

ბარამიძე ქ., ჩიკვილაძე თ., ტეფნაძე ლ., კობერიძე ნ., ჯორჯიკია მ.

მაღალი წნევის სითხოვანი ქრომატოგრაფიული მეთოდის ვალიდაცია კაფსულებში ფლუკონაზოლის რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის

თსსუ, ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ქიმიის დეპარტამენტი; “გლობალტესტი“-ს საგამოცდო ლაბორატორია

სამკურნალო საშუალებების წარმოების მიმართ თანამედროვე მოთხოვნების შესაბამისად სავალდებულოა მხოლოდ ვალიდირებული მეთოდების გამოყენება[1].

ვალიდაციის პრაქტიკული ღირებულება ის არის, რომ ახალი მეთოდიკების შემუშავების პროცესში შესაძლებელია დროულად გამოვლინდეს მისი ნაკლი და ადრეულ სტადიაზე მოხდეს მეთოდიკის დახვეწა.

ანალიზური მეთოდების ვალიდაცია მოიცავს სიზუსტის, სპეციფიკურობის, სწორხაზოვნების, სისწორის და სხვა მეტროლოგიური მახასიათებლების განსაზღვრას.

ვალიდაციის განსახორციელებლად საერთაშორისო ნორმატიული დოკუმენტია ამერიკის ფარმაცოპიის (USP) სტატია “ანალიზური მეთოდების ვალიდაცია” და ჰარმონიზაციის საერთაშორისო კონფერენციის (ICH) დოკუმენტები[2,3].

**შრომის მიზანი:** მაღალი წნევის სითხოვანი ქრომატოგრაფიული მეთოდის ვალიდაცია კაფსულებში ფლუკონაზოლის რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის.

**კვლევის მასალა და მეთოდები:** კვლევის მასალას წარმოადგენდა ფლუკონაზოლის 50 მგ და 150 მგ-იანი კაფსულები. რაოდენობრივი ანალიზი განხორციელდა მაღალი წნევის სითხოვანი ქრომატოგრაფიული მეთოდით, ხელსაწყოზე СТАЙЕР (Аквилон), სვეტი - C18, რომლის ტექნიკური და საექსპლოატაციო მახასიათებლები მთლიანად შეესაბამება აშშ, ბრიტანეთის და ევროპის ფარმაცოპეებს და დამოწმებულია სსიპ “სტანდარტების, ტექნიკური რეგლამენტებისა და მეტროლოგიის ეროვნული სააგენტო“-ს მიერ. კვლევა განხორციელდა ხარისხის საერთაშორისო სტანდარტების (ISO 17025, ICH Q 2 A) მოთხოვნების შესაბამისად, ვალიდაციის შემდეგი მახასიათებლების მიხედვით: სპეციფიკურობა, სიზუსტე, სისწორე და სწორხაზოვნება.

**ექსპერიმენტული ნაწილი:** რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდი:

**საკვლევი ნიმუშის ხსნარის მომზადება:** საკვლევი ნიმუშის 0.2 გ (ზუსტი წონა) მოვათავსეთ 100 მლ-იან გამზომ კოლბში, დავუმატეთ 70 მლ მოძრავი ფაზა, შევურიეთ 10 წუთის განმავლობაში, კოლბის მოცულობა ჭდემდე შევავსეთ მოძრავი ფაზით, შევურიეთ და გავფილტრეთ;

**სტანდარტული ნიმუშის ხსნარის მომზადება:** ფლუკონაზოლის სტანდარტული ნიმუშის 0.1 გ (ზუსტი წონა) მოვათავსეთ 100 მლ-იან გამზომ კოლბში, გავხსენით 70 მლ მოძრავ ფაზაში, კოლბის მოცულობა ჭდემდე შევავსეთ იმავე გამხსნელით და შევურიეთ.

**ქრომატოგრაფირების პირობები:** უძრავი ფაზა - სვეტი - C18, მოძრავი ფაზა: მეთანოლი-წყალი (4 : 6), ნაკადის სიჩქარე – 1.0 მლ/წთ, დეტექტირების ტალღა – 261 ნმ, სვეტის ტემპერატურა - 30 C. ერთ კაფსულაში ფლუკონაზოლის შემცველობას მილიგრამებში (X) გამოვთვალეთ ფორმულით:

$$X = \frac{S_1 \times m_0 \times 100 \times b \times P \times 1000}{S_0 \times m_1 \times 100 \times 100} = \frac{S_1 \times m_0 \times P \times b \times 10}{S_0 \times m_1}$$

სადაც:

S<sub>1</sub> – საკვლევი ნიმუშის ხსნარის პიკის ფართობია;

S – ფლუკონაზოლის სტანდარტული ნიმუშის ხსნარის პიკის ფართობი;

b – კაფსულის შიგთავსის საშუალო მასა, გ;

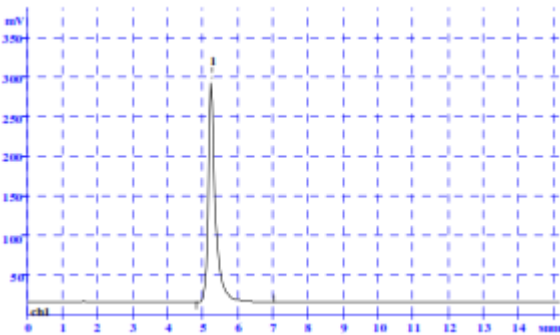
m<sub>0</sub> – ფლუკონაზოლის სტანდარტული ნიმუშის წონაკი, გ;

m<sub>1</sub> – პრეპარატის წონაკის მასა, გ;

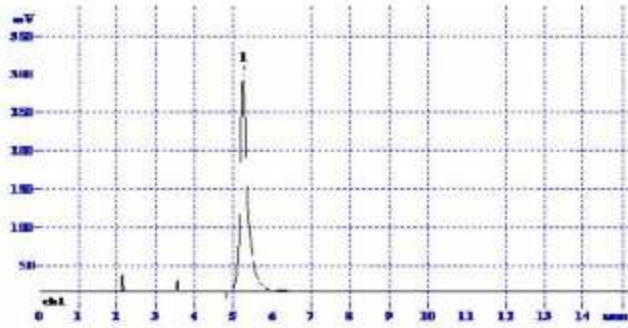
P – ფლუკონაზოლის შემცველობა სტანდარტულ ნიმუშში, %.

**კრიტერიუმი:** კაფსულაში ფლუკონაზოლის შემცველობა უნდა იყოს 47.50 მგ – 52.50 მგ 50 მგ-იანი კაფსულებისთვის და 142.50 მგ – 157.50 მგ 150 მგ-იანი კაფსულებისთვის.

**სპეციფიკურობის განსაზღვრისათვის** თითოეულ ნიმუშზე გაზომვები ჩატარდა სამუშაო დღის განმავლობაში 6 - 6 –ჯერ (სურ. №1 და №2).



სურ. №1. ფლუკონაზოლის სტანდარტული ნიმუშის ქრომატოგრამა



სურ. №2. ფლუკონაზოლის საკვლევი ნიმუშის ქრომატოგრამა

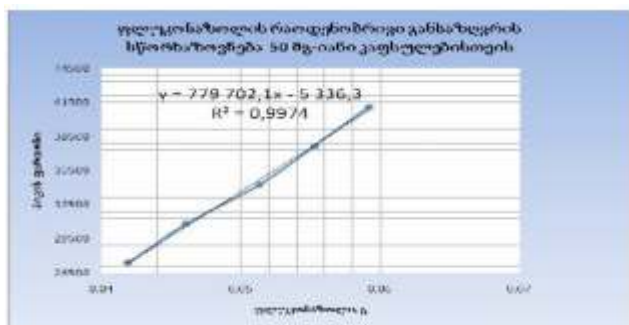
დადგინდა, რომ შერჩეული ქრომატოგრაფიული სისტემა უზრუნველყოფს ფლუკონაზოლის და კაფსულაში შემავალი სხვა კომპონენტების მკაფიო დაყოფას

სამუშაო დღის განმავლობაში მიღებული შედეგების სპეციფიკურობის ვარიაციის კოეფიციენტი შეადგენს 0.12, რაც მიუთითებს ანალიზური მეთოდებისადმი წაყენებული კრიტერიუმების მიმართ მეთოდის სპეციფიკურობის შესაბამისობაზე (CV<2%).

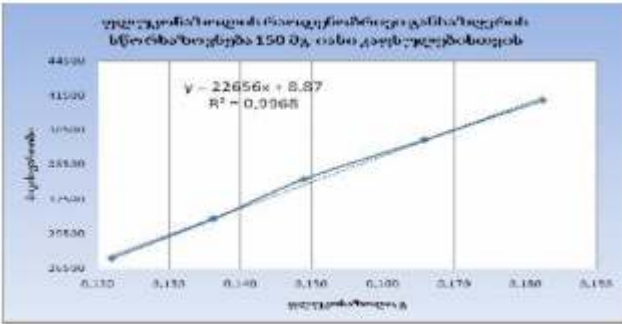
**სიზუსტის** განსაზღვრისას მიღებული შედეგების მნიშვნელობები ახლოს არის ერთმანეთთან; ფარდობითი სტანდარტული გადახრა ფლუკონაზოლის 50 მგ-იანი კაფსულებისთვის არის 0.22%, 150 მგ-იანი კაფსულებისთვის – 0.99% (N < 2.0%).

**სისწორის** განსაზღვრისათვის გამოვიყენეთ ჭეშმარიტ რაოდენობასთან მიმართებაში აქტიური ნივთიერების 80%, 100% და 120%-იანი და დამხმარე ნივთიერებების ცნობილი რაოდენობის ნარევები თითო კაფსულისათვის. თითოელი ნიმუშისათვის ვახდენით 3-ჯერად განსაზღვრას, ვითვლიდით საშუალო არითმეტიკულს, პროცენტს და პოვნადობას. სისწორე (მეთოდის სისტემატური ცდომილება), ფლუკონაზოლის 50 მგ-იანი კაფსულებისთვის იყო 2.05%, 150 მგ-იანი კაფსულებისთვის –1.08% (კრიტერიუმი < 5%). \_ მიღებული შედეგები ადასტურებს კაფსულებში ფლუკონაზოლის განსაზღვრისათვის შერჩეული მეთოდის სისწორეს.

**სწორხაზოვნება** განსაზღვრეთ რეკომენდებულ ინტერვალში (80-120%), აქტიური ნივთიერების 5 კონცენტრაციისათვის (სურ. №3 და №4). სურ.



№3. ფლუკონაზოლის რაოდენობრივი განსაზღვრის გრაფიკი 50 მგ-იანი კაფსულებისთვის



სურ. №4. ფლუკონაზოლის რაოდენობრივი განსაზღვრის გრაფიკი 150 მგ-იანი კაფსულებისთვის

კორელაციის კოეფიციენტი 50 მგ-იანი კაფსულებისთვის არის 0.9974, 150 მგ-იანი კაფსულებისთვის – 0.9968. მეთოდიკა სწორხაზოვანია 40.0 – 60.0 მგ/მლ დიაპაზონში ფლუკონაზოლის 50 მგ-იანი კაფსულებისთვის და 120.0 – 180.0 მგ/მლ დიაპაზონში ფლუკონაზოლის 150 მგ-იანი კაფსულებისთვის.

ამდენად, მიღებული შედეგები და გრაფიკები მიუთითებს ფლუკონაზოლის რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის შერჩეული მეთოდის სწორხაზოვნებაზე.

#### კვლევის შედეგები:

შემუშავებულია აღწარმოებადი, მგრძობიარე, ზუსტი და ეფექტური მაღალი წნევის სითხოვანი ქრომატოგრაფიული მეთოდი კაფსულაში ფლუკონაზოლის რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის;

შერჩეული ქრომატოგრაფიული სისტემა უზრუნველყოფს ფლუკონაზოლის და კაფსულაში შემავალი სხვა კომპონენტების მკაფიო დაყოფას. სამუშაო დღის განმავლობაში მიღებული შედეგების სპეციფიკურობის ვარიაციის კოეფიციენტი შეადგენს 0.12 (CV<2%).

სიზუსტის განსაზღვრისას მიღებული შედეგების მნიშვნელობები ახლოს არის ერთმანეთთან, ფარდობითი სტანდარტული გადახრა ფლუკონაზოლის 50 მგ-იანი კაფსულებისთვის არის 0.22%, 150 მგ-იანი კაფსულებისთვის – 0.99% (N < 2.0%). სისწორე (მეთოდის სისტემატური ცდომილება), ფლუკონაზოლის 50 მგ-იანი კაფსულებისთვის არის 2.05%, 150 მგ-იანი კაფსულებისთვის –1.08% (N<5%). სწორხაზოვნების განსაზღვრისას კორელაციის კოეფიციენტი 50 მგ-იანი კაფსულებისთვის არის 0.9974, 150 მგ-იანი კაფსულებისთვის – 0.9968. მეთოდიკა სწორხაზოვანია 40.0 – 60.0 მგ/მლ დიაპაზონში ფლუკონაზოლის 50 მგ-იანი კაფსულებისთვის და 120.0 – 180.0 მგ/მლ დიაპაზონში ფლუკონაზოლის 150 მგ-იანი კაფსულებისთვის. ამდენად, კაფსულაში ფლუკონაზოლის რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის შემუშავებული მაღალი წნევის სითხოვანი ქრომატოგრაფიული

მეთოდის ვალიდაციის შედეგად დადგინდა მეთოდის სრული შესაბამისობა Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001-ის მოთხოვნებთან შემდეგი ვალიდაციური მახასიათებლების მიხედვით: სპეციფიკურობა, სიზუსტე, სისწორე და სწორხაზოვნება.

#### **ლიტერატურა:**

1. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May, 2001;
2. ICH Q2 A (CPMP/ICH/381/95), Validation of analytical procedure: Methodology, London UK, 1997;
3. USP 38 NF 33

**Baramidze K., Chikviladze T., Tepnadze L., Koberidze N., Jorjikia M.**

#### **VALIDATION HPLC QUANTITATIVE DEFINITION OF FLUCONAZOLE IN CAPSULES TSMU, DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL AND TOXICOLOGICAL CHEMISTRY; "GLOBALTEST", LLC, TESTING LABORATORY**

It was designed reproducible, sensitive and precise High Pressure Liquid Chromatographic (HPLC) method for determination of fluconazole in capsules.

The coefficient of variation specificity is 0.12 (CV<2%). Thus, the specificity of the developed method meets the requirements made to the analytical methods.

The relative standard deviation for 50 mg fluconazole capsules is - 0.22% and for 150 mg capsules - 0.99% (criteria for acceptability of <2.0%). \_

The accuracy (systematic error of an analytical method) for the 50 mg fluconazole capsules is - 2.05 and for 150 mg capsules - 1.08% (acceptability criteria <5.0%).

The correlation coefficient for 50 mg fluconazole capsules is - 0.9974 and for 150 mg capsules is- 0.9968%. The method is linear from 40.0-60.0 mg/ml for 50 mg fluconazole capsules and from 120.0 to-180.0 mg/ml for 150 mg capsules.

Thus, the results received during validation of an analytical method of definition of fluconazole in capsules, have shown full conformity of the developed method to requirements Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001 on the following validation characteristics: Specificity, Accuracy.