

Д. М. Булыга, О. П. Попова, З. И. Кузавва, Д. В. Лопатик\*, Е. Б. Рудаковская

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ТЕСТА “РАСТВОРЕНИЕ” ДЛЯ ТАБЛЕТОК НОВОГО БИСФОСФОНАТА – ПРОДРОНАТА НАТРИЯ

Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220072, Минск, ул. Сурганова, 13.

\* e-mail: aminoacid@ifoch.bas-net.by

Разработана и валидирована методика теста “Растворение” для таблеток нового бисфосфоната — продроната натрия, выполненная в соответствии с общими нормативными требованиями. Растворение проводили на аппарате с вращающимися лопастями со скоростью вращения 50 об/мин. Количество лекарственного вещества, перешедшего в раствор за 45 мин, оценивали методом УФ-спектрофотометрии через образование комплекса с ионами меди с максимумом поглощения при 237 нм.

**Ключевые слова:** валидация; тест “Растворение”; таблетки “Продронат”; спектрофотометрия; комплекс с ионами меди.

Продронат натрия является новым оригинальным лекарственным препаратом, разработанным в Институте физико-органической химии НАН Беларуси. Натрия продронат ( $C_5H_{12}NNaO_7P_2 \cdot H_2O$ ) представляет собой бисфосфоное производное аминокислоты L-пролин, которая содержит в молекуле пирролидиновый гетероцикл [1].

Одним из важнейших критериев качества твердых пероральных лекарственных препаратов (таблетки, драже, капсулы, гранулы) является тест “Растворение” [2, 3].

Тест “Растворение” предназначен для определения количества фармацевтической субстанции, которое в условиях, указанных в частной фармакопейной статье, должно высвободиться в среду растворения из твердой дозированной формы [4 – 6] за определенный промежуток времени.

Испытанию “Растворение” в настоящее время уделяется большое внимание, особенно в процессе контроля качества готовой лекарственной формы. Тест “Растворение” включен во все ведущие фармакопеи, в том числе и в Фармакопею Беларуси [7].

Поскольку продронат натрия является оригинальным лекарственным средством и в литературе нет разработанных методик для количественного определения данного соединения, ранее мы разработали и валидировали спектрофотометрическую методику определения субстанции данного бисфосфоната [8]. Для количественного определения в тесте “Растворение” данная методика была доработана в связи с тем, что доза лекарственного средства достаточно мала и составляет 10 мг.

Целью настоящей работы была разработка и валидация методики теста “Растворение” для таблеток натрия продроната и определение аналитических характеристик: правильность; избирательность; диапазон применения; линейность; повторяемость; внутрилабораторная воспроизводимость (по СТБ 1436-2004).

### *Экспериментальная часть*

В работе использовали образец субстанции продроната натрия, ГНУ “ИФОХ НАН Беларуси”, ФСП РБ1363-16; таблетки “Продронат”, серия 010111, срок годности 2 года, РУП “БЕЛМЕДПРЕПАРАТЫ”; натрия ацетат тригидрат, Aldrich; уксусную кислоту, Aldrich; меди сульфат пентагидрат ГОСТ 4165-78; воду очищенную.

Оптическую плотность регистрировали на УФ-вид спектрофотометре CARY 300, США в кюветах 5 см на фоне растворителя; навески брали на весах аналитических OHAUS AR-0640 США; величину pH контролировали с помощью pH-метра HANNA — HI 221 компании HANNA, Германия; для взятия аликвот использовали пипетки автоматические переменного объема. Для быстрого растворения стандартного образца применяли ультразвуковую ванну Bandelin Sonorex Super, Германия; все образцы перед определением оптической плотности фильтровали через шприцевые фильтры RC 0,45 мкм, 15 мм, AgilentTechnologies, кат. № 5190 – 5109. Для определения “Растворения” использовали автоматизированный прибор EDT-08LX (Индия) с лопастной мешалкой.

**Методика проведения теста.** За основу была взята методика определения теста “Растворение”, изложенная в Государственной фармакопее Республики Беларусь. Среда растворения — дистиллированная вода, объем — 250 мл, температура —  $(37 \pm 1)^\circ C$ , скорость перемешивания — 50 об/мин, время растворения — 45 мин [7]. По сравнению со стандартной процедурой проведения теста “Растворение”, объем среды растворения был уменьшен в 2 раза и составил 250 мл, так как оптическая плотность раствора, полученного после растворения 1 таблетки продроната натрия (10 мг) в стандартном объеме (500 мл), была недостаточной для его определения.

*Приготовление раствора рабочего стандартного образца (PCO) натрия продроната.* Субстанцию натрия продроната (10 мг) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в воде, используя

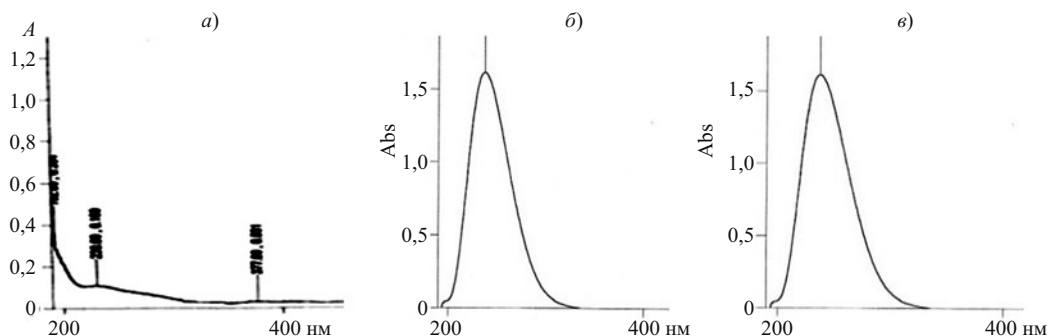


Рис. 1. Спектры оптической плотности: а) вспомогательные вещества и раствор меди; б) комплекс продроната и меди в отсутствие вспомогательных веществ; в) комплекс продроната и меди в присутствии вспомогательных веществ.

обработку в УЗ-ванне в течение 10 мин, доводят до метки этим же растворителем. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с порами 0,45 мкм.

Полученный фильтрат (1 мл) переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 2,4 мл 0,68 г/л раствора натрия ацетата, подкисленного уксусной разведенной кислотой до pH = 5,5, затем после перемешивания добавляют 4 мл 0,62 г/л раствора сернокислой меди и доводят содержимое колбы до метки.

**Приготовление раствора сравнения.** В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 2,4 мл 0,68 г/л раствора натрия ацетата, подкисленного уксусной кислотой до pH = 5,5, затем добавляют 4 мл 0,62 г/л раствора сернокислой меди и доводят содержимое колбы до метки водой.

**Выполнение измерений.** В сосуд для растворения с 250 мл воды при 37 °С помещают 1 таблетку. Через 45 мин отбирают раствор для анализа, 10 мл отфильтрованного через мембранный фильтр с порами 0,45 мкм раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 2,4 мл 0,68 г/л раствора натрия ацетата, подкисленного уксусной кислотой до pH = 5,5. После перемешивания добавляют 4 мл 0,62 г/л раствора сернокислой меди и доводят содержимое колбы до метки.

Содержание активного вещества, высвободившегося в среду растворения, определяли по интенсивности поглощения испытуемого и стандартного растворов относительно раствора сравнения в кювете с толщиной слоя 50 мм при длине волны (237 ± 2) нм. Операцию повторяли, получая не менее 2 значений оптиче-

ской плотности для испытуемого и стандартного растворов.

Для расчетов использовали среднее значение 2 полученных величин поглощения испытуемого раствора и раствора РСО.

Содержание продроната натрия (X), перешедшего в раствор, в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot B}{D_0 \cdot a \cdot 100} \cdot 100,$$

где  $D_1$  — оптическая плотность испытуемого раствора;  $D_0$  — оптическая плотность раствора РСО;  $m_0$  — масса навески РСО, мг;  $B$  — содержание натрия продроната в РСО, указанное в аналитическом паспорте, %;  $a$  — содержание натрия продроната в 1 таблетке, мг.

### Результаты и их обсуждение

#### Валидационные характеристики теста “Растворение”

**Избирательность.** Для определения избирательности готовят модельную смесь плацебо в соответствии с табл. 1.

Для определения избирательности готовили модельную смесь плацебо растворением вспомогательных веществ из расчета на 1 таблетку лекарственного средства (47,0 мг лактозы моногидрата, 62 мг целлюлозы микрокристаллической, 1,0 мг кальция стеарата и 5,0 мг крахмала картофельного). Измеряемый раствор готовили аналогично вышеописанному способу приготовления испытуемого раствора с добавлением вспомогательных веществ. Сравнение спектров раствора плацебо и раствора комплекса продроната с медью (в присутствии вспомогательных веществ и без них) показало, что вспомогательные вещества практи-

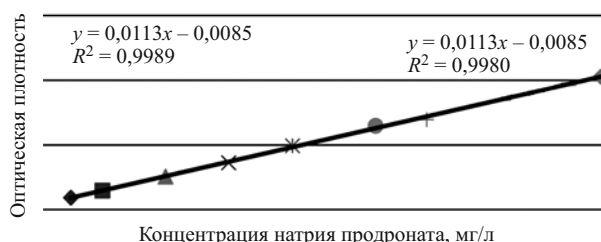


Рис. 2. Зависимость оптической плотности раствора от концентрации натрия продроната.

Таблица 1

Состав вспомогательных веществ в таблетке продроната натрия

Ингредиент	Количество на 1 таблетку, мг
Лактоза моногидрат	47,0
Целлюлоза микрокристаллическая	62,0
Кальция стеарат	1,0
Крахмал картофельный	5,0

## Концентрации натрия продроната для проверки линейности

Показатель	Номер серии									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Навеска продроната натрия, мг	5,4	5,9	6,9	7,9	8,9	10,2	11,0	12,2	13,2	13,7
Концентрация продроната натрия, мг/л	21,7	23,7	27,7	31,6	35,6	40,8	44,0	48,8	52,9	54,9

чески не влияют на поглощение испытуемого раствора (рис. 1). Таким образом, представленная методика испытаний количественного определения является избирательной.

Раствор плацебо не имеет характерных пиков в области поглощения натрия продроната, следовательно, методика испытаний растворения таблеток ЛС “Продронат”, является избирательной (специфичной) по отношению к продронату натрия.

**Линейность и диапазон применения.** Для оценки линейности использовали стандартные растворы продроната натрия с концентрацией, указанной в табл. 2. В мерные колбы вместимостью 25 мл помещают соответствующую навеску продроната натрия, растворяют в воде, используя обработку в УЗ-ванне в течение 15 мин, и доводят до метки этим же растворителем. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с порами 0,45 мкм и проводят количественное определение.

График линейной зависимости оптической плотности раствора от концентрации натрия продроната приведен на рис. 2.

Корректность данной линейной зависимости подтверждается коэффициентом корреляции

$r = \sqrt{R^2} = 0,998 > 0,98$ , что удовлетворяет критерию приемлемости.

Линейность подтверждена в пределах диапазона применения методики определения натрия продроната от 55 до 135 % или от 5,5 до 13,5 мг, что соответствует концентрации натрия продроната в испытуемом растворе 220,0 – 540,0 мг/л.

Статистическая обработка результатов испытаний выполнялась согласно “Государственной фармакопее Республики Беларусь”.

**Правильность.** Для навески, входящей в диапазон применения методики, отношения смещения результатов измерения количественного содержания к абсолютному СКО среднего значения не превышают табличного значения критерия Стьюдента  $t(0,95; 5) = 2,57$ , что удовлетворяет критерию приемлемости.

Установлен предварительный норматив контроля правильности, равный 0,2 %.

**Повторяемость методики.** Относительное стандартное отклонение среднего значения, рассчитанное для содержания продроната натрия, полученное в условиях повторяемости, удовлетворяет критерию приемлемости.

Установлен предварительный норматив контроля повторяемости, равный 1,36 %.

Таблица 3

## Валидационные характеристики теста “Растворение” для таблеток продроната натрия

Испытание пригодности системы	Ср. D	99,71		
	CO	0,319		
	ОСО, %	0,32		
Линейность	$y = 0,011x - 0,008$			
	$R^2 > 0,98$	$r = \sqrt{R^2} = 0,998 > 0,98$		
Правильность	Введено/найдено, % CO ОСО, % $t_{\text{выч}} < t_{\text{табл}}(P, n - 1)$	21,6 мг/л	39,9 мг/л	54,9 мг/л
		99,81	100,38	100,20
		0,163	0,217	0,160
		0,757	0,541	0,291
		0,6 < 2,57	1,69 < 2,57	1,68 < 2,57
Сходимость			аликвота 1	аликвота 2
	Среднее, %		98	99
	CO		0,37	0,048
	ОСО, %		0,44	0,55
	$Q_{\text{выч}} < Q_{\text{табл}}(P, n)$		0,4 < 0,56	0,5 < 0,56
Внутрилабораторная прецизионность			аналитик 1	аналитик 2
	Среднее содержание в таблетке, мг		10,40	10,22
	$F_{\text{выч}} < F_{\text{табл}}(P, n - 1, n - 1)$		1,256 ≤ 6,39	

Примечание: CO — стандартное отклонение значений оптической плотности D; ОСО — относительно стандартное отклонение;  $Q_{\text{выч}}$  — критерий однородности выборки малого объема ( $n < 10$ ), рассчитываемый для крайних вариантов, исходя из величины размаха варьирования ( $R$ );  $Q_{\text{табл}}$  — табличное значение критерия однородности выборки малого объема ( $n < 10$ ), найденное для доверительной вероятности  $P$ ;  $F$  — критерий Фишера.

**Внутрилабораторная воспроизводимость.** Различия значений дисперсий  $S_1^2$  и  $S_2^2$  средних результатов 2 выборок, полученных в условиях внутрилабораторной воспроизводимости при определении содержания продроната натрия в идентичных образцах фармацевтической субстанции, незначимо. Отношение значений дисперсий  $S_{\text{бол}}^2/S_{\text{мен}}^2$  равно 3,86 и не превышает табличного значения коэффициента Фишера  $F_{\text{таб}}(P; f_1; f_2) = 6,39$ .

Различие между 2 средними значениями содержания натрия продроната  $\bar{x}_1$  и  $\bar{x}_2$  незначимо. Рассчитанное значение критерия Стьюдента равно 0,354 и не превышает табличного значения критерия Стьюдента (для  $P = 0,95$  и рассчитанного числа степеней свободы  $f$ )  $t(0,95; f) = 2,31$ .

Внутрилабораторная воспроизводимость методики испытаний растворения лекарственного средства “Натрия продронат, таблетки 10 мг в контурной ячейковой упаковке № 10x3” по проекту ФСП РБ подтверждена.

Установлен предварительный норматив контроля внутрилабораторной воспроизводимости для продроната натрия равный 3,9 %.

Таким образом, валидационные исследования подтверждают специфичность, линейность, прецизионность (сходимость), правильность, диапазон применения предложенной методики.

Методика может быть использована для проведения теста “Растворение” лекарственного средства “Продронат, таблетки 10 мг”.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Патент РБ № 16934, *Бюл. изобрет.*, № 2, 91 (2013).
2. Е. Л. Ковалева, Л. И. Митькина, Н. В. Заинкова и др., *Фармация*, № 7, 3 – 7 (2010).
3. А. А. Свистунов, Г. В. Раменская, И. Е. Шохин, *Ремедиум*, № 11, 79 – 80 (2011).
4. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Rockville, MD: U. S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research (1997).
5. К. С. Давыдова, Ю. И. Кулинич, И. Е. Шохин, *Ремедиум*, № 5, 42 – 50 (2010).
6. Растворение для твердых дозированных лекарственных препаратов, *Государственная фармакопея Российской Федерации*, XII изд., Том 2, Москва (2010).
7. Тест “Растворение для твердых дозированных форм”, *Государственная фармакопея Республики Беларусь*, II изд., Том 2, Издательство Минздрава Республики Беларусь, Минск (2010).
8. Д. М. Булыга, О. П. Попова, З. И. Куваева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **53**(9), 52 – 56 (2019); *Pharm. Chem. J.*, **53**(9), 871 – 875 (2019).

Поступила 11.01.17

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE DISSOLUTION TEST PROCEDURE FOR TABLETS OF SODIUM PRODRONATE

D. M. Bulyga, O. P. Popova, Z. I. Kuvayeva, D. V. Lopatik, and E. B. Rudakovskaya

Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220072 Belarus; e-mail: aminoacid@ifoch.bas-net.by

A procedure of the dissolution test for tablets of sodium prodrionate – a new bisphosphonate – was developed according to the general standard requirements and validated. The dissolution was carried out in a device with rotating blades at a rotation speed of 50 rpm. The amount of a test medicine that passed into solution for 45 min was estimated by UV spectrophotometry method based on the formation of a complex with copper ions monitored using an absorption maximum at 237 nm.

**Keywords:** pharmacopoeial dissolution test; validation; tablets; sodium prodrionate; complex with copper ions; spectrophotometry.