

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРАВИЛЬНОСТИ И ПРЕЦИЗИОННОСТИ МЕТОДИКИ АНАЛИЗА МЕЛЬДОНИЯ И ХОЛИНА АЛЬФОСЦЕРАТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНТРОЛЬНЫХ КАРТ ШУХАРТА

Гаврилин М. В., Мудрецова Ю. В.

Пятигорский филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет Минздрава России», Пятигорск, Россия (357532, Пятигорск, ул. Кирова, 33), e-mail: farmnauka@mail.ru

Метрологическая оценка разрабатываемых методик анализа веществ является одним из наиболее важных этапов фармацевтического анализа. Целью данного исследования было определение робастности (устойчивости результатов) методики количественного определения мельдония и холина альфосцерата при их совместном присутствии в пробе с помощью контрольных карт Шухарта. В ходе исследования были определены численные диапазоны робастности методики, которые составляют интервал от 98.1 до 101.9 % для мельдония и от 99 до 102 % для холина альфосцерата, что говорит об отсутствии значимого влияния «случайных» факторов (таких как температура, давление, влажность, освещенность и т.п.) на результаты. То есть, при соблюдении условий, предписанных методикой, результаты количественного определения мельдония и холина альфосцерата будут достоверными.

Ключевые слова: мельдоний, холина альфосцерат, капиллярный электрофорез, мицеллярная электрокинетическая хроматография, валидационный анализ, стабильность, прецизионность, карты Шухарта.

STABILITY DETERMINATION OF ACCURACY AND PRECISION RATES OF THE MILDRONATE AND CHOLINE ALPHOSCERATE QUANTITATIVE DETERMINATION TECHNIQUE WITH SHUCHART'S CONTROL CARDS

Gavrilin M. V., Mudretsova Y. V.

Pyatigorsk department of a Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia (357532, Pyatigorsk, street Kirova, 33), e-mail: farmnauka@mail.ru

The metrological estimation of developed substances analysis techniques is one of the most important stage of the pharmaceutical analysis. Robustness determination (results stability) of the quantitative determination of mildronate and choline alphoscerate at their combine presence technique with Shuchart's control cards was purpose of this research. During research numerical ranges of a technique robustness were obtained. It makes an interval from 98.1 to 101.9 % for a mildronate and from 99 to 102 % for choline alphoscerate that speaks about absence of significant influence of "casual" factors, (such as temperature, pressure, humidity, illumination, etc.) on the results. Thus, at observance of the conditions ordered by a technique, results of mildronate and choline alphoscerate quantitative determination will be reliable.

Keywords: mildronate, choline alphoscerate, capillary electrophoresis, micellary electrokinetic chromatography, validation, stability, precision, Shuchart's cards.

Введение

Цереброваскулярные заболевания в настоящее время занимают лидирующее место среди различных причин смертности и инвалидизации населения. Таким образом, их профилактика и лечение являются проблемами чрезвычайной медицинской и социальной значимости. С этой целью ведутся работы по созданию комбинированных препаратов, содержащих мельдоний и холина альфосцерат. Оба вещества довольно близки по структуре (относятся к четвертичным аммониевым основаниям и являются цвиттер-ионами) и не содержат в своей структуре хромофоров, обеспечивающих возможности детектирования в УФ области. Для количественного определения подобных веществ в мировой практике применяются различные методы, например, метод экстракционной фотометрии [1], который

из-за недостаточной селективности не применим в данном случае. Более целесообразным является использование метода капиллярного электрофореза [2], который позволяет анализировать различные соединения, в том числе и не поглощающие в УФ области, используя режим косвенного детектирования. Для этого в состав ведущего электролита вводят поглощающее при 254 нм вещество – кислоту ацетилсалициловую в концентрации 30 мМ, которая обеспечивает необходимую оптическую плотность исходного электролита [6].

Также отмечается рост актуальности метрологической оценки разработанных методик количественного определения лекарственных веществ, необходимых для дальнейшего производства лекарственных препаратов, поскольку валидационный анализ ранее разработанных и новых способов контроля качества лекарств является обязательным и законодательно закрепленным в настоящее время как в России, так и за рубежом [5,8,9,10]. Для применяемых аналитических методик существует ряд таких валидационных характеристик, как линейность, специфичность, точность, правильность, прецизионность, диапазон применения и робастность.

Особый интерес вызывает определение робастности методики, поскольку в имеющихся литературных данных отсутствует единый подход к ее оценке [4].

Термин "робастность" (*robustness*) образован от английского *robust* – крепкий, грубый. Таким образом, подразумевается, что робастные аналитические методы должны "выдерживать" ошибки, способные попадать в исходные данные или искажать результаты анализа. То есть любая рекомендуемая для практического использования методика должна быть исследована *на устойчивость* относительно допустимых отклонений исходных данных. Робастной можно считать методику, для которой изменение тех или иных условий выполнения не приведет к изменению ранее полученных валидационных показателей. Эта процедура необходима при разработке новых методик и применяется достаточно редко.

Основными параметрами, влияние которых на результаты анализов следует изучать для методик количественного определения веществ методом капиллярного электрофореза, являются: состав ведущего электролита, его рН, величина прикладываемого напряжения, длина волны и т.п. Эти параметры также можно назвать контролируруемыми. Однако в данном случае речь идет скорее о выборе условий анализа, чем об оценке робастности. Существуют также факторы, влияние которых на результаты анализа не поддается контролю. Это так называемые «случайные» факторы (температура окружающей среды, влажность, освещенность, давление и т.п.).

Цель исследования

Для оценки некоторых ВЭЖХ-методик ранее был использован методический подход к оценке робастности, основанный на использовании концепции контрольных карт Шухарта. Таким образом, целью данного исследования стало изучение робастности разработанной методики количественного определения мельдония и холина альфосцерата методом мицеллярной электрокинетической хроматографии с использованием косвенного детектирования [6]. Исследование проводили, используя контрольные карты Шухарта [3].

Материал и методы исследования

Карта Шухарта – это график значений определенных характеристик подгрупп в зависимости от их номеров. Она имеет *центральную линию (CL)*, соответствующую эталонному значению характеристики, и две статистически определяемые контрольные границы относительно центральной линии, которые называются *верхней контрольной границей (UCL)* и *нижней контрольной границей (LCL)*.

Контрольные границы на карте Шухарта находятся на расстоянии 3σ от центральной линии, где σ – *генеральное стандартное отклонение используемой статистики*. Для получения оценки σ вычисляют стандартное отклонение подгруппы (формула (1)) или умножают размах подгруппы на соответствующий коэффициент (табл. 1).

Таблица 1. Коэффициенты для вычисления линий контрольных карт

Число наблюдений в подгруппе	Коэффициенты для вычисления контрольных границ			
	d_2	D_1	D_2	A
2	1.128	0.000	3.686	2.121
3	1.693	0.000	4.358	1.732
4	2.059	0.000	4.696	1.500
5	2.326	0.000	4.918	1.342

Иногда σ является заданной величиной, например, стандартным отклонением прецизионности, полученным на основании результатов валидации методики.

$$\sigma = SD = \sqrt{\frac{\sum_i^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

(1)

Контрольные карты Шухарта бывают двух основных типов: для количественных и альтернативных данных. В представленной работе использовались карты для количественных данных. Они отражают состояние результатов анализа через разброс (от единицы к единице) и через расположение центра (среднее значение). Поэтому контрольные карты для количественных данных целесообразно применять и анализировать парами. Наиболее часто используют пару \bar{X} - и R – карты.

Размах подгруппы (R) – разность наибольшего и наименьшего значений в подгруппе.

Среднее подгруппы (\bar{X}) – среднее значение измеряемой характеристики качества (X):

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

(2)

Для каждой контрольной карты встречается две ситуации: стандартные значения заданы и стандартные значения не заданы.

Стандартные значения – значения, установленные в соответствии с некоторыми требованиями и целями.

Целью контрольных карт при наличии заданных стандартных значений является определение того, отличаются ли наблюдаемые значения R , \bar{X} для нескольких подгрупп от соответствующих стандартных значений больше, чем можно ожидать при действии только случайных причин. Контрольные линии для этих карт вычисляются с использованием формул и коэффициентов, представленных в таблицах 1–2.

Таблица 2. Формулы контрольных границ для карт Шухарта с использованием количественных данных

Тип карты	Центральная линия (CL)	Контрольные границы	
		$UCL = D_2 \sigma_0$	$UCL = D_1 \sigma_0$
R – карты	R_0 или $d_2 \sigma_0$	$UCL = D_2 \sigma_0$	$UCL = D_1 \sigma_0$
X – карты	X_0 или μ	$X_0 + A \cdot \sigma_0$	$X_0 - A \cdot \sigma_0$
Заданы стандартные значения X_0 или μ , R_0 , σ_0 .			

Для выполнения эксперимента каждый день готовили по две модельные смеси с точно известным содержанием холина альфосцерата и мельдония.

Поскольку в растворах мельдоний и холина альфосцерат находятся в соотношении 1:2,5 (концентрации мельдония и холина альфосцерата составляют 100 мг/мл и 250 мг/мл соответственно) нами были приготовлены 2 раствора мельдония и холина альфосцерата в концентрациях 4 мг/мл и 10 мг/мл соответственно. Полученные растворы фильтровали через фильтры диаметром 0,2 мкм и центрифугировали в течение 5 минут при 7000 мин⁻¹ и анализировали в условиях, описанных в [6].

Результаты исследования и их обсуждение

Предложенная методика была валидирована, оценены значения RSD прецизионности и точности, равные 0.88 % для мельдония и 0.96 % для холина альфосцерата. Применяя метод контрольных карт Шухарта (R – карт) к результатам измерений, была проверена их стабильность и оценено стандартное отклонение прецизионности методики.

Расчеты значений средней линии и контрольных пределов проводили по формулам, представленным в таблице 2, с учетом коэффициентов, представленных в таблице 1.

Поскольку в данном случае заранее заданы значения относительного стандартного отклонения прецизионности ($\sigma_0 = RSD = 0.88$), полученное в результате валидации методики количественного определения мельдония и ($\sigma_0 = RSD = 0.96$), полученное в результате валидации методики количественного определения холина альфосцерата, параметры контрольных карт размахов рассчитывают способом, описанным в таблице 3.

Таблица 3. Контрольные границы карты размахов при оценке стабильности показателя прецизионности методики анализа мельдония и холина альфосцерата методом капиллярного электрофореза.

Центральная линия (CL)	Анализируемое вещество	Предел действия	
		$UCL = D_2 \sigma_0$	LCL
$d_2 \sigma_0 = 1,128 \times 0,88 = 0,99$	мельдоний	$UCL = D_2 \sigma_0 = 0,88 \times 3,686 = 3,2$	LCL -отсутствует
$d_2 \sigma_0 = 1,128 \times 0,96 = 1,08$	холина альфосцерат	$UCL = D_2 \sigma_0 = 0,96 \times 3,686 = 3,5$	LCL -отсутствует

Используя полученные данные, строили карты размахов, представленные на рисунках 1 и 2.

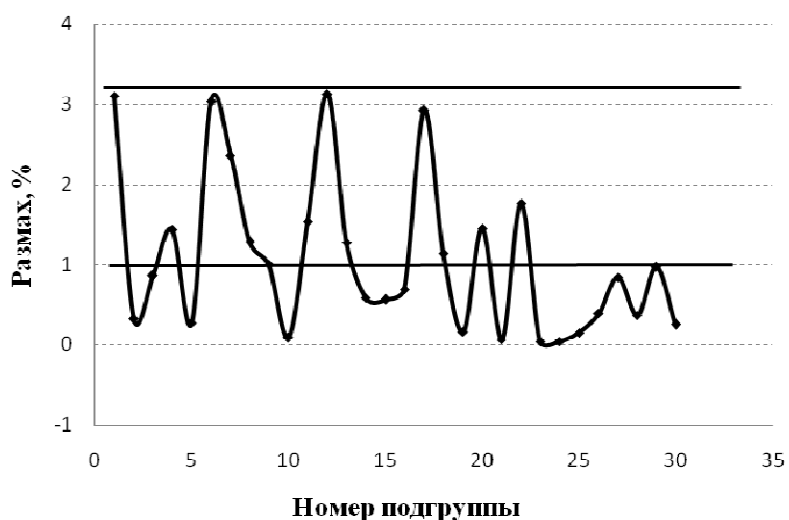


Рисунок 1. Контрольная карта размахов для содержания мельдония в модельной смеси

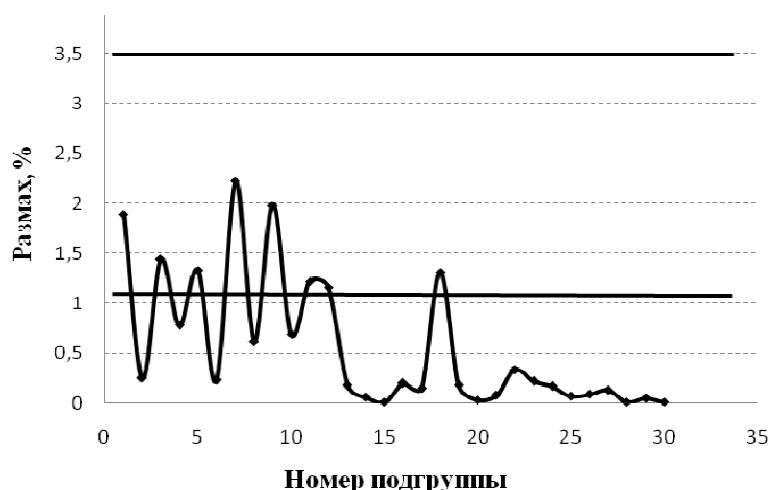


Рисунок 2. Контрольная карта размахов для содержания холина альфосцерата в модельной смеси

Карты, представленные на рисунках 1 и 2, свидетельствуют о том, что разность между значениями открываемости мельдония и холина альфосцерата при анализе модельных смесей однородна в течение длительного времени. Это позволяет говорить о стабильных показателях прецизионности данной методики при одинаковых условиях анализа и исключить влияние «случайных» факторов на результаты. Контрольные границы, рассчитанные для карт, являются критерием статистической значимости полученных размахов. То есть, можно сказать, что разница между двумя значениями открываемости мельдония и холина альфосцерата, полученных в результате двух параллельных определений, статистически не значима, если она не превышает 3.2 и 3.5 % соответственно.

Для изучения изменений показателей точности методики количественного определения мельдония и холина альфосцерата строили карты средних значений, контрольные линии которых приведены в таблице 4.

Таблица 4. Контрольные границы карты средних значений, вычисленные для оценки стабильности показателя точности методики количественного определения мельдония и холина альфосцерата методом капиллярного электрофореза.

Тип карты	Центральная линия(CL)	Анализируемое вещество	Контрольные линии	
			UCL	LCL
\bar{X} - карта	$X_0 = 100\%$	мельдоний	$100+2.121 \cdot 0.88=101.87$	$100-2.121 \cdot 0.95=98.13$
		холина альфосцерат	$100+2.121 \cdot 0.96=102.04$	$100-2.121 \cdot 0.96=97.96$

В данном случае заранее задано относительное стандартное отклонение точности ($\sigma_0 = RSD=0.88$). Параметры контрольной карты средних значений рассчитывали исходя из

того, что истинное содержание вещества в препарате составляет 100 %. Карты, построенные с использованием показанных данных, представлены на рисунках 3 и 4.

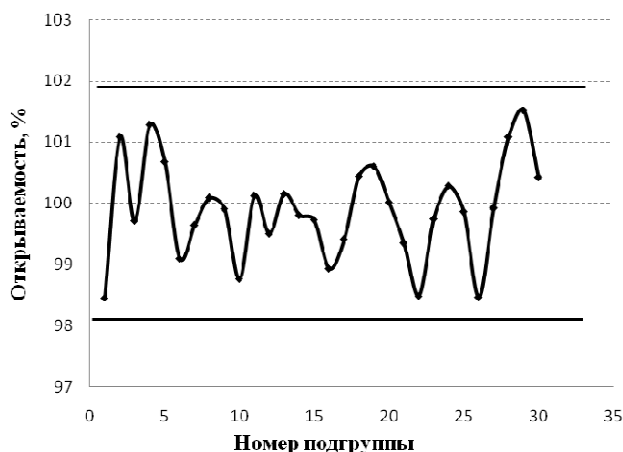


Рисунок 3. Контрольная карта средних значений открываемости мелдония в модельной смеси.

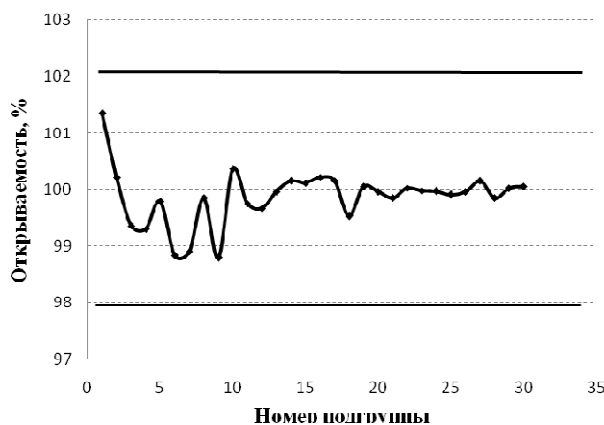


Рисунок 4. Контрольная карта средних значений открываемости холина альфосцерата в модельной смеси.

Представленные рисунки дополняют картину, полученную при построении карт размахов (R – карт). Они показывают, насколько близки полученные результаты к истинному значению. Как видно из представленных рисунков, разброс средних значений открываемости однороден, ни одна из точек не выходит за пределы контрольных границ, и все они расположены равномерно относительно центральной линии. Это говорит о стабильности показателя точности. Контрольные границы, рассчитанные для данных карт, являются допустимыми границами открываемости методики, которые составляют интервал от 98.1 до 101.9 % для мелдония и 99 до 102 % для холина альфосцерата.

Выводы

Таким образом, текущие контрольные карты показывают отсутствие статистически значимых разбросов между показателями открываемости и стабильность его среднего значения в течение длительного периода. Это говорит об отсутствии значимого влияния «случайных» факторов (таких как температура, давление, влажность, освещенность и т.п.) на

результаты. То есть при соблюдении условий, предписанных методикой, результаты количественного определения мельдония и холина альфосцерата будут достоверными. Установлено, что методика количественного анализа мельдония и холина альфосцерата в растворе при изменяющемся факторе «время» робастна. То есть метрологические характеристики методики устойчивы под влиянием «случайных», неконтролируемых факторов окружающей среды.

Рассчитанные на основании имеющихся валидационных характеристик контрольные границы для \bar{X} и R карт (таблицы 3–4) можно считать численными диапазонами робастности методики.

Список литературы

1. Гаврилин М. В., Благоразумная Н. В., Дуккардт Л. Н., Благоразумная Е. Ю. Экстракционно-фотометрическое определение триметилоктадецил аммония бромид в препарате «Бактерицид» // Фармация. – 2012. – № 6. – С. 7-9.
2. Гаврилин М. В., Сенченко С. П. Анализ коричных кислот в растительных объектах методом капиллярного электрофореза // Фармация. – 2012. – № 5. – С. 14-17.
3. ГОСТ Р 50779.42-99 (ИСО 8258-91) Контрольные карты Шухарта. – М.: Госстандарт России, 1999. – 38 с.
4. ГОСТ Р 8.563-96 ГСИ. Методики выполнения измерений. – М.: Изд-во стандартов, 1996. – 23 с.
5. Государственная Фармакопея Российской Федерации: Ч. 1. / 12 –е изд. – М.: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008. – 704 с.
6. Гаврилин М. В., Мудрецова Ю. В., Сенченко С. П., Рожнова С. А. Разработка методики количественного определения холина альфосцерата и мельдония методом капиллярного электрофореза // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2012. – № 4. – С.1-16.
7. Сенченко С. П., Печенова А. В. ВЭЖХ и капиллярный электрофорез в анализе кемпферола в представителях семейства капустные // Фармация. – 2010. – №1. – С. 5-8.
8. Фомин А. Н., Хомов Ю. А., Джурко Ю. А. Разработка и валидация методики определения артикаина в моче капиллярным электрофорезом («Капель – 105») // Современные проблемы науки и образования: Интернет-журнал. – URL: <http://www.science-education.ru/105-r6757> (дата обращения 24.10.2012).
9. ICH Q2B / Validation of analytical procedure: Methodology // International Conference for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. – Geneva, 1996. – 75 с.
10. United States Pharmacopoeia. – Washington, 2000. – Vol. 24. – P. 2149-2152.

Рецензенты:

Лазарян Д. С., доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой токсикологической химии Пятигорского филиала ГБОУ ВПО Волг ГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.

Вергейчик Е. Н., доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической химии Пятигорского филиала ГБОУ ВПО Волг ГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.