



А.А. Турундаева ✉ 
Е.А. Мамашина 
С.И. Кулешова 
С.Е. Григорьева 
А.А. Рыжова 

Метрологическая оценка методик определения воды полумикрометодом и микроопределением в лекарственной форме «Лиофилизаты»

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Турундаева Анна Алексеевна; turundaeva@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Метрологическая оценка методик позволяет выбрать способ проведения испытаний с целью получения достоверных и корректных результатов. Это особенно актуально в тех случаях, когда оценку качества лекарственного средства по конкретному показателю допускается выполнять разными способами. Например содержание воды в лекарственной форме «Лиофилизаты» в соответствии с фармакопейными требованиями определяют титрованием по К. Фишеру полумикрометодом (волюметрическое титрование), кулонометрическим титрованием (микроопределение) и потерей в массе при высушивании.

ЦЕЛЬ. Оценка взаимосвязи между выбором метода и полученным результатом определения содержания воды в лекарственной форме «Лиофилизаты» при помощи дисперсионного анализа ANOVA, а также оценка неопределенности результатов измерений при определении данного показателя титрованием по К. Фишеру.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Показатель «Вода» определяли в образце лиофилизата «Микафунгин» с использованием методов, регламентированных статьей Фармакопеи Евразийского экономического союза 2.5.1.14 «Лиофилизаты»: титрование по К. Фишеру полумикрометодом, микроопределением и дополнительно проводили определение потери в массе при высушивании. Оценку влияния метода на результаты анализа проводили дисперсионным анализом ANOVA с использованием программы Microsoft Excel. Статистическая обработка результатов эксперимента включала: сравнение воспроизводимости с использованием критерия Фишера, сравнение средних результатов, полученных двумя разными методами, с использованием критерия Стьюдента. Для оценки неопределенности измерений рассчитывали граничные значения доверительных интервалов с уровнем доверительной вероятности 0,95 и 0,99.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Дисперсионным анализом ANOVA было показано, что способ определения содержания воды в лиофилизатах оказывает влияние на полученный результат. Установлено, что методы титрования по К. Фишеру, полумикрометод и микроопределение позволяют получить воспроизводимые результаты, так как для четырех серий лиофилизата вычисленный критерий Фишера ($F_1=2,3440$; $F_2=1,0762$; $F_3=3,5302$; $F_4=1,0989$) меньше критического значения $F_{кр}(0,95; 2; 2)=19,000$. Полученные разными методами средние результаты не равны, так как вычисленный критерий Стьюдента ($t_1=9,2391$; $t_2=11,4847$; $t_3=11,0041$; $t_4=33,6502$) больше критического значения $t_{кр}(0,95; 2) = 4,3027$. Для оценки степени неопределенности полученных результатов рассчитаны граничные значения доверительных интервалов по критерию Стьюдента с доверительной вероятностью 0,95 и 0,99 для двустороннего интервала. Неопределенность измерений при определении воды полумикрометодом меньше неопределенности, полученной при микроопределении данного показателя.

ВЫВОДЫ. Результат определения содержания воды в лиофилизате «Микафунгин» зависит от выбранного метода определения. Потеря в массе при высушивании не применяется для оценки содержания воды в изучаемых лекарственных средствах. Способы определения воды полумикрометодом и микроопределением для лиофилизатов «Микафунгин» не являются альтернативными. Необходимо дополнительное исследование для оценки смещения и его учета в суммарной неопределенности измерений.

Ключевые слова: определение воды по К. Фишеру; полумикрометод; волюметрическое титрование; микроопределение; кулонометрическое титрование; лиофилизат; лекарственные средства; липопептид

Для цитирования: Турундаева А.А., Мамашина Е.А., Кулешова С.И., Григорьева С.Е., Рыжова А.А. Метрологическая оценка методик определения воды полумикрометодом и микроопределением в лекарственной форме «Ллиофилизаты». *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(4):474–482. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-4-474-482>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022300127-0)

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Anna A. Turundaeva ✉ 
Ermonia A. Mamashina 
Svetlana I. Kuleshova 
Svetlana E. Grigorieva 
Anastasia A. Ryzhova 

Metrological Assessment of Analytical Procedures Used for Semi-micro and Micro Determination of Water in Lyophilisates

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Anna A. Turundaeva; turundaeva@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The metrological characterisation of analytical procedures helps in selecting a procedure that will provide reliable and consistent results. This is particularly relevant in cases where a pharmacopoeial standard includes several test methods for a quality parameter of a medicinal product. For example, the water content of a lyophilisate can be measured by volumetric or coulometric Karl Fischer titration (semi-micro and micro determination) and by the loss on drying.

AIM. This study aimed to investigate the correlation between the method selected for the determination of water content in a lyophilisate and the results obtained by this method via analysis of variance (ANOVA), as well as to evaluate the uncertainty of water content measurements by Karl Fischer titration.

MATERIALS AND METHODS. The study focused on a lyophilised micafungin medicinal product. The water content in the lyophilisate samples was measured by Karl Fischer titration (semi-micro and micro determination) and, additionally, by the loss on drying as outlined in the Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union (General Monograph 2.5.1.14 Lyophilisates). The authors performed ANOVA using Microsoft Excel to assess the effect of the test method on the results. The authors conducted statistical analysis of the experimental results, including Fisher's test to assess the reproducibility and Student's test to compare the mean results obtained by two different methods. To assess measurement uncertainty, the authors calculated confidence interval limits at confidence levels of 0.95 and 0.99.

RESULTS. ANOVA demonstrated that the method selected to determine the lyophilisate water content had an effect on the results obtained. Karl Fischer titration (semi-micro and micro determination) provided reproducible results; the F -values calculated for four lyophilisate batches ($F_1=2.3440$, $F_2=1.0762$, $F_3=3.5302$, and $F_4=1.0989$) were lower than the critical F -value ($F_{crit}(0.95;2;2)=19.000$). The mean results of different methods were statistically dissimilar; the calculated t -values ($t_1=9.2391$, $t_2=11.4847$, $t_3=11.0041$, and $t_4=33.6502$) exceeded the critical t -value ($t_{crit}(0.95;2)=4.3027$). To assess the measurement uncertainty, the authors calculated two-sided confidence interval limits using Student's test at confidence levels

of 0.95 and 0.99. The measurement uncertainty of the semi-micro method was lower than that of the micro method.

CONCLUSIONS. The results of water determination in the micafungin lyophilisate depend on the method used. Micafungin water content is not commonly quantified by the loss on drying, and the methods of semi-micro and micro determination are not interchangeable for this purpose. Further studies are required to estimate bias and include the estimate in the measurement uncertainty budget.

Keywords: Karl Fischer titration; semi-micro determination; volumetric titration; micro determination; coulometric titration; lyophilisate; medicines; lypopeptide

For citation: Turundaeva A.A., Mamashina E.A., Kuleshova S.I., Grigorieva S.E., Ryzhova A.A. Metrological assessment of analytical procedures used for semi-micro and micro determination of water in lyophilisates. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(4):474–482. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-4-474-482>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022300127-0)

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Определение содержания воды является обязательным показателем при контроле качества лиофилизатов. Превышение содержания воды в лекарственной форме может оказать негативное влияние на физико-химические свойства лиофилизата, биодоступность действующего вещества (веществ), стабильность лиофилизата¹, привести к гидролизу действующих веществ или образованию примесей, которые могут оказывать влияние на терапевтическую эффективность лекарственного средства.

Поскольку вода в лиофилизатах может присутствовать в различных формах, количественное определение остаточной влажности должно быть точным, прецизионным и предпочтительно селективным. Количественное содержание остаточной влаги в лиофилизате может быть определено с помощью различных методов. Важно, чтобы метод, используемый для определения остаточной влажности, соответствовал изучаемому готовому продукту, количеству и состоянию присутствующей воды². В настоящее время наиболее часто для определения остаточной влажности используют: определение потери в массе при высушивании, титрование по методу Карла Фишера, термогравиметрический анализ и метод спектрометрии в ближней инфракрасной области.

В нормативную документацию на лиофилизаты включают следующие методы определения воды: потеря в массе при высушивании,

титрование по К. Фишеру полумикрометодом (волюметрическое титрование) и микроопределение (кулометрическое титрование). Учитывая разные подходы к оценке остаточной влажности в лиофилизатах, выбранный метод должен быть метрологически обоснованным и статистически достоверным. Это особенно важно, если для аналогичных лекарственных препаратов разных производителей предусмотрены различные методы контроля качества по показателю «Вода». В некоторых нормативных документах производителей эти методы указаны как альтернативные.

Физический метод оценки остаточной влажности (показатель качества «Потеря в массе при высушивании») в лиофилизатах широко применяется из-за универсальности и простоты выполнения анализа без использования сложного оборудования [1]. При этом метод является неселективным по отношению к воде, так как при нагревании испаряются летучие примеси и остаточные органические растворители.

Определение воды по методу К. Фишера основано на количественной реакции воды с серы диоксидом и йодом в подходящей безводной среде в присутствии основания с достаточной буферной емкостью³. Определение полумикрометодом (волюметрическое титрование) проводят путем титрования испытуемого образца в метаноле или ином растворителе реактивом К. Фишера. Реактив К. Фишера содержит йод, диоксид серы, амин (как правило, пиридин

¹ ОФС 2.5.1.14 Лиофилизаты. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. I, ч. 2. М.; 2023.

ОФС.1.4.1.0031 Лиофилизаты. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

² <https://www.pharmtech.com/view/residual-moisture-testing-methods-lyophilized-drug-products>

³ ОФС 2.1.5.12 Вода: определение полумикрометодом. Фармакопея Евразийского экономического союза. Т. I, ч. 1. М.; 2020. ОФС 2.1.5.13 Вода: микроопределение. Фармакопея Евразийского экономического союза Т. I, ч. 1. М.; 2020.

или имидазол) и неводный растворитель, в котором йод и диоксид серы быстро и количественно поглощаются водой, содержащейся в образце.

В случае микроопределения воды (кулонометрическое титрование) йод получают электрохимическим способом в результате анодного окисления йодид-иона в кулонометрической ячейке. Образующийся йод расходуется на реакцию до тех пор, пока в среде находится вода. Конечной точкой титрования служит возникновение избытка йода в среде, фиксируемое потенциометрически [2].

Цель работы – оценить влияние выбора метода на результат определения содержания воды в лекарственной форме «Лиофилизаты» на примере образца лекарственного средства «Микафунгин, лиофилизат для приготовления раствора для инфузий».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования был выбран лиофилизат для приготовления раствора для инфузий «Микафунгин», действующее вещество которого представляет собой полусинтетический липопептид, получаемый путем химической модификации продуктов жизнедеятельности плесневого гриба *Coleophoma impetri* (Rostr.), являющегося патогеном растений. В структуре липопептида присутствуют гидрофобные цепи жирных кислот и гидрофильные пептиды. В настоящее время применяется для лечения инвазивного кандидоза⁴.

Содержание остаточных органических растворителей в лиофилизате для приготовления раствора для инфузий «Микафунгин» не нормируется, норма содержания воды в данных образцах варьируется производителями от «не более 1,5%» до «не более 3%». Все исследуемые объекты упакованы во флаконы первого гидролитического класса, закупорены пробкой резиновой, обжаты алюминиевым колпачком с пластиковой крышкой. Для проведения исследования были использованы образцы с действующим сроком годности. Учитывая наличие в структуре вещества гидрофильного компонента, а также на основании имеющихся данных по изучению стабильности можно предположить, что содержание воды в лиофилизате с течением времени может незначительно (в пределах 0,1%) увеличиваться в процессе хранения. Для нивелирования влияния фактора времени на увеличение содержания

остаточной влажности в лиофилизате все сравнительные испытания объектов проводили параллельно.

Для принятия решения о возможной взаимозаменяемости методов анализа проведена оценка содержания воды в образце лиофилизата «Микафунгин» тремя разными методами: титрование по К. Фишеру полумикрометодом (волюметрическое титрование), микроопределение (кулонометрическое титрование) и определение потери в массе при высушивании. Титрование проводили на титраторах C30 Mettler Toledo (универсальный кулонометрический титратор) и Metrohm 787 KF Titrino. Для оценки потери в массе при высушивании образец высушивали при температуре 105 °С до постоянной массы. Каждый эксперимент проводили в трех повторностях, находили среднее значение результатов в каждой группе и объединенный средний результат всех полученных значений. Далее выполняли дисперсионный анализ ANOVA и апостериорные множественные сравнения с использованием критерия Тьюки, расчеты проводили в программе Microsoft Excel.

Для изучения подходов производителей к определению содержания воды в лиофилизатах проведен анализ проектов нормативных документов на препараты, содержащие микафунгин, поступивших в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России на этапе регистрации лекарственного средства с 2020 по 2024 г.

Для сравнения результатов и оценки неопределенности измерений содержание воды полумикрометодом и микроопределением определяли в образцах лиофилизатов с микафунгином разных производителей. Для этого выполнили серии из трех параллельных измерений для четырех различных образцов в одинаковых условиях. В соответствии с методиками, представленными производителями препаратов, определение воды полумикрометодом проводили из точной навески препарата 0,5 г, а определение воды микроопределением проводили непосредственно из флакона. В растворителе (метанол) перед проведением анализа также определяли содержание воды, которое учитывали в окончательных расчетах.

Для интерпретации результатов эксперимента выполняли статистическую обработку данных в соответствии с фармакопейными требованиями⁵.

⁴ <https://grls.rosminzdrav.ru>

⁵ ОФС.1.1.0013 Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен анализ содержания воды в одном образце лиофилизата тремя разными методами. Исходя из предположения, что полученные результаты содержания воды в лиофилизате принадлежат одной генеральной совокупности, за нулевую гипотезу принято утверждение, что на результат определения содержания воды методика определения не оказывает влияния. Чтобы принять или отвергнуть данную гипотезу, определено соотношение межгрупповой дисперсии к внутригрупповой дисперсии. В качестве показателя изменчивости использовали сумму квадратов отклонения значений содержания воды в образце от объединенного среднего. Общая сумма квадратов состояла из межгрупповой суммы квадратов и внутригрупповой суммы квадратов. Значение критерия Фишера вычислено на основании значений средних квадратов отклонений внутри групп и между ними и числом степеней свободы 2 между

группами и 6 внутри групп⁶. Найденное значение критерия Фишера было больше критического при заданном количестве наблюдений и количестве групп при уровне доверительной вероятности 0,95. Следовательно, нулевая гипотеза должна быть отвергнута, выбор методики определения оказывает влияние на полученный результат. Результаты определения содержания воды в лиофилизате «Микафунгин» разными методами с однофакторным дисперсионным анализом ANOVA представлены в *таблицах 1 и 2*.

Проведены апостериорные множественные сравнения с использованием критерия Тьюки (Q) для определения статистических различий между результатами, полученными тремя разными методами. Для этого вычислена абсолютная разность между парами средних значений, полученных с использованием разных методов для определения содержания воды в образце. По данным объединенной средней дисперсии

Таблица 1. Результаты определения содержания воды в лиофилизате «Микафунгин» разными методами

Table 1. Results of water determination in the Micafungin lyophilisate by different test methods

Номер параллельной пробы <i>Replicate sample No.</i>	Содержание воды в лиофилизате, % <i>Water content in lyophilisate, %</i>		
	Потеря в массе при высушивании <i>Loss on drying</i>	Волюметрия <i>Volumetric titration</i>	Кулонометрия <i>Coulometric titration</i>
1	0,330	1,067	0,500
2	0,200	1,035	0,520
3	0,310	1,069	0,540
Среднее значение <i>Mean</i>	0,280	1,057	0,520
Объединенное среднее значение <i>Grand mean</i>	0,619		

Таблица 2. Результаты однофакторного дисперсионного анализа

Table 2. Results of one-way analysis of variance

Источник вариации <i>Source of variation</i>	Сумма квадратов (SS) <i>Sum of squares</i>	Число степеней свободы (df) <i>Degrees of freedom</i>	Средние квадраты отклонений (MS) <i>Mean squares</i>	Критерий Фишера (F) <i>Fisher's test</i>	F критическое (доверительная вероятность 0,95) <i>Critical F-value (confidence level of 0.95)</i>
Отклонение между группами <i>Between-group variation</i>	0,9497	2	0,4748	251,5090	5,1433
Отклонение внутри групп <i>Within-group variation</i>	0,0113	6	0,0019	–	–
Итого <i>Total</i>	0,9610	8	–	–	–

Примечание. «–» – не применимо.

Note. –, not applicable.

⁶ <https://researchmethod.net/anova/>

и размера выборки z для каждой группы вычислено критическое значение критерия $Q_{кр}$ ⁷. Абсолютная разность между всеми парами средних значений была больше $Q_{кр}$. Следовательно, разница в средних значениях между результатами, полученными тремя разными методами, статистически значима. Апостериорное сравнение результатов определения воды разными методами проведено с использованием критерия Тьюки (табл. 3).

Так как между всеми группами были выявлены статистически значимые различия, необходимо дальнейшее проведение исследования с использованием дополнительных источников информации.

Проведен анализ 20 проектов нормативных документов производителей лиофилизатов для приготовления раствора для инфузий, содержащих микафунгин, произведенных в 6 странах и зарегистрированных на территории Российской Федерации. В изученных документах метод потери в массе при высушивании для определения воды не используется. Проведение испытаний на содержание воды с использованием полумикрометода (волюметрическое титрование) включено в 13 проектов нормативных документов (65% от проанализированного количества документов), среди них в 8 документах разработчики рекомендуют проводить определение воды из точной навески препарата, а 5 разработчиков предлагают определять содержание воды непосредственно во флаконе лиофилизата. Проведение испытаний на содержание воды с использованием микроопределения (кулонометрическое титрование) включено в 7 (35%) проектов нормативных документов, при этом все разработчики,

использующие микроопределение, рекомендуют проводить титрование непосредственно из флакона лиофилизата.

Производители оборудования для определения воды по методу К. Фишера рекомендуют использовать кулонометрическое титрование для образцов с низким влагосодержанием, например 0,001–1%. Волюметрическое титрование применяют при влагосодержании образца не менее 0,1%⁸.

Проведена оценка содержания воды в четырех образцах лиофилизатов микафунгина разных производителей полумикрометодом и микроопределением. Для сравнения двух дисперсий критерий Фишера вычислили как отношение большей дисперсии к меньшей и провели сравнение с критическим значением при доверительной вероятности 0,95. Для всех серий испытаний вычисленный критерий Фишера был меньше критического значения, это позволяет предположить, что различие между дисперсиями во всех сериях испытаний незначимо, следовательно, воспроизводимость методик одинакова.

Для сравнения средних результатов, полученных с применением разных методик, произведен расчет средневзвешенного стандартного отклонения и вычислен критерий Стьюдента. Критическим значением служил коэффициент Стьюдента при доверительной вероятности 0,95 для 2 степеней свободы. Для всех серий испытаний вычисленный критерий Стьюдента был больше критического значения, что позволяет признать неравенство средних результатов⁹, полученных с использованием разных методик. Содержание воды, определенное волюметрическим и кулонометрическим методами

Таблица 3. Результаты апостериорного сравнения содержания воды, определенного разными методами, с использованием критерия Тьюки

Table 3. Results of Tukey's post-hoc test for comparison of water content measurements by different methods

Наименования групп по методу анализа <i>Group name according to the test method used</i>	Абсолютная средняя разность между группами <i>Absolute mean difference between groups</i>	Критическое значение критерия Тьюки ($Q_{кр}$) <i>Tukey's test critical value</i>	Сравнение групп <i>Comparison of groups</i>
«Потеря в массе при высушивании» и «Волюметрия» <i>Loss on drying vs Volumetric titration</i>	0,777	0,109	0,777 > 0,109
«Волюметрия» и «Кулонометрия» <i>Volumetric titration vs Coulometric titration</i>	0,537		0,537 > 0,109
«Потеря в массе при высушивании» и «Кулонометрия» <i>Loss on drying vs Coulometric titration</i>	0,240		0,240 > 0,109

⁷ <https://www.codecamp.ru/blog/tukey-kramer-post-hoc-test-excel/>

⁸ https://www.metrohm.com/ru_ru/discover/blog/2023/volumetry-or-coulometry.html

⁹ Гармаш АВ, Сорокина НМ. Метрологические основы аналитической химии. Учебное пособие. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова; 2017.

титрования по К. Фишеру, и результаты статистической обработки данных представлены в таблице 4.

Для оценки степени неопределенности полученных результатов рассчитаны граничные значения доверительных интервалов (ДИ) по критерию

Таблица 4. Результаты определения воды методами волюметрического и кулонометрического титрования по К. Фишеру

Table 4. Results of water determination by Karl Fischer titration/semi-micro determination (volumetric titration) and micro determination (coulometric titration)

Номер параллельной пробы и определяемый показатель <i>Replicate sample No. and test parameter</i>	Результаты определения воды, % <i>Results of water determination, %</i>							
	Образец 1 <i>Sample 1</i>		Образец 2 <i>Sample 2</i>		Образец 3 <i>Sample 3</i>		Образец 4 <i>Sample 4</i>	
	волюметрия <i>Volumetric titration</i>	кулонометрия <i>Coulometric titration</i>	волюметрия <i>Volumetric titration</i>	кулонометрия <i>Coulometric titration</i>	волюметрия <i>Volumetric titration</i>	кулонометрия <i>Coulometric titration</i>	волюметрия <i>Volumetric titration</i>	кулонометрия <i>Coulometric titration</i>
1	1,572	0,943	1,673	0,982	1,678	1,214	1,067	0,500
2	1,664	1,13	1,756	1,106	1,691	1,071	1,035	0,520
3	1,695	0,986	1,619	0,982	1,754	1,189	1,069	0,540
Среднее значение <i>Mean</i>	1,644	1,020	1,683	1,023	1,708	1,158	1,057	0,520
Дисперсия <i>Variance</i>	0,0041	0,0096	0,0048	0,0051	0,0017	0,0058	0,0004	0,0004
Критерий Фишера (F) <i>Fisher's F-test</i>	2,3440		1,0762		3,5302		1,0989	
Критическое значение ($F_{кр}$) (0,95; 2; 2) <i>Critical F-value (F_{crit}) (0.95; 2; 2)</i>	19,0000		19,0000		19,0000		19,0000	
Сравнение с $F_{кр}$ <i>Comparison with F_{crit}</i>	$F < F_{кр}$		$F < F_{кр}$		$F < F_{кр}$		$F < F_{кр}$	
Вывод <i>Conclusion</i>	Различие дисперсий статистически незначимо <i>The difference in variances is statistically insignificant</i>							
Стандартное отклонение <i>Standard deviation</i>	0,0640	0,0979	0,0690	0,0716	0,0406	0,0764	0,0191	0,0200
Стандартное отклонение средневзвешенное <i>Pooled standard deviation</i>	0,0827		0,0703		0,0612		0,0195	
Критерий Стьюдента (t) <i>Student's t-test</i>	9,2391		11,4847		11,0041		33,6502	
Критическое значение ($t_{кр}$) (0,95; 2) <i>Critical t-value (t_{crit}) (0.95; 2)</i>	4,3027		4,3027		4,3027		4,3027	
Сравнение с $t_{кр}$ <i>Comparison with t_{crit}</i>	$t > t_{кр}$		$t > t_{кр}$		$t > t_{кр}$		$t > t_{кр}$	
Вывод <i>Conclusion</i>	Средние значения не равны <i>The means are statistically dissimilar</i>							

Стьюдента для каждого определения с доверительной вероятностью 0,95 и 0,99 для двустороннего интервала [3]. Результаты расчета граничных значений ДИ представлены в *таблице 5*.

Анализ вычисленной неопределенности измерений при определении содержания воды в образцах разными методами показал, что границы ДИ не пересекаются как при уровне доверительной вероятности 0,95, так и при уровне доверительной вероятности 0,99, что необходимо учитывать при выборе оптимального метода определения содержания воды.

Очевидно, при любом уровне доверительной вероятности неопределенность измерения содержания воды полумикрометодом меньше неопределенности, полученной при микроопределении

того же показателя, что необходимо учитывать в случае получения результата, близкого к границе спецификации.

Однако оценка неопределенности измерений на основе определения граничных значений ДИ не учитывает возможного смещения результата, например из-за влияния пробоподготовки или особенностей оборудования. При оценке содержания воды полумикрометодом из точной навески смещение результата в сторону завышения может возникнуть из-за возможного поглощения воды лиофилизатом из окружающей среды при взвешивании препарата. При микроопределении воды смещение возникает, если продукты катодной реакции восстановления оказываются способными окисляться на аноде, что также может привести к завышенным

Таблица 5. Расчет доверительных интервалов (ДИ) при доверительной вероятности $p=0,95$ и $p=0,99$, полученных при определении воды методами волюметрического и кулонометрического титрования по К. Фишеру

Table 5. Calculation of confidence intervals (CI) (at confidence levels of 0.95 and 0.99) obtained during the determination of water by Karl Fischer titration/semi-micro determination (volumetric titration) and micro determination (coulometric titration)

Определяемый показатель Test parameter	Результаты определения воды, % Results of water determination, %							
	Образец 1 Sample 1		Образец 2 Sample 2		Образец 3 Sample 3		Образец 4 Sample 4	
	волюметрия Volumetric titration	кулонометрия Coulometric titration	волюметрия Volumetric titration	кулонометрия Coulometric titration	волюметрия Volumetric titration	кулонометрия Coulometric titration	волюметрия Volumetric titration	кулонометрия Coulometric titration
Критическое значение $t_{\alpha/2}(0,95; 2,0)$ Critical t-value ($t_{crit}(0,95; 2,0)$)	4,3027							
Границы ДИ ($p=0,95$) +/- CI limits ($p=0,95$) +/-	0,159	0,243	0,171	0,178	0,101	0,190	0,047	0,050
Нижняя граница Lower limit	1,485	0,776	1,511	0,845	1,607	0,968	1,010	0,470
Верхняя граница Upper limit	1,803	1,263	1,854	1,201	1,809	1,348	1,104	0,570
Критическое значение $t_{\alpha/2}(0,99; 2,0)$ Critical t-value ($t_{crit}(0,99; 2,0)$)	5,8409							
Границы ДИ ($p=0,99$) +/- CI limits ($p=0,99$) +/-	0,216	0,330	0,233	0,241	0,137	0,258	0,064	0,067
Нижняя граница Lower limit	1,428	0,689	1,450	0,782	1,571	0,900	0,993	0,453
Верхняя граница Upper limit	1,859	1,350	1,915	1,265	1,845	1,416	1,121	0,587

результатам анализа. Данный эффект может быть минимизирован с помощью диафрагмы, разделяющей катодное и анодное отделение¹⁰. Для учета перечисленных факторов в суммарной неопределенности результата необходимо провести дополнительные исследования.

В связи с недостаточностью экспериментальных данных проведенное исследование не позволяет дать исчерпывающие рекомендации по выбору способа определения воды в лекарственных средствах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ остаточного содержания воды в лиофилизате для приготовления раствора для инфузий «Микафунгин» методами определения потери в массе при высушивании, титрования по К. Фишеру полумикрометодом (волюметрическое титрование) и микроопре-

делением (кулонометрическое титрование). Метрологическая оценка позволила выявить существенное различие результатов, полученных разными методами, что не позволяет рекомендовать их в качестве альтернативных.

Показано, что неопределенность измерений, основанная на вычислении граничных значений доверительного интервала, при определении воды полумикрометодом по К. Фишеру меньше неопределенности, полученной при микроопределении данного показателя.

При выборе способа определения содержания воды в лекарственной форме «Леофилизаты» разработчики должны учитывать технологию производства лекарственного препарата, физическое состояние действующего вещества и вспомогательных веществ при их наличии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Фадейкина ОВ, Воропаев АА, Давыдов ДС, Волкова РА. Оценка неопределенности результатов измерений при определении потери в массе при высушивании биологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3-1):452-62. Fadeikina OV, Voropaev AA, Davydov DS, Volkova RA. Estimation of measurement uncertainty for the determination of loss on drying of biologicals. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3-1):452-62 (In Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-452-462>
2. Абдуллина СГ, Лира ОА, Петрова ИК. Кулонометрическое определение воды в лекарственных препаратах. *Фармация*. 2011;(5):15-6. Abdullina SG, Lira OA, Petrova IK. Coulometric determination of water in medications. *Pharmacy*. 2011;(5):15-6 (In Russ.). EDN: [OCORBT](#)
3. Турундаева АА, Олефир ЮВ, Лутцева АИ, Громова НН, Мамашина ЕА. Метрологические аспекты экспертной оценки качества лекарственных средств. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского назначения*. 2017;7(4):228-32. Turundaeva AA, Olefir YuV, Luttseva AI, Gromova NN, Mamashina EA. Metrological aspects of expert evaluation of medicinal products' quality. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;7(4):228-32 (In Russ.). EDN: [ZWDDTR](#)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.А. Турундаева – концепция работы, статистическая обработка данных, написание текста рукописи, формулировка выводов; Е.А. Мамашина – анализ нормативной документации, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; С.И. Кулешова – идея и концепция работы, участие в формулировании выводов, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; С.Е. Григорьева – проведение эксперимента; А.А. Рыжова – проведение эксперимента.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Anna A. Turundaeva conceptualised the study, performed statistical data processing, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. Ermonia A. Mamashina analysed manufacturer specification files and approved the final version of the manuscript for publication. Svetlana I. Kuleshova elaborated the study idea and concept, participated in the formulation of the conclusions, and approved the final version of the manuscript for publication. Svetlana E. Grigorieva conducted experiments. Anastasia A. Ryzhova conducted experiments.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Турундаева Анна Алексеевна / Anna A. Turundaeva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6011-4710>

Мамашина Ермония Арутюновна, канд. фарм. наук / Ermonia A. Mamashina, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2414-014X>

Кулешова Светлана Ивановна, канд. биол. наук / Svetlana I. Kuleshova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9103-9239>

Григорьева Светлана Евгеньевна / Svetlana E. Grigorieva

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-8676-7893>

Рыжова Анастасия / Anastasia A. Ryzhova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-1306-5259>

Поступила 09.07.2024

После доработки 12.08.2024

Принята к публикации 21.08.2024

Received 9 July 2024

Revised 12 August 2024

Accepted 21 August 2024

¹⁰ ОФС.1.2.3.0002 Определение воды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.