

© Коллектив авторов, 2011

И. Е. Шохин^{1,2}, Г. В. Раменская^{1,2}, К. С. Давыдова³

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИК ИСПЫТАНИЯ “РАСТВОРЕНИЕ”

¹ ГОУ ВПО Первый московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздравсоцразвития России, Москва, Россия;

² ФГБУ “НЦ ЭСМП” Минздравсоцразвития России, Москва, Россия;

³ Филиал “Клиническая Фармакология” НЦ БМТ РАМН, Москва, Россия

Рассмотрены основные подходы к валидации методик испытания “Растворение”. Описано определение основных валидационных характеристик теста (специфичность, правильность, прецизионность, линейность, интервал методики, устойчивость). Приведены особенности валидации аналитических методик количественного определения высвободившегося лекарственного вещества методами УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

Ключевые слова: тест “Растворение”, валидация, спектрофотометрия, ВЭЖХ.

Важнейшее значение для разработки и анализа лекарственных средств (ЛС) в твердых дозированных лекарственных формах имеет испытание “Растворение” (ОФС 42-0003-04) [1], при помощи которого, можно осуществлять выбор оптимального состава лекарственной формы, оценивать поведение действующего вещества при проведении сравнительных исследований *in vitro*, контролировать изменения в процессе производства, определять качество готового препарата [2]. Как и любой аналитический метод, в соответствии с рекомендациями ИСН [3, 4] и ведущих фармакопей [5, 6], методики теста “Растворение” должны быть подвергнуты процедуре валидации [7]. В то же время многие из опубликованных данных по разработанным методикам теста не содержат в себе валидационные характеристики [8 – 10]. Таким образом, валидация методик испытания “Растворение” является необходимой задачей для ее разработчиков.

Особенности валидации методик теста “Растворение”

Следует обратить внимание на то, что валидация методики теста “Растворение” не сводится только к валидации методики количественного определения лекарственного вещества (ЛВ) или веществ в пробе. Поскольку сам тест представляет собой двухэтапное испытание — подготовка пробы (т.е. собственно растворение) и количественное определение ЛВ в пробе, то валидации должны быть подвергнуты обе стадии испытания [11]. При этом для ЛС, содержащих несколько действующих веществ, следует валидировать методики количественного определения каждого из компонентов [5, 11]. Основные рекомендации по разработке и валидации методик теста “Растворение” приведены в [5]. Валидация методики теста “Растворение” должна проводиться на откалиброванном оборудовании [11].

Валидационные характеристики теста “Растворение”

Специфичность (specificity)

Специфичность — это способность методики безусловно определять действующее вещество в присутствии компонентов, которые могут содержаться в пробе [12]. Для испытания растворения такими компонентами являются вспомогательные вещества, оболочки капсул и таблеток, другие действующие вещества при их наличии, компоненты среды и др. [5]. Специфичность методики устанавливают путем проведения теста “Растворение” по разработанной методике либо на смеси плацебо-компонентов (т.е. смеси вспомогательных веществ, которые содержатся в лекарственной форме), либо непосредственно на лекарственной форме-плацебо (таблетке или капсуле). При этом предпочтительнее использовать именно лекарственную форму-плацебо, особенно в случае валидации методики испытания для пролонгированной лекарственной формы, поскольку таблетки-плацебо или капсулы-плацебо будут высвобождать вспомогательные вещества постепенно, так же как и готовая лекарственная форма [5, 11]. При валидации методики теста “Растворение” для капсул допустимо определять специфичность либо на плацебо-капсулах, либо отдельно на оболочках капсул (shell-capsules) и смеси вспомогательных веществ, содержащихся внутри капсул [13]. Далее проводят определение мешающего действия плацебо по методике анализа действующего вещества, т.е. снимают УФ-спектр или проводят хроматографирование. При этом мешающее действие плацебо не должно превышать 2 %.

В том случае, если плацебо все же вносит значительный (более 2 %) вклад в аналитический отклик методики количественного определения растворившегося ЛВ методом УФ-спектрофотометрии (т.е. оптиче-

скую плотность), возможны следующие действия: (а) разработать методику количественного определения ЛВ методом УФ-спектрофотометрии при другой аналитической длине волны, (б) вычитать фоновое значение оптической плотности, используя большее значение длины волны, или (в) разработать методику количественного определения ЛВ хроматографическим методом [5]. Необходимо отметить, что поскольку испытание “Растворение” не предназначено для определения стабильности ЛВ, то и требование к разделению пиков продуктов распада ЛВ от основного пика на хроматограмме не является обязательным, при этом количественное определение допустимо проводить по сумме таких пиков [11].

Линейность (linearity) и интервал (range) методики

Линейность — это способность методики (в пределах определенного диапазона) получать результаты, прямо пропорциональные концентрации (количеству) действующего вещества в пробе [12]. Интервал (диапазон применения) методики — это расстояние между верхним и нижним значением концентрации (количества) анализируемого компонента в пробе (включая и эти значения), в рамках которого доказана приемлемая

правильность, прецизионность и линейность методики [12].

Для определения линейности при валидации методики испытания “Растворение” готовят серию стандартных растворов действующего вещества в среде растворения, при этом диапазон концентраций должен покрывать минимальную и максимальную ожидаемую концентрацию высвободившегося ЛВ. Например, для теста “Растворение”, проводимого при контроле качества (критерий приемлемости: высвобождение ЛВ не менее 75 % за 45 мин) [14] лекарственной формы немедленного высвобождения, рекомендуется, чтобы диапазон концентраций принадлежал интервалу от 25 до 125 % от концентрации, соответствующей полному высвобождению дозы вещества, заявленной на этикетке [11]. При изучении кинетики растворения ЛС линейность следует определять в диапазоне $\pm 20\%$ от ожидаемого диапазона концентраций профиля растворения (т.е., если в спецификации растворения пролонгированной ЛФ высвобождение в первой временной точке должно составлять не более 30 % и не менее 90 % в последней, линейность определяют в диапазоне от 10 до 110 % от концентрации, соответствующей полному высвобождению дозы ЛВ, заявленной на этикетке) [4, 11].

Валидационные характеристики испытания “Растворение”

Валидационная характеристика	Методика определения	Критерий приемлемости	Данные для протокола валидации
Специфичность	Определение УФ-спектра или хроматограммы ЛФ-плацебо при проведении теста “Растворение”	Мешающее действие плацебо не должно превышать 2 %	УФ-спектры или хроматограммы стандартного раствора, среды растворения, профильтрованной испытуемой пробы и пробы ЛФ-плацебо, методики определения
Линейность	Построение калибровочной кривой для серии стандартных растворов в установленном диапазоне (например, 25 – 125 %), определение коэффициента корреляции r^2 и значения точки пересечения кривой с осью ординат	Коэффициент корреляции r^2 не должен превышать 0,98. Значение точки пересечения кривой с осью ординат не должно значительно отличаться от нуля	Калибровочная кривая с рассчитанными значениями коэффициента корреляции, угла наклона, остаточной суммы квадратов и точки пересечения кривой с осью ординат, методики определения
Правильность	Определение открываемости для ЛФ-плацебо с прибавлением точного известного количества ЛВ при проведении теста “Растворение” не менее чем при 9 определениях не менее чем для 3 различных концентраций	Открываемость должна принадлежать интервалу 95 – 105 %	Данные по расчету открываемости, методики определения
Прецизионность: а) повторяемость б) промежуточная прецизионность в) воспроизводимость	Количественное определение ЛВ в пробе или стандартном растворе не менее чем 6 раз. Количественное определение ЛВ при проведении теста “Растворение” на ЛФ-плацебо с прибавлением точного количества ЛВ или непосредственно на готовом ЛС 2 аналитиками не менее чем 6 раз. Количественное определение ЛВ при проведении теста “Растворение” в разных лабораториях	RSD, %, не должно превышать 2 %. Разница между средними значениями результатов испытания не должна превышать абсолютные 10 % для временных точек менее 85 % и 5 % для временных точек 85 % и более	Данные по расчету RSD и других статистических параметров, методики определения
Интервал методики	Определение правильности, линейности и прецизионности при интервальных значениях данных и значений внутри интервала валидационных характеристик (например, 25 – 125 %)	Правильность, линейность и прецизионность должны быть установлены для интервальных значений и значений внутри интервала	Данные для определения интервала методики должны быть приведены в разделах протокола по определению соответствующих валидационных характеристик
Устойчивость	Количественное определение ЛВ при проведении теста “Растворение” при незначительных изменениях условий испытания и количественного определения. Определение стабильности стандартного и испытуемого раствора при необходимости	Изменение указанных характеристик не должны быть статистически значимыми ($p < 0,05$)	Модифицированные методики проведения теста “Растворение” и количественного определения, статистическая обработка результатов

Для приготовления стандартных растворов ЛВ с низкой растворимостью (например, ибупрофен) допустимо применение органических растворителей, но при этом их содержание в готовом стандартном растворе не должно превышать 5 % (об./об.) [5].

Показатели линейности методики определяют при помощи обычных статистических методов, например, методом наименьших квадратов. Рассчитывают коэффициент корреляции (r^2), который не должен превышать 0,98, угол наклона (slope), остаточную сумму квадратов (residual sum of squares) и значение точки пересечения с осью ординат (y-intercept), которое не должно значительно отличаться от нуля [4, 5, 11].

Интервал методики устанавливают путем определения линейности, правильности и прецизионности для интервальных значений (а также значений, принадлежащих интервалу) каждой из характеристик, например, для диапазона 25 – 125 % от заявленного содержания ЛВ для лекарственной формы немедленного высвобождения [11].

Правильность (accuracy) / истинность (trueness)

Правильность — это степень близости между известным истинным значением или справочной величиной и значением, полученным по данной методике. Иногда употребляется равнозначный термин “истинность” [12].

Для определения правильности методики испытания “Растворение” проводят тест “Растворение” на лекарственных формах-плацебо или смеси вспомогательных веществ с прибавлением точной навески действующего вещества, или его стандартного раствора, приготовленного, как описано в разделе “линейность” (так называемое “spiked placebo”) [5, 11]. Обычно проводят несколько (не менее 3) таких испытаний, прибавляя к плацебо ЛВ в диапазоне концентраций, который покрывает минимальную и максимальную ожидаемую концентрацию (например, 50, 75 и 120 % от заявленного значения для лекарственной формы немедленного высвобождения) [11].

Показатель правильности определяют путем расчета открываемости, т.е. как соотношение между теоретическим (введенным в пробу) и практическим (определенным) содержанием ЛВ, выраженным в процентах. Открываемость должна принадлежать интервалу 95 – 105 % для каждого испытания [5].

Прецизионность (precision)

Прецизионность — это степень близости (степень дисперсии) между сериями измерений, полученных при параллельных измерениях однородного образца в установленных условиях. Прецизионность может определяться на нескольких уровнях — повторяемость/сходимость (repeatability), промежуточная прецизионность (intermediate precision) и воспроизводимость (reproducibility) [12]. При определении воспроизводимости методики испытания “Растворение” необходимость в определении промежуточной прецизионности отсутствует [15].

Воспроизводимость методики теста “Растворение” определяют путем повторных (не менее 6) измерений

отклика аналитической методики (оптической плотности или площади пика) стандартного раствора или испытуемой пробы. Ее также допустимо определять при повторных измерениях проб, используемых для определения правильности или линейности [5]. Значение относительного стандартного отклонения (RSD, %) не должно превышать 2 % [12].

Для определения промежуточной прецизионности измеряют содержание действующего вещества не менее чем в 6 пробах, полученных разными аналитиками (не менее 2) с использованием разного оборудования (водяные бани, спектрофотометры, колонки для ВЭЖХ, автосамплеры и др.). Каждый аналитик готовит среду растворения и стандартный раствор для своего испытания. Испытание при этом выполняется в разные дни [5, 11]. Промежуточную прецизионность допустимо определять либо на серии лекарственного средства с плотными значениями однородности дозирования, либо с использованием лекарственных форм-плацебо с прибавлением ЛВ [5]. При определении воспроизводимости испытание “Растворение” проводят в разных лабораториях [11].

Промежуточная прецизионность или воспроизводимость методики испытания “Растворение” считается установленной, если разница между средними значениями, полученными разными аналитиками или в разных лабораториях, не превышает абсолютные 10 % для временных точек, соответствующих высвобождению ЛВ менее 85 %, и не превышает 5 % для временных точек, соответствующих высвобождению 85 % ЛВ или более. При этом данный критерий приемлемости не является абсолютным, он может зависеть от препарата, и для его определения могут быть использованы другие статистические методы (например, расчет RSD) [5, 11].

Устойчивость (robustness)

Устойчивость — это измерение способности аналитической методики оставаться неизменной при небольших, намеренных изменениях условий испытания и показывает надежность методики при обычном использовании [12].

Устойчивость методики испытания “Растворение” определяют как для самого теста, так и для методики количественного определения высвободившегося ЛВ [11]. Устойчивость методики определяют в 3 – 6 повторностях, в зависимости от результатов определения промежуточной прецизионности [5].

Параметры испытания, модифицируемые при определении устойчивости собственно теста “Растворение”, включают в себя изменение объема и состава среды растворения (рН, буферной емкости, концентрации поверхностно-активных веществ), число оборотов мешалки, температуру, метод деаэрации среды. Для количественного определения высвободившегося ЛВ методом ВЭЖХ это: колонка (одного типа), состав подвижной фазы (доля органического компонента, доля буферного раствора, рН), градиент элюирования, скорость потока подвижной фазы, температура колонки, длина волны УФ-спектрофотометрического детек-

тирования; для спектрофотометрического анализа изменяемым параметром является длина волны [5, 11, 15].

При определении устойчивости методики также определяют стабильность стандартного раствора и испытываемой пробы. Стандартный раствор необходимо хранить в условиях, обеспечивающих его стабильность (например, в защищенном от света месте), испытываемую пробу — при комнатной температуре. Стабильность стандарта определяют относительно свежеприготовленного стандартного раствора, испытываемой пробы — относительно первоначальных данных количественного определения той же пробы. Растворы считаются стабильными в течение данного времени, если интервал стабильности раствора составляет от 98 до 102 % [5]. Стабильность растворов не определяют, если согласно методике испытания необходимо использовать только свежеприготовленные растворы.

Основные валидационные характеристики, методики их определения, критерии приемлемости и данные для валидационных протоколов методик испытания “Растворение” приведены в таблице.

Таким образом, валидация методик испытания “Растворения” является неотъемлемой частью для подтверждения пригодности разработанной методики. Валидацию проводят как для собственно теста “Растворение”, так и для аналитической методики количественного определения. Определяемыми валидационными характеристиками являются: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость, промежуточная прецизионность, воспроизводимость), интервал методики и устойчивость.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный стандарт качества лекарственных средств, Общая фармакопейная статья “Растворение”, Москва (2004).
2. Методические рекомендации для разработчиков и производителей лекарственных средств по изучению сравнитель-

ной кинетики растворения твердых дозированных лекарственных форм, Утверждены Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, Ремедиум, Москва (2010).

3. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Q2A “Text on Validation of Analytical Procedures”, ICH, Geneva (1995).
4. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Q2B “Validation of Analytical Procedures: Methodology”, ICH, Geneva (1997).
5. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 33 — NF 28). United States Pharmacopeial Convention, Inc. — Rockville, MD, USA (2009).
6. European Pharmacopoeia, 6th ed., European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe, Strasbourg, France (2007).
7. Н. П. Садчикова, А. П. Арзамасцев, Ю. Я. Харитонов, *Фармация*, № 4, 8 – 12 (2006).
8. И. Е. Шохин, Г. В. Раменская, Г. Ф. Василенко, Е. А. Малащенко, *Фармация*, № 5, 13 – 15 (2010).
9. И. Е. Шохин, Г. В. Раменская, Г. Ф. Василенко, Е. А. Малащенко, *Вопросы биол., мед. и фарм. химии*, № 6, 36 – 38 (2009).
10. И. В. Титов, В. Л. Дорофеев, А. П. Арзамасцев, *Вестн. Воронеж. гос. университета, серия: химия, биология, фармация*, № 2, 270 – 275 (2004).
11. С. С. Chan, Н. Lam, Y. C. Lee, X.-Y. Zhang, *Analytical method validation and instrument performance verification*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA (2004).
12. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств, подготовленное Федеральным союзом фармпроизводителей Германии (ВАН), пер. Аладышевой Ж. И., Спицко О. Р., Береговых В. В. (ред.), Литерпра, Москва (2008).
13. S. Borgmann, L. Parciannello, M. Z. Arend, et al., *Sci. Pharm.*, **76**, 541 – 554 (2008).
14. Государственная фармакопея СССР, Вып. 1, Общие методы анализа, МЗ СССР, Медицина, Москва (1987).
15. *Guidance for Industry: Analytical procedures and method validation (draft)*, U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U. S. Government Printing Office: Washington, DC (2000).

Поступила 18.10.10

MODERN APPROACHES TO VALIDATION OF PHARMACOPEIAL DISSOLUTION TEST

I. E. Shokhin ¹, G. V. Ramenskaya ², and K. S. Davydova ³

¹ Sechenov Medical Academy, Moscow, Russia;

² State Scientific Center for Drug Expertise and Control, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, Russia;

³ Scientific Center for Biomedical Technologies, State Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR), Moscow, Russia

General approaches to validation of the pharmacopeial dissolution test are considered. Determination of the dissolution validation characteristics (specificity, accuracy, precision, linearity range and robustness) is described. Specific features for validation of released drug assay using UV-spectrophotometry and HPLC are described.

Key words: Pharmacopeial dissolution test, validation, spectrophotometry, HPLC