

УДК: 615.07.242.454

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2022.86.92.003>

ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К ВАЛИДАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ ДЛЯ РЕМИНЕРАЛИЗАЦИИ ЭМАЛИ

А.Л. Голованенко, доктор фарм. наук, доцент кафедры фармацевтической технологии, ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, г. Пермь, annagolovanenko@yandex.ru

Е.С. Березина, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармацевтической химии ФДПО и ФЗО ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, г. Пермь, berezina@pfa.ru

И.В. Алексеева, доктор фарм. наук, профессор кафедры фармацевтической технологии, ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, г. Пермь, alekseeva@pfa.ru

В ходе подготовки нормативной документации на пленки и гели для профилактики и лечения кариеса эмали модифицированы, апробированы и валидированы методики подтверждения подлинности и количественного определения основных действующих веществ: кальция хлорида, калия фосфата двузамещенного, натрия фторида. Использовались как химические, так и физико-химические методы, модифицированные с учетом специфики лекарственных форм. В статье представлены результаты валидации методик испытания на подлинность и количественного определения действующих веществ в реминерализующих пленках и гелях. В результате проведенных исследований установлено, что валидированные методики испытания на подлинность и количественного определения могут быть рекомендованы для включения в нормативную документацию на разработанные пленки и гели.

Ключевые слова: валидация, кариес эмали, пленки, гели, подлинность, количественное определение, специфичность, линейность, правильность, повторяемость

На кафедре фармацевтической технологии Пермской государственной фармацевтической академии проведены комплексные экспериментальные исследования, в результате которых разработаны гели и пленки, оказывающие реминерализующий эффект. В лекарственные формы (ЛФ) одновременно введены минерализующие неорганические соли, содержащие легко высвобождаемые ионы, которые в эмали восполняют дефекты кристаллической решетки, повышают резистентность к действию кислот и снижают проницаемость. Сохранение данных минерализующих ионов в свободном активном состоянии значительно увеличивает проникновение в эмаль и предотвращает быстрое их выведение из полости рта. Согласно основным требованиям к реминерализующим средствам, при разработке составов ЛФ учитывалось соотношение ионов кальция и фосфатов 1:4 [1]. Расширение числа разработок по созданию новых эффективных, качественных и безопасных лекарственных препаратов (ЛП) приводит к отказу от устаревших методик контроля качества и необходимости применения более совершенных аналитических

методик. На разработанные пленки и гели при подготовке нормативной документации (НД) проведена валидационная оценка методик, предложенных для подтверждения показателей «подлинность» и «количественное определение» основных действующих веществ (ДВ): кальция хлорида, калия фосфата двузамещенного, натрия фторида. Использовались химические и физико-химические методы, модифицированные с учетом особенностей ЛФ [2,3]. Валидация аналитических методик проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [4].

Цель настоящего исследования – валидация методик испытания на подлинность и количественного определения ДВ в пленках и гелях для профилактики и лечения кариеса эмали.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами являлись пять серийных образцов пленок и гелей.

Для исследований использованы активные фармацевтические субстанции (АФС) фармакопейного качества: кальция хлорид гексагидрат (ФС.2.2.0024.18, «Агрохим», ОАО «Химзавод им. Л.Я. Карпова», г. Менделеевск, Татарстан, 200919, срок хранения 3 года), калия фосфат двузамещенный (ФС 42-4297-79, ЗАО «Ленреактив», Россия, 101019, срок хранения 3 года), натрия фторид (ФС.2.2.0013.15, «Реахим», Россия, 201119, срок хранения 3 года); вспомогательные вещества (ВВ), разрешенные к применению и отвечающие требованиям действующей нормативной документации: натрий карбоксиметилцеллюлоза (ТУ 2231-034-07507908-01, ЗАО «Вектон», СПб, Россия, 151219, срок хранения 3 года); глицерол (ФС.2.2.0006.15, ЗАО «Купавнареактив», Россия, 082019, срок хранения 3 года); вода очищенная (ФС 2.2.0020.18), ксилит (ГОСТ

P53904-2010, ООО «Виннер», Россия, 101219, срок хранения 3 года), мяты перечной масло эфирное (ТУ 9151-001-99535663-07, «Аспера», Россия, 231019, срок хранения 3 года).

Для взятия навесок АФС использовали аналитические весы (HR-150AG, AND, Корея).

Гомогенизацию поливочного раствора для пленок и составов гелей осуществляли погружной верхнеприводной лабораторной мешалкой RW 11 basic Labeqq. Гели изготовлены методом гомогенизации. Пленки получали методом полива с последующим высушиванием в сушильном шкафу (EU-53, №39612546, Jouan, Франция).

Для оценки специфичности методик испытания на подлинность использовали модельные смеси известного состава: полный состав пленок и гелей, смеси с чередованием ДВ, пленки и гели плацебо. Предварительно для качественных реакций проведена пробоподготовка. Для подтверждения подлинности ДВ использовались фармакопейные, а также нефармакопейные реакции на соответствующие катионы и анионы [2,4,6,9,10].

Для определения количественного содержания кальция хлорида использовали комплексометрический метод. Предложен способ обратного титрования с соблюдением определенной последовательности добавления реактивов для предотвращения образования осадка кальция фосфата.

Количественное содержание калия фосфата двузамещенного определяли фотоэлектродиметрическим методом (фотометр КФК-3, ЗОМЗ, Россия) с использованием реакции образования окрашенного комплекса фосфат-молибдат аммония с расчетом по рабочему стандартному образцу.

Для определения количественного содержания натрия фторида модифицирован фотоэлектродиметрический метод, предложено использовать реакцию с цирконил-ализариновым комплексом с расчетом по рабочему стандартному образцу [7–10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для валидации аналитических методик использовали пять серийных образцов пленок и гелей. Валидация аналитических методик проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [4].

При оценке *специфичности методик реакций испытания на подлинность* установлено, что предложенные методики характеризуются отрицательным аналитическим сигналом на плацебо и модельных смесях, свободных от определяемых ДВ, и положительным аналитическим сигналом на модельных смесях различного состава, содержащих определяемый компонент.

Валидация методик количественного определения ДВ в пленках

Специфичность. Исследования методик количественного определения ДВ проводились на модельных смесях различного состава с чередованием ДВ. При исследовании проводили по три параллели определений. Получены следующие данные: доверительные интервалы $3,891 \times 10^{-3} \pm 8,9 \times 10^{-5}$ г для кальция хлорида, $6,596 \times 10^{-3} \pm 2,62 \times 10^{-4}$ г для калия фосфат двузамещенного, $1,01 \times 10^{-4} \pm 0,2 \times 10^{-5}$ г для натрия фторида. Полученные результаты свидетельствуют о соответствии критериям приемлемости.

Линейность. Требования к параметрам *линейной зависимости* выполнялись в диапазоне концентраций от 70% до 130% от заявленного количества ДВ. Полученные результаты обработаны в виде графика зависимости расхода титранта – для комплексонометрического метода и оптической плотности – для фотоэлектроколориметрического метода от количества определяемых ДВ. Коэффициенты корреляции регрессионных графиков для всех определяемых ДВ составили 0,999. Диапазон концентраций от 70% до 130% от заявленного количества

ДВ можно определить как аналитическую область разработанных методик. Параметры линейной зависимости соответствуют требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [4].

Правильность. Правильность методик оценивалась по результатам анализа модельных смесей. Использовали три параллели определений для семи аналитических концентраций в интервале от 70% до 130% от заявленного состава. Отношение «найденно – введено» (Z_i) находится в интервале от 98% до 103%. Отклонение \bar{Z} от 100% не превышает доверительный интервал. Систематическая погрешность статистически неотличима от нуля. Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной *правильности* методик. Результаты количественного определения ДВ в пленках для лечения кариеса эмали представлены в табл. 1. Содержание ДВ приведено на среднюю терапевтическую дозу массой 0,05 г.

Доверительные интервалы составили: $4,07 \times 10^{-3} \pm 0,14 \times 10^{-4}$ г для кальция хлорида, $6,80 \times 10^{-3} \pm 1,9 \times 10^{-4}$ г для калия фосфат двузамещенного и $1,01 \times 10^{-3} \pm 0,2 \times 10^{-5}$ г для натрия фторида. По величинам стандартного отклонения и доверительному интервалу можно сделать заключение об удовлетворительной *прецизионности (повторяемости)* предложенных методик под влиянием внутрिलाбораторных вариаций.

Валидация методик количественного определения ДВ в гелях

Специфичность. Исследования методик количественного определения ДВ проводились на модельных смесях различного состава с чередованием ДВ. Исследования проведены в трех параллелях определений. Получены следующие доверительные интервалы: $7,659 \pm 1,2 \times 10^{-2}$ г для кальция хлорида, $13,262 \pm 0,158$ г для калия фосфата двузамещенного, $0,199 \pm 0,2 \times 10^{-2}$ г для натрия фторида.

Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДВ В ПЛЕНКАХ

Метрологические характеристики	Действующие вещества		
	Кальция хлорид	Калия фосфат двузамещенный	Натрия фторид
Результат отдельного определения, X, г	3,93×10 ⁻³ 3,99×10 ⁻³ 4,06×10 ⁻³ 4,17×10 ⁻³ 4,19×10 ⁻³	6,67×10 ⁻³ 6,61×10 ⁻³ 6,91×10 ⁻³ 6,94×10 ⁻³ 6,89×10 ⁻³	1,00×10 ⁻⁴ 1,03×10 ⁻⁴ 0,99×10 ⁻⁴ 1,00×10 ⁻⁴ 1,02×10 ⁻⁴
Среднее значение результатов определения, \bar{X} , г	4,07×10 ⁻³	6,80×10 ⁻³	1,01×10 ⁻⁴
Стандартное отклонение среднего результата, S, г	1,1×10 ⁻⁴	1,5×10 ⁻⁴	0,2×10 ⁻⁵
Доверительный интервал среднего результата, $\Delta\bar{X}$	1,4×10 ⁻⁴	1,9×10 ⁻⁴	0,2×10 ⁻⁵
Относительная ошибка отдельного результата, ϵ , %	7,692 7,454 7,947 7,827 7,489	6,346 6,403 6,125 6,099 6,143	4,888 4,746 4,958 4,888 4,793
Относительная ошибка среднего результата, $\bar{\epsilon}$, %	3,43	2,78	2,17

Доверительные интервалы свидетельствуют о соответствии критериям приемлемости.

Линейность. Требования к параметрам линейной зависимости исследованы в диапазоне концентраций от 70% до 130% от заявленного количества ДВ. Полученные результаты обработаны в виде графика зависимости расхода титранта – для комплексонометрического метода и оптической плотности – для фотоэлектроколориметрического метода от количества определяемых ДВ. Коэффициенты корреляции регрессионных графиков для всех определяемых ДВ составили 0,999. Диапазон концентраций от 70% до 130% от заявленного количества ДВ можно определить как аналитическую

область разработанных методик. Параметры линейной зависимости соответствуют требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [4].

Правильность. Правильность методик оценивалась по результатам анализа модельных смесей. Проведено по три параллели определений для семи аналитических концентраций в интервале от 70% до 130% от заявленного состава. Отношение «найдено – введено» (Z_i) находится в интервале от 97% до 102%. Отклонение \bar{Z} от 100% не превышает доверительный интервал. Систематическая погрешность статистически неотличима от нуля. Полученные результаты свидетельствуют

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДВ В ГЕЛЕ

Метрологические характеристики	Действующие вещества		
	Кальция хлорид	Калия фосфат двузамещенный	Натрия фторид
Результат отдельного определения, X, г	7,58	13,49	0,207
	7,47	13,51	0,199
	7,48	13,47	0,205
	7,45	13,5	0,198
	7,58	13,45	0,200
Среднее значение результатов определения, \bar{X} , г	7,51	13,48	0,202
Стандартное отклонение среднего результата, S, г	$6,3 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{-2}$	$0,4 \times 10^{-2}$
Доверительный интервал среднего результата, $\Delta\bar{X}$	$7,83 \times 10^{-2}$	$2,99 \times 10^{-2}$	$4,9 \times 10^{-3}$
Относительная ошибка отдельного результата, ϵ , %	2,311	0,496	5,321
	2,345	0,496	5,535
	2,342	0,497	5,373
	2,351	0,496	5,563
	2,311	0,498	5,508
Относительная ошибка среднего результата, $\bar{\epsilon}$, %	1,04	0,222	2,441

об удовлетворительной *правильности* методик. Результаты количественного определения ДВ в геле для лечения кариеса эмали представлены в табл. 2. Содержание ДВ приведено на 100,0 г геля.

Доверительные интервалы составили: $7,51 \pm 7,8 \times 10^{-2}$ г для кальция хлорида, $13,48 \pm 2,99 \times 10^{-2}$ г для калия фосфата двузамещенного и $0,202 \pm 0,5 \times 10^{-2}$ г для натрия фторида. По величинам стандартного отклонения и доверительному интервалу можно сделать заключение об удовлетворительной прецизионности (повторяемости) предложенных методик под влиянием внутрилабораторных вариаций.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных исследований изучены валидационные характеристики методик испытания на «подлинность» и «количественное определение» основных ДВ в пленках и гелях для профилактики и лечения кариеса эмали.

2. Валидированные методики апробированы в Региональном испытательном центре «Фарматест» Пермской государственной фармацевтической академии и в условиях аптеки МСЧ №140 ФГБУЗ ПКЦ ФМБА (г. Пермь). Установлено, что разработанные аналитические методики специфичны, имеют линейную

зависимость в аналитической области $\pm 30\%$ от заявленного количества ДВ, удовлетворительную правильность, повторяемость.

3. Валидированные методики использованы при стандартизации пленок и гелей по показателям «подлинность» и «количественное определение», при хранении методом долгосрочных испытаний стабильности, включены в проект ФС и Методические указания по изготовлению и контролю качества пленок и гелей в условиях аптечных организаций.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Голованенко А.Л. Обзор реминерализующих лекарственных средств, применяющихся для профилактики и лечения начального кариеса эмали // Тихоокеанский медицинский журнал. 2018. №2. С. 37–43.
2. Березина Е.С. Разработка методик качественного и количественного определения фторидов в геле реминерализующего действия / Е.С. Березина, А.Л. Голованенко // Современные проблемы науки и образования. 2012. №6 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/106-7410> (дата обращения: 13.11.2012).
3. Березина Е.С., Голованенко А.Л., Алексева И.В. Разработка методик качественного и количественного определения фосфатов в пленках лекарственных реминерализующего действия // Фармация. 2015. №1. С. 7–9.
4. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик: Вводится впервые / Государственная фармакопея РФ XIV изд. – Москва, 2018. – Т. 1. – С. 276–288 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения: 24.09.2022).
5. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента: взамен ст. ГФ XI, вып. 1 / Государственная фармакопея РФ XIV изд. – Москва, 2018. – Т. 1. – С. 289–318 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения: 24.09.2022).
6. ОФС.1.2.2.0001.15. Общие реакции на подлинность / Государственная фармакопея РФ XIV изд. – Москва, 2018. – Т. 1. – С. 934–942 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения: 24.09.2022).
7. ОФС.1.2.3.0015.15. Комплексонометрическое титрование: взамен ГФ X, взамен ст. ГФ XI, вып. 1 / Государственная фармакопея РФ XIV изд. – Москва, 2018. – Т. 1. – С. 1055–1058 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения: 24.09.2022).
8. ОФС.1.2.1.1.0012.18. Фотометрия: взамен ГФ X, взамен ст. ГФ XI, вып. 1 / Государственная фармакопея РФ XIV изд. – Москва, 2018. – Т. 1. – С. 835–839 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения: 24.09.2022).
9. ФС.2.2.0024.18. Кальция хлорид гексагидрат: взамен ГФ X, ст. 119 / Государственная фармакопея РФ XIV изд. – Москва, 2018. – Т. III. – С. 3961–3963 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения: 24.09.2022).
10. ФС.2.2.0013.15. Натрия фторид / Государственная фармакопея РФ XIV изд. – Москва, 2018. – Т. III. – С. 4441–4443 [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения: 24.09.2022).

GENERAL APPROACHES TO THE VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS IN DOSAGE FORMS FOR ENAMEL REMINERALIZATION

A.L. Golovanenko, E.S. Berezina, I.V. Alexeeva

Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia

During the preparation of regulatory documentation for films and gels for the prevention and treatment of enamel caries, methods were modified, tested and validated for authenticating and quantifying the main active ingredients: calcium chloride, dibasic potassium phosphate, sodium fluoride. Both chemical and physicochemical methods were used, modified taking into account the specifics of dosage forms. The article presents the results of validation of methods of testing for authenticity and quantitative determination of active substances in remineralizing films and gels. As a result of the studies, it was found that validated methods for testing for authenticity and quantitative determination can be recommended for inclusion in the regulatory documentation for the developed films and gels.

Keywords: validation, enamel caries, films, gels, authenticity, quantification, specificity, linearity, correctness, repeatability