



УДК: 615.074:547.575

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИСЛОТЫ САЛИЦИЛОВОЙ В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

О.А. ЕВТИФЕЕВА¹
Н. И. ПРОСКУРИНА¹
М. А. ХМЕЛЕВА²
И.Ю. ПЕТУХОВА¹

¹Национальный фармацевтический университет,
Харьков, Украина

²Донецкий национальный медицинский университет
им. М.Горького,
Донецк, Украина

e-mail: anchem@ukrfa.kharkov.ua

Для методики количественного определения кислоты салициловой в лекарственной форме салицилово-резорцинового спиртового раствора проведена валидация согласно требованиям Государственной фармакопеи Украины. Осуществлен прогноз полной неопределенности результатов анализа спектрофотометрического определения. Для методики исследованы валидационные параметры стабильности, робастности, линейности, правильности, сходимости, воспроизводимости. Доказано, что методика может быть корректно воспроизведена и пригодна для дальнейшего использования.

Ключевые слова: валидация методик количественного определения, салициловая кислота, спектрофотометрия.

Введение. Гарантией эффективности и безопасности лекарственных средств (ЛС) является создание национальных стандартов их качества. Для установления соответствия качества ЛС регламентируемым требованиям необходимо применение различных аналитических методов. Вывод о качестве ЛС в значительной степени зависит от качества самого метода. Поэтому необходимо оценивать пригодность аналитических методов для предполагаемого их применения [1, 2, 3].

Ранее нами были изучены условия протекания реакции образования комплексного соединения при взаимодействии кислоты салициловой и алюминия хлорида. Установлены соотношения кислоты салициловой и алюминия хлорида, при которых комплекс становится стабильным и характеризуется постоянным максимумом поглощения при длине волны 314 нм. На основе реакции для быстрого, простого и точного количественного определения кислоты салициловой в лекарственной форме салицилово-резорцинового спиртового раствора была разработана методика, которая базируется на методе спектрофотометрии [4]. Согласно требованиям Государственной фармакопеи Украины (ГФУ) методики должны быть валидированы [3].

Целью работы является проведение валидации методики количественного определения кислоты салициловой методом спектрофотометрии в лекарственной форме 4% салицилово-резорцинового спиртового раствора.

Материалы и методы. Для проведения исследований использовали субстанции производства China Jiangsu Medicines & Health Products Import & Export (Group) Corporation кислоты салициловой (серия № 1004020) и резорцина (серия № HF20100701), которые отвечают требованиям ГФУ [3].

Для работы применяли мерную посуду класса А, реактивы, которые отвечают требованиям ГФУ, аналитические весы AB 204 S / A METTLER TOLEDO, спектрофотометр «SPECORD 200».

Для эксперимента объектом исследования была выбрана экстенпоральная лекарственная форма – 4% салицилово-резорциновый спиртовой раствор, которая была изготовлена, учитывая правила аптечной технологии по прописи:

Кислоты салициловой 4,0 г

Резорцина 4,0 г

Спирта 70% до 100 мл.

Методика количественного определения кислоты салициловой: 1,00 мл 4% салицилово-резорцинового спиртового раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100,00 мл и доводят объем раствора спиртом 70% до 100,00 мл. 5,00 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100,00 мл, добавляют 1,00 мл 1,00% раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора спиртом 70% до 100,00 мл. Раствор сравнения – спирт 70%. Оптическую плотность полученного раствора измеряют в максимуме поглощения при длине волны 314 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Стандартный раствор: 0,2 г (точная навеска) кислоты салициловой помещают в мерную колбу вместимостью 100,00 мл и доводят объем раствора спиртом 70% до 100,00 мл. 1,00 мл полу-



ченного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100,00 мл, добавляют 1,00 мл 1,00% раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора спиртом 70% до 100,00 мл.

Содержание кислоты салициловой в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_i \times C_{st} \times 100 \times 100 \times 100}{A_{st} \times 1 \times 5},$$

где A_i – оптическая плотность аналитического раствора препарата;

A_{st} – оптическая плотность стандартного раствора;

C_{st} – концентрация стандартного раствора (в г/мл).

Приготовление модельных рабочих растворов: готовили пять модельных растворов согласно диапазону применения методики [5] в концентрациях: 80,00%, 90,00%, 100,00%, 110,00%, 120,00% от номинальной. Точные навески резорцина и кислоты салициловой (m, г) помещали в мерную колбу вместимостью 100,00 мл и довели спиртом 70% до 100,00 мл.

Приготовление раствора плацебо: 0,2 г (точная навеска) резорцина помещают в мерную колбу вместимостью 100,00 мл и доводят объем раствора спиртом 70% до 100,00 мл, 1,00 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100,00 мл, добавляют 1,00 мл 1,00% раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора спиртом 70% до 100,00 мл.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили согласно статье ГФУ «Статистический анализ результатов химического эксперимента»^N[3].

Результаты и их обсуждение. Согласно содержанию кислоты салициловой в лекарственной форме, учитывая требования нормативной документации [5, 6], был выбран диапазон применения методики от 80,00% до 120,00%. Рассчитаны критерии приемлемости метрологических характеристик для методики анализа, которые приведены в табл. 1 [7, 8].

Таблица 1

Критерии приемлемости метрологических характеристик методики количественного определения кислоты салициловой

Критерии приемлемости метрологических характеристик	Величина критического значения в %
Допуски содержания по требованиям ГФУ	±10,00
Максимально допустимая полная неопределенность методики – $\max \Delta_{As}$	3,20
Максимальная систематическая погрешность – $\max \delta$	1,02
Критическое значение остаточного стандартного отклонения – $RSD_o \% \leq$	1,81
Индекс корреляции – $R_c \geq$	0,9924
Критическое практически незначимое значение свободного члена – $a \leq$	5,12

Согласно требованиям ГФУ [3] для методик количественного определения необходимо обязательно делать прогноз максимально допустимой неопределенности результатов, чтобы оценить корректность воспроизведения методики в другой лаборатории (табл. 2) [9]. Прогноз неопределенности методики проводили по расчетам неопределенности пробоподготовки (стадий взвешивания и разведения) и неопределенности конечной аналитической операции [3]. Используя фармакопейные требования к предельно допустимым погрешностям для мерной посуды, весов и приборов и значение неопределенности конечной аналитической операции – 0,70% [10], провели расчеты полной неопределенности методики количественного определения кислоты салициловой по формуле: $\Delta_{As} = \sqrt{(\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2)}$ [3]. Полная неопределенность методики

отвечает требованиям: $\Delta_{As} = \sqrt{(1,08^2 + 0,70^2)} = 1,29 \% \leq \max \Delta_{As} = 3,2 \%$ [3].

Специфичность методики исследовали по изучению относительной систематической погрешности ($\delta_{noise, \%}$), которая может вноситься вспомогательными веществами или продуктами разложения при определении вещества. Чтобы определить влияние плацебо, измеряли оптическую плотность (A_{blank}) раствора плацебо три раза с извлечением кюветы. Параллельно измеряли оптическую плотность (A_{st}) стандартного раствора. Было найдено среднее значение раствора плацебо: $A_{blank} = 0,0057$; $A_{st} = 0,7153$. Относительную систематическую погрешность, которая вносится вспомогательными веществами, рассчитывали по формуле: $(100 \times 0,0057) / 0,7153 = 0,79 \%$ [10]. Согласно полученным данным выполняется неравенство $\delta_{noise} = 0,79 \% \leq \max \delta = 1,02 \%$, то есть фоновое поглощения является незначимым, а методика характеризуется допустимой специфичностью.



Таблица 2

**Оценка неопределенности пробоподготовки методики
количественного определения кислоты салициловой**

Операция пробоподготовки	Параметр	Неопределенность, %
Стандартный раствор		
Взвешивание на аналитических весах, г	m_{st}	$0,0002/0,2 \times 100 = 0,10$
Доведение до объема мерной колбы, мл	100,00	0,12
Взятие аликвоты, мл	1,00	0,60
Доведение до объема мерной колбы, мл	100,00	0,12
Неопределенность пробоподготовки стандартного раствора, %	$\Delta_{st}^2 = 0,10^2 + 0,12^2 + 0,60^2 + 0,12^2 = 0,40$	
Лекарственная форма 4% салицилово-резорциновый спиртовой раствор		
Взвешивание на аналитических весах, г	4,00	$0,0002/4 \times 100 = 0,005$
Доведение до объема мерной колбы, мл	100,00	0,12
Взятие аликвоты, мл	1,00	0,60
Доведение до объема мерной колбы, мл	100,00	0,12
Взятие аликвоты, мл	5,00	0,60
Доведение до объема мерной колбы, мл	100,00	0,12
Неопределенность пробоподготовки, %	$\Delta_{sp} = \sqrt{\Delta_{st}^2 + \Delta_{x_i}^2} =$ $\sqrt{0,40 + 0,005^2 + 0,12^2 + 0,60^2 + 0,12^2 + 0,60^2 + 0,12^2} =$ $= \sqrt{1,1632} = 1,08$	

Осуществлена проверка стабильности растворов в течение 1 часа. Измерения оптической плотности испытуемого раствора (A_i) и стандартного раствора (A_{st}) проводили по 3 раза с выниманием кюветы. Для полученных величин оптической плотности рассчитали среднее относительное стандартное отклонение $RSDt, \% = Sr \times 100$ и относительный доверительный интервал $\Delta t, \% = t[95\%(nt-1)] \times RSDt = 2,0150 \times RSDt$ [3]. Как видно из табл. 3, в условиях проведения методики анализа в течение выбранного времени выполняется соотношение: $\Delta t, \% \leq \max \delta$, т.е. испытуемый раствор и стандартный раствор характеризуются стабильностью в течение 60 мин.

Таблица 3

**Результаты исследования стабильности аналитических
растворов комплексного соединения**

Модельный раствор	Период исследования стабильности nt , хв (A_i^*)						Среднее	RSDt, %	$\Delta t, \%$	$\max \delta, \%$
	10	20	30	40	50	60				
100,00%	0,7568	0,7560	0,7559	0,7542	0,7544	0,7548	0,7553	0,14	0,28	1,02
Стандарт	0,7930	0,7951	0,7960	0,7936	0,7920	0,7923	0,7937	0,20	0,41	

Примечание: * – Значение оптической плотности является средним 3 измерений раствора.

Изучение влияния незначительных колебаний pH на оптическую плотность исследуемых растворов проводили по следующей схеме: в модельных растворах добавляли по капле 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты или 0,01 М раствора гидроксида натрия, чтобы воспроизвести колебания pH в пределах $\pm 10,00\%$. Для полученных модельных растворов измеряли оптическую плотность при длине волны 314 нм. Для изучения влияния pH для каждого модельного раствора было проведено три параллельных измерения. Результаты исследования свидетельствуют о незначительном влиянии колебаний pH среды и не превышают максимальную неопределенность методики (табл. 4).

Согласно требованиям ГФУ [3] исследования валидационных характеристик проводили в пределах диапазона применения методики 80,00%-120,00% на модельных растворах. Для изучения линейности полученные результаты были статистически обработаны методом наименьших квадратов [3]. Построение калибровочного графика проводили в нормализован-



ных координатах. Требования к линейной зависимости в нашем случае выполняются на всем диапазоне концентраций, который изучался (см. рис.).

Таблица 4

Результаты изучения влияния колебаний pH на поглощение оптической плотности аналитическими растворами

Модельный раствор, %	Оптическая плотность A_i^*			Среднее	$S_{r_{pH}}$	RSD _{pH} , %	Δ_{pH} , %	max δ , %
	+ 0,01 M HCl	без добавления	+ 0,01M NaOH					
90,00	0,6520	0,6497	0,6543	0,6520	0,0023	0,23	0,68	1,02
100,00	0,7260	0,7210	0,7240	0,7237	0,0025	0,25	0,73	
110,00	0,7963	0,7927	0,7983	0,7958	0,0029	0,29	0,84	

Примечание: * – Значение оптической плотности является средним 3 измерений раствора.

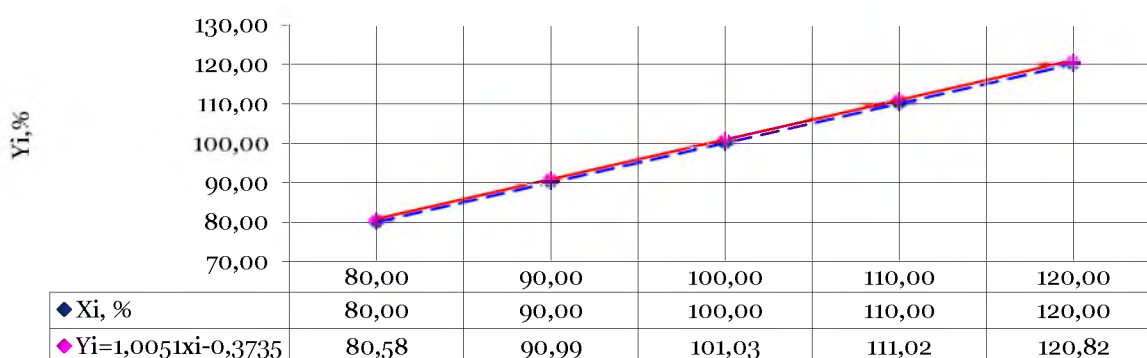


Рис. График линейности методики количественного определения кислоты салициловой в экстенпоральной лекарственной форме методом спектрофотометрии

Анализ данных свидетельствует, что значения критерия статистической неопределенности свободного члена линейной зависимости a и критерия статистической неопределенности b не превышают пределы допустимого критерия. Выполняются требования критерия практической незначимости систематической погрешности и остаточного стандартного отклонения (табл. 5). Итак, метод характеризуется линейностью и позволяет корректно контролировать содержание кислоты салициловой в лекарственной форме в пределах диапазона применения.

Исследование сходимости, правильности и воспроизводимости проводили на модельных растворах. Оценку результатов осуществляли путем сравнения с критериями приемлемости (табл. 5).

Таблица 5

Результаты изучения валидационных характеристик методики количественного определения кислоты салициловой в экстенпоральной лекарственной форме методом спектрофотометрии

Валидационные характеристики	Обозначения	Результаты исследований, %	Критерии приемлемости, %
Линейность	a	0,37	$a \leq 5,12$
	S_o	0,19	$S_o \leq RSD_o = 1,81$
	R_c	0,9999	$R_c \geq 0,9924$
Сходимость	Δ_{As}	0,33	$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} = 3,20$
Правильность	δ_z	0,89	$\delta_z \leq 1,02$
Воспроизводимость	Δ_{intra}	0,64	$\Delta_{intra} \leq \max \Delta_{As} = 3,20$

Выводы. Осуществлена процедура валидации методики количественного определения кислоты салициловой в лекарственной форме салицилово-резорцинового спиртового раствора. Проведен прогноз максимально допустимой неопределенности анализа, результаты которого удовлетворяют требованиям ГФУ. Для методики исследованы валидационные характеристики: стабильность, робастность, линейность, правильность, сходимость, воспроизводимость. Резуль-



таты доказывают, что методика может быть корректно воспроизведена и пригодна для дальнейшего использования.

Литература

1. European Pharmacopoeia.–6thed.–Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2008.–Vol. 2. – 3308 p.
2. British Pharmacopoeia [Электронный ресурс]. / The British Pharmacopoeia Secretariat. – London, 2009. – Vol. 1. – P. 10952. Режим доступа : <http://www.veik-com.ru/78022.html>.
3. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид.–Харків: РІРЕГ, 2001.–С.556с., Доп. 1. – Харків: РІРЕГ. – 2004. – 520с., Доп. 2.–Харків: РІРЕГ. – 2008. – 608 с.
4. Євтіфєєва, О.А. Розробка методики кількісного визначення кислоти саліцилової методом спектрофотометрії у спільній присутності із резорцином // О.А. Євтіфєєва, К.І. Проскуріна, М.О. Хмельова / Вісник фармації. – 2013. – № 2 (74). – С. 36-40.
5. Евтифеева, О.А. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения экстенпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества / О.А. Евтифеева, В.А. Георгианц // Фармаком. – 2007. – № 1. – С. 69-81.
6. Про затвердження правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки : Наказ МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. // Законодавче забезпечення системи контролю якості лікарських засобів в Україні : Збірка нормативно-правових актів / за ред. С. В. Гарної. – Х. : Вид-во НФаУ, 2010. – С. 171.
7. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпужников // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 3-17.
8. Technical Guide for the Elaboration of Monographs, European Pharmacopoeia. – 4th Edition. – Strasbourg, 2005. – 67 p.
9. Леонтьев, Д.А. Метрологический контроль качества результатов измерений / Д.А. Леонтьев, А.И. Гризодуб // Фармаком. – 2007. – № 2. – С. 16-25.
10. Гризодуб, А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А.И. Гризодуб // Фармаком. – 2006. – № 1/2. – С. 35-44.

THE VALIDATION OF THE TECHNIQUE OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF SALICYLIC ACID IN THE MEDICINE BY SPECTROPHOTOMETRICAL METHOD

O.A. IEVTIFIEVA¹
K.I. PROSKURINA¹
M.O. HMELEVA²
I.Yu. PETUKHOVA¹

¹⁾ *National University of Pharmacy,
 Kharkov, Ukraine*

²⁾ *Donetsk National Medical
 University of Maxim Gorky,
 Donetsk, Ukraine*

e-mail: anchem@ukrfa.kharkov.ua

The validation of the technique of quantitative determination of salicylic acid in the dosage form salicylic-resorcinol alcohol has been conducted according to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine. Estimate of total uncertainty analysis of spectrophotometric determination has been carried out. The parameters of validation such as stability, robustness, linearity, accuracy, precision, reproducibility have been investigated. It has been proved that the technique can be well reproduced and it is suitable for further use.

Key words: validation of technique of quantitative determination, salicylic acid, spectrophotometry.