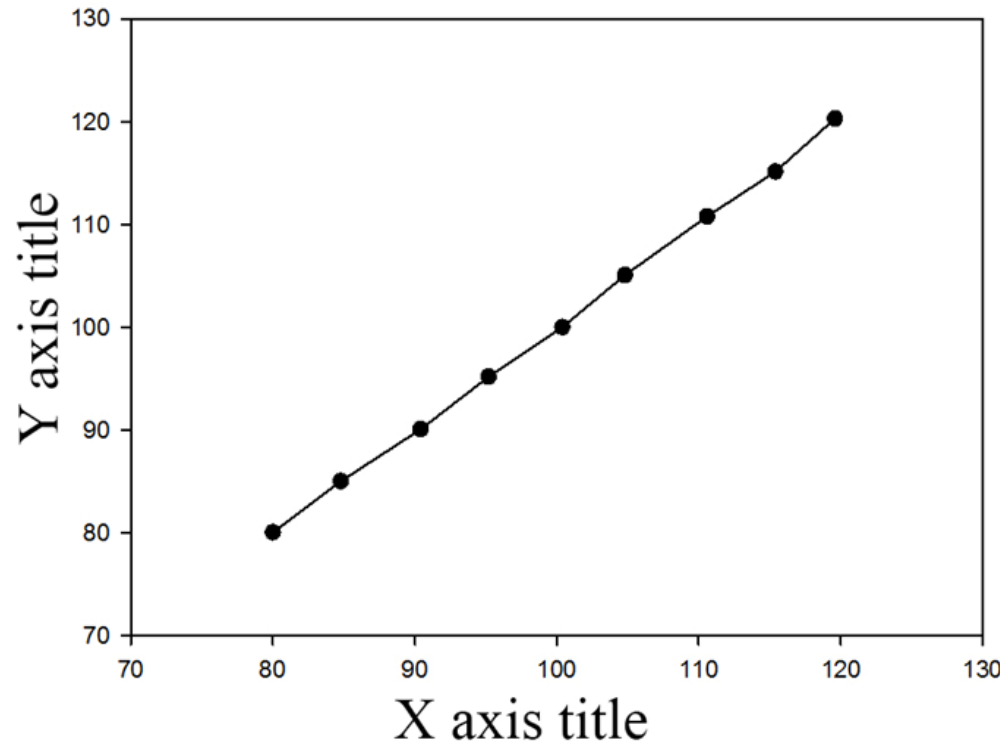


Рис. 1 Хроматограми розчинів: 1 - розчин «плацебо» препарату, 2 - випробуваний розчин препарату, 3 - розчин порівняння L-аргініну та тіотриазоліну, 4 – модельний розчин препарату з тіотриазоліном, 5 – модельний розчин препарату з L-аргініном



**Рис. Лінійна залежність
знайденої концентрації L-аргініну від
його введеної концентрації в
нормалізованих координатах**

**Рис. Лінійна залежність
знайденої концентрації
тіотриазоліну від його введеної
концентрації в нормалізованих
координатах**



Метрологічні характеристики лінійної залежності знайденої концентрації L-аргініну від його введеної концентрації

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
b	1,0003			
S _b	0,0014			
a	0,0009	≤ 0,24	≤ 2,6	Витримується за 1 критерієм
S _a	0,1427			
SD ₀	0,0548			
SD ₀ /b	0,05478	≤ 0,84		Виконуються
r	1,0000	> 0,99810		Виконуються

Метрологічні характеристики лінійної залежності знайденої концентрації тіотриазоліну від його введеної концентрації

Параметри	Значення	Вимоги 1	Вимоги 2	Висновок
b	1,0083			
S _b	0,0090			
a	- 0,7509	≤ 0,66	≤ 2,6	Витримується за 1 критерієм
S _a	0,9074			
SD ₀	0,3484			
SD ₀ /b	0,346	≤ 0,84		Виконуються
r	0,99997	> 0,99810		Виконуються

Результати аналізу модельних розчинів, які містять від 80 % до 120 % L-аргініну по відношенню до номінальної концентрації, і їх статистичної обробки

№ розчину	Наважка L-аргініну, г ($m_{st} = 0,2000$)	Введено в % від номінальної концентрації (X_i , факт., %)	Середня площа піку ($A_i^{st} = 297329$)	Знайдено в % від номінальної концентрації (Y_i , %)	Знайдено в % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$
1	2	3	4	5	6
1	0,1602	80,1	238101	80,06	99,95
2	0,1697	84,85	252707	84,99	100,16
3	0,1804	90,2	309397	90,22	100,02
4	0,1898	94,9	282514	94,94	100,04
5	0,2004	100,2	297983	100,22	100,02
6	0,2099	104,95	312113	104,97	100,02
7	0,2203	110,15	327493	110,14	99,99
8	0,2307	115,35	397747	115,42	100,06
9	0,2396	119,8	356557	119,86	100,05
Середнє, Z_{cp} , % =					100,03
Відносне стандартне відхилення, RSD_z , % =					0,06
Відносний довірчий інтервал					0,11
Δz % = $t(95\%, 9 - 1) \times RSD_z = 1.86 \times 0.06 =$					
Критичне значення для збіжності результатів ΔA_s , % =					1,6
Систематична помилка δ % = $ Z_{cp} - 100 =$					0,03
Критерій незначущості систематичної похибки:					
1) статистична незначущість: $\delta < \Delta z : \sqrt{9} = 0.11/3 = 0.04\% > 0.03\%$					Виконується
Якщо не виконується 1), то $\delta \leq \max \delta$:					
2) практична незначущість: $\delta\% \leq 0.32 \times 1.6 = 0.51\% > 0.03\%$					Виконується
Загальний висновок про методикау					КОРЕКТНА

Результати аналізу модельних розчинів які містять від 80 % до 120 % тіотриазоліну по відношенню до номінальної концентрації, та їх статистична обробка

№ розчину	Наважка тіотриазоліну, г ($m_{st} = 0,0500$)	Введено в % від номінальної концентрації (X_i , факт., %)	Середня площа піку ($A_i^{st} = 3437747$)	Знайдено в % від номінальної концентрації (Y_i , %)	Знайдено в % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$
1	0,04	80	2752260	80,06	100,08
2	0,0424	84,8	2923804	85,05	100,29
3	0,0452	90,4	3097410	90,1	99,67
4	0,0476	95,2	3273079	95,21	100,01
5	0,0502	100,4	3439466	100,05	99,65
6	0,0524	104,8	3612728	105,09	100,28
7	0,0553	110,6	3809711	110,82	100,20
8	0,0577	115,4	3959597	115,18	99,81
9	0,0598	119,6	4136985	120,34	100,62
Середнє, Z_{cp} , % =					100,07
Відносне стандартне відхилення, RSD_z , % =					0,32
Відносний довірчий інтервал					0,60
$\Delta z \% = t(95\%, 9 - 2) \times RSD_z = 1,89 \times 0,32 =$					
Критичне значення для збіжності результатів ΔA_s , % =					1,6
Систематична помилка $\delta \% = Z_{cp} - 100 =$					0,07
Критерій незначущості систематичної помилки:					
1) статистична незначущість: $\delta < \Delta z : \sqrt{9} = 0,60 : 3 = 0,2 \% > 0,07\%$					Виконується
Якщо не виконується 1), то $\delta \leq \max \delta$:					
2) практична незначущість: $\delta\% \leq 0,32 \times 1,6 = 0,51 \% > 0,07\%$					Виконується
Загальний висновок про методику					КОРЕКТНА

ВИСНОВКИ

Підводячи ризику під усім вище зазначеним можна сказати, що методика характеризується достатньою збіжністю, так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини ΔZ для L-аргініну та тіотриазоліну не перевищує критичне значення для збіжності результатів (1,6 %). Також методика характеризується достатньою правильністю, так як виконується критерій незначущості систематичної похибки методики. Систематична похибка методики задовольняє вимоги статистичної та практичної незначущості. Високе значення коефіцієнта кореляції $r = 1,0000$ та $0,99994$ задовольняє вимоги критерію прийнятності ($r = 0,9998$) та підтверджує лінійність залежності між взятою та знайденою кількістю L-аргініну та тіотриазоліну в області від 80 % до 120 % відповідно до його номінального вмісту в препараті. Виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності (a , $SD0/b$, r) методики визначення L-аргініну та тіотриазоліну у всьому діапазоні концентрації від 80 % до 120 % від номінального значення.

ДЯКУЮ ЗА УВАГУ!

