

УДК 615.2/3.012,
543.42

1 – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478, Россия, г. Москва, Каширское ш., 24

1 – Federal State Budgetary Scientific Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», 24, Kashirskoye highway, Moscow, 115478, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: ilya.gulyakin@yandex.ru
Тел.: 8 (499) 324 14 54

Аналитические методики и методы контроля

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛХС-1208 В ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

И.Д. Гулякин^{1*}, Л.Л. Николаева¹, М.В. Дмитриева¹, Н.А. Оборотова¹, Е.В. Игнатьева¹, Н.А. Дмитричева¹, И.В. Ярцева¹, З.С. Шпрах¹

Резюме. С целью обеспечения достоверных и точных результатов авторами проведена процедура валидации разработанной методики спектрофотометрического количественного определения действующего вещества для лиофилизированной липосомальной лекарственной формы отечественного гидрофобного противоопухолевого соединения из группы производных индолокарбазолов – ЛХС-1208. По результатам установления специфичности, линейности, диапазона применения, правильности и прецизионности валидированная методика может применяться в диапазоне 80–120% концентрации ЛХС-1208 в лекарственной форме.

Ключевые слова: ЛХС-1208, лиофилизированная лекарственная форма, спектрофотометрия, валидация.

VALIDATION OF METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION LHS-1208 IN THE LYOPHILIZED DOSAGE FORM

I.D. Gulyakin^{1*}, L.L. Nikolaeva¹, M.V. Dmitrieva¹, N.A. Oborotova¹, E.V. Ignatieva¹, N.A. Dmitricheva¹, I.V. Yartseva¹, Z.S. Shprakh¹

Abstract. In order to ensure reliable and accurate results, the authors carried out the validation procedure developed technique for spectrophotometric quantification of the active substance for the lyophilized liposomal formulation of national hydrophobic antitumor compounds from the group of indolocarbazole – LHS-1208. As a result of the establishment of the specificity, linearity, range of use, accuracy and precision of a validated method may be used in the range of 80–120% concentration LHS-1208 in the dosage form.

Keywords: LHS-1208, lyophilized dosage form, spectrophotometry, validation.

ВВЕДЕНИЕ

В ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработана лиофилизированная лекарственная форма препарата из группы индолокарбазолов «ЛХС-1208, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 9 мг» (патент РФ № 2572691), для стандартизации которой по количественному содержанию ЛХС-1208 предложена методика спектрофотометрического определения в ультрафиолетовой области спектра [1].

Установление соответствия качества лекарственных препаратов регламентируемым нормам предполагает применение различных аналитических методов, которые должны отвечать определенным требованиям. В процессе разработки новых методик можно своевременно выявить их недостатки с помощью валидации, что гарантирует достоверные и точные результаты анализа [2].

Цель данного исследования – валидация спектрофотометрической методики количественного определения ЛХС-1208 в лиофилизированной лекарственной форме (ЛИО-ЛФ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реактивы

Субстанция ЛХС-1208 (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России); Kollidon 17 PF (BASF, Германия), Cremophor ELP (BASF, Германия), вода очищенная (ФС 42-2619-97), диметилсульфоксид – ДМСО (ч.д.а., «Химмед», Россия), диметилформамид – ДМФА (ч.д.а., «Химмед», Россия).

Приборы и аппаратура

Весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), весы лабораторные Sartorius LA 1200 S (Sartorius AG, Германия), спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия).



Весы аналитические Sartorius 2405

Методика количественного определения

Для приготовления испытуемого раствора содержимое одного флакона растворяли в небольшом количестве ДМФА, переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили до метки ДМФА. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки тем же растворителем. В качестве стандартного образца (СО) использовали раствор субстанции ЛХС-1208 в соответствующей концентрации. Измерение оптической плотности испытуемого раствора проводили параллельно с измерением оптической плотности СО относительно ДМФА в максимуме при длине волны 320 ± 2 нм.

Содержание ЛХС-1208 во флаконе (X, мг) рассчитывали по формуле:

$$X = D_1 \times a_0 \times P / D_0 \times 100,$$

где D и D_0 – соответственно оптические плотности растворов образца лекарственной формы (ЛФ) и СО ЛХС-1208; a_0 – навеска СО ЛХС-1208 в мг; P – содержание ЛХС-1208 в СО в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение спектральных характеристик ЛХС-1208 и его идентификация (определение подлинности) в ЛИО-ЛФ

Разработку методики количественного определения действующего вещества в ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 начали с изучения электронного спектра поглощения. Данная субстанция практически нерастворима в воде, измерения проводили для растворов ЛХС-1208

в ДМФА, которые имеют характерные электронные спектры поглощения (ЭСП): в области 200-500 нм наблюдаются максимум поглощения при 287 ± 2 нм, плечо при 306 ± 2 нм; максимум поглощения при 320 ± 2 нм, плечо при 343 ± 2 нм, слабо интенсивный максимум при 420 нм (рисунок 1). Отношение значений оптической плотности в максимумах D320/D287 составляет $1,42 \pm 0,05$.

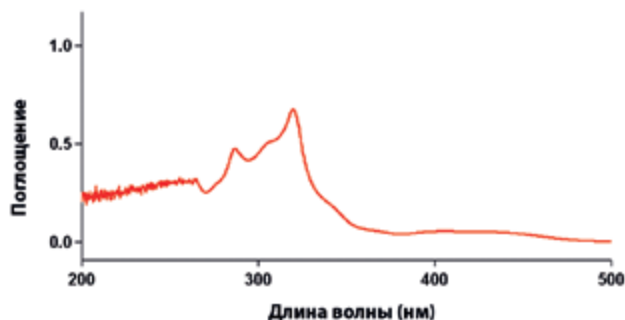


Рисунок 1. Электронный спектр поглощения субстанции ЛХС-1208

В максимуме при $\lambda_{\text{max}} = 320$ нм наблюдается более интенсивное поглощение, поэтому он был выбран в качестве аналитического сигнала. Для снижения систематических и случайных ошибок при определении ЛХС-1208 в ЛФ в методику спектрофотометрического анализа ввели способ расчета по СО. В качестве СО использовали субстанцию ЛХС-1208.

Рабочей концентрацией раствора ЛХС-1208 выбрали концентрацию 0,006-0,008 мг/мл; при этом величина оптической плотности укладывается в интервал, рекомендуемый ГФ XIII, а максимумы поглощения в растворах субстанции и ЛФ совпадают (рисунок 2).

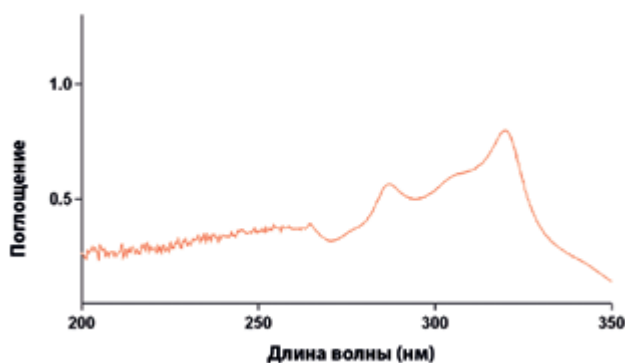


Рисунок 2. Электронный спектр поглощения раствора ЛИО-ЛФ ЛХС-1208

Специфичность

Специфичность – это способность аналитической методики давать правильный результат определения вещества в присутствии сопутствующих компонентов.

При разработке спектрофотометрической методики количественного определения необходимо учитывать влияние вспомогательных веществ, входящих в состав ЛФ, на спектральные характеристики действующего вещества. В нашем случае на разных этапах разработки ЛФ в состав моделей включались такие вспомогательные вещества, как ДМСО, Cremophor ELP, Kollidon 17PF в разных количествах.

На рисунках 3 и 4 представлены ЭСП растворов Cremophor ELP с ДМСО и Kollidon 17PF в ДМФА. Из рисунков видно, что эти растворы в области 270-350 нм не имеют собственного поглощения, и следовательно, присутствие Cremophor ELP, ДМСО и Kollidon 17PF не мешает определению основного действующего вещества. В качестве раствора сравнения поэтому возможно использование ДМФА без добавления вспомогательных веществ.

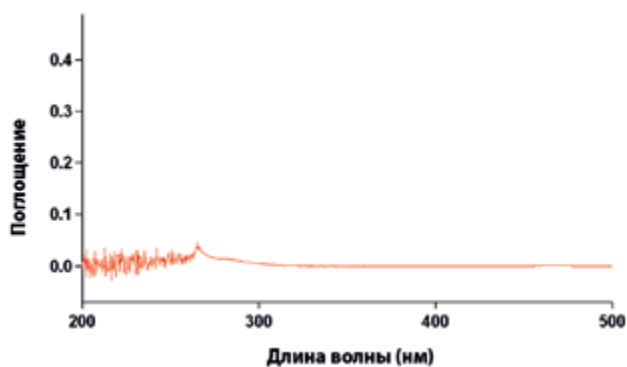


Рисунок 3. Электронный спектр поглощения раствора Cremophor ELP с ДМСО в ДМФА

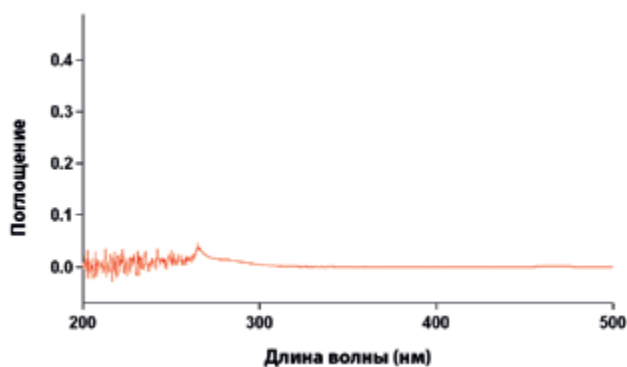


Рисунок 4. Электронный спектр поглощения раствора Kollidon 17PF в ДМФА

В качестве аналитической выбирали длину волны, при которой пик ЛХС-1208 имеет наибольшее разрешение и интенсивность. Для анализа ЛХС-1208 в разработанной ЛФ наиболее удобно использовать длину волны с максимумом около 320 ± 2 нм, поскольку данный пик является разрешенным, узким и позволяет измерять оптическую плотность концентрированных растворов ЛХС-1208.

Исходя из вышеизложенного, ЭСП ЛХС-1208 может использоваться для идентификации и количественного определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ, а применяемая методика спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 является специфичной.

Диапазон применения

Методика количественного определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ должна быть применима в интервале от 80 до 120% от номинального значения определяемой концентрации действующего вещества в ЛФ. В пределах заданного диапазона получаемые с использованием валидируемой методики результаты должны иметь приемлемый уровень линейности, правильности и прецизионности.

Линейность

Линейность аналитической методики считается доказанной, если в выбранном диапазоне применения можно показать прямо пропорциональное соотношение между концентрацией исследуемого вещества в растворе и сигналом детектора (фактором отклика).

При валидации разработанной методики спектрофотометрического анализа ее линейность проверяли экспериментально измерением аналитических сигналов для 5 проб с различными концентрациями ЛХС-1208 в диапазоне от 80 до 120%. Причем значение оптической плотности для каждой пробы получали путем расчета среднего значения из нескольких измерений.

Для эксперимента готовили модельные смеси ЛИО-ЛФ, представляющие собой растворы вспомогательного вещества Kollidon 17 PF и действующего вещества ЛХС-1208 в ДМСО с концентрациями действующего вещества от 1,35 до 1,84 мг/мл. Значение коэффициента корреляции составило более 0,999, что свидетельствует о наличии достаточно тесной линейной связи между концентрацией ЛХС-1208 и оптической плотностью в диапазоне концентраций от 80 до 120% (таблица 1).

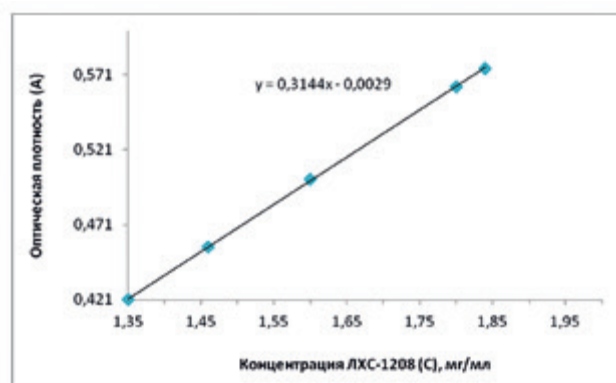


Рисунок 5. Графическое изображение регрессионной прямой линейности методики количественного анализа ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ при 320 нм

Таблица 1. Прецизионность

Оценка линейности методики спектрофотометрического количественного анализа ЛХС-1208

Концентрация ЛХС-1208		Среднее значение оптической плотности, А	Регрессия
%	мг/мл		
80	1,350	0,421	0,422
90	1,460	0,456	0,456
100	1,600	0,502	0,500
110	1,800	0,563	0,563
120	1,840	0,575	0,576
Статистические характеристики			Результаты
Наклон прямой (b)			0,314
Отрезок на оси ординат (a)			-0,003
Доверительный интервал (95%) b			0,314±0,235
Коэффициент корреляции (R)			0,99993

Уравнение регрессии для данной линейной зависимости имеет вид $y=0,314x-0,003$. Графическое представление линейности методики показано на рисунке 5.

Правильность (точность)

Правильность аналитического метода характеризуется близостью результатов испытаний, полученных данным методом, к истинному значению. Правильность валидируемой методики устанавливали по результатам ее применения к анализу модельной смеси, включающей все компоненты ЛФ и известное количество определяемого вещества в пределах диапазона применения. С этой целью готовили по три модельные смеси для каждой из трех концентраций: 80, 100 и 120%. Оценка правильности методики на основе 9 результатов проводили путем расчета процента восстановления (отклик), стандартного отклонения, коэффициента вариации, доверительного интервала среднего значения ($P=95\%$) и относительной погрешности среднего результата (таблица 2).

На основании полученных результатов, представленных в таблице 2, разработанную методику спектрофотометрического анализа можно считать правильной, так как отклонения от среднего значения ($100,03\pm 0,13$) укладываются в интервал концентраций ЛХС-1208 (8,1-9,9 мг/флакон), заявленных в проекте НД на ЛИО-ЛФ ЛХС-1208, и относительная погрешность среднего результата не превышает 1%.

Прецизионность методики характеризуется рассеянием результатов, получаемых с ее использованием, относительно значения среднего результата. Прецизионность методики спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 определяли по оценке повторяемости результатов и внутрилабораторной прецизионности.

А. Повторяемость (сходимость)

Повторяемость аналитической методики оценивали по результатам, полученным в одинаковых условиях в одной лаборатории одним и тем же исполнителем в пределах короткого промежутка времени. Испытание проводили на 6 образцах ЛИО-ЛФ ЛХС-1208 одной серии. Критерий приемлемости выражался величиной коэффициента вариации. На основании полученных данных (таблица 3) коэффициент вариации составил менее 1% (0,075%), что свидетельствует о незначительной изменчивости вариационного ряда и прецизионности методики в условиях повторяемости.

Таблица 2.

Оценка правильности методики спектрофотометрического количественного анализа ЛХС-1208

Концентрация, %	№ пробы	ЛХС-1208, мг		Отклик, %
		Содержание ЛХС-1208 в модельной смеси, мг	Найденное значение, мг	
80	1	8,10	8,12	100,25
	2	8,09	8,10	100,12
	3	8,11	8,09	99,75
100	4	9,60	9,61	100,10
	5	9,62	9,63	100,10
	6	9,60	9,62	100,21
120	7	11,04	11,02	99,82
	8	11,05	11,04	99,91
	9	11,05	11,05	100,00
Статистические характеристики, %				Результаты
Среднее значение				100,03
Стандартное отклонение				0,172
Коэффициент вариации				0,17
Доверительный интервал				100,03±0,13
Относительная погрешность				0,13

Б. Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность

Для определения промежуточной прецизионности измеряли содержание действующего вещества в 6

пробах, полученных в условиях работы одной лаборатории разными аналитиками в разные дни.

При анализе результатов определения концентрации ЛХС-1208 (мг/флакон) в различных условиях (таблица 4) обнаружено, что при сравнении расчетного и табличного значения критерия Стьюдента выполнялось неравенство $t_{рас}=0,5 < t_{таб}=2,23$; что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки измерений. На основании вышеизложенного можно сделать вывод о том, что расхождения результатов анализа, полученных двумя исследователями, случайны. Таким образом, установлена промежуточная прецизионность спектрофотометрической методики количественного определения ЛХС-1208 в разработанной ЛИО-ЛФ.

Таблица 3.

Оценка повторяемости методики спектрофотометрического количественного анализа ЛХС-1208

№ образца	Содержание ЛХС-1208 во флаконе, мг
1	9,286
2	9,305
3	9,305
4	9,298
5	9,300
6	9,298
Статистические характеристики	Результаты
Среднее значение, мг/фл	9,298
Дисперсия	0,000049
Стандартное отклонение, мг/фл	0,007
Коэффициент вариации, %	0,075
Доверительный интервал, мг/фл	9,298±0,007
Относительная погрешность, %	0,075

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований получена лиофилизированная лекарственная форма ЛХС-1208 и разработаны методики качественного ТСХ-анализа и количественного спектрофотометрического определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ ее получения.

Электронный спектр поглощения ЛХС-1208 может использоваться для идентификации и количественного определения ЛХС-1208 в лиофилизированной лекарственной форме (ЛИО-ЛФ), а применяемая методика спектрофотометрического анализа ЛХС-1208 является специфичной.

Разработанная методика и ее аналитический диапазон в интервале от 80 до 120% от номинального значения определяемой концентрации действующего вещества в ЛИО-ЛФ пригодны для решения поставленных аналитических задач. Методику спектрофотометрического анализа можно считать правильной, так как отклонения от среднего значения укладываются в интервал концентраций ЛХС-1208, заявленных в проекте НД на ЛИО-ЛФ ЛХС-1208, и относительная погрешность среднего результата не превышает 1%. Коэффициент вариации составил менее 1%, что свидетельствует о незначительной изменчивости вариационного ряда и прецизионности методики в условиях повторяемости. Установлена промежуточная прецизионность спектрофотометрической методики количественного определения ЛХС-1208 в ЛИО-ЛФ.

Таблица 4.

Оценка внутрилабораторной прецизионности методики спектрофотометрического количественного анализа ЛХС-1208

№ пробы	Содержание ЛХС-1208 во флаконе, мг	
	Аналитик 1	Аналитик 2
1	9,286	9,301
2	9,305	9,292
3	9,305	9,297
4	9,298	9,303
5	9,300	9,301
6	9,298	9,306
Статистические характеристики	Результаты	
Среднее значение, мг/фл	9,298	9,300
Дисперсия S^2 , мг/фл	$4,7 \times 10^{-5}$	$4,9 \times 10^{-5}$
Стандартное отклонение, мг/фл	0,0069	0,0070
Коэффициент вариации, %	0,074	0,075
Доверительный интервал, мг/фл	9,298±0,0072	9,300±0,0070
Относительная погрешность, %	0,077	0,075
$t_{таб}(95\%;10)=2,23$	$t_{рас}=0,5$	

ЛИТЕРАТУРА

- ОФС.1.2.1.1.0003.15 Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях // Государственная фармакопея, XIII изд.
- ОФС 1.1.0012.15 Валидация аналитических методов // Государственная фармакопея, XIII изд.