

Рекомендована д. фармац. наук, проф. С. О. Васюк

УДК 615.07:54.062:543.422.

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ПІДХОДІВ ДО ОЦІНКИ ВИПРОБУВАННЯ НА ІДЕНТИФІКАЦІЮ КОМПОНЕНТІВ ЕКСТЕМПОРАЛЬНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРІЇ

© О. А. Євтіфеева

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: вперше науково обґрунтовано підходи до формування критичних значень для допусків коливання величини співвідношення при довжині хвилі двох максимумів або мінімумів для методик ідентифікації компонентів екстемпоральних лікарських засобів на основі методу спектрофотометрії. На основі цих підходів розроблено та валідовано методику ідентифікації папаверину гідрохлориду в екстемпоральній лікарській формі. Згідно з отриманими експериментальними даними методика може бути коректно відтворена та придатна для використання в аптечних умовах та лабораторіях з контролю якості лікарських засобів.

Ключові слова: стандартизація, спектрофотометрія, випробування на ідентифікацію, екстемпоральні лікарські засоби, папаверину гідрохлорид.

Вступ. Сьогодні при контролі якості лікарських засобів перевагу надають фізико-хімічним методам аналізу. Вони дозволяють визначити органічні сполуки з різноманітною хімічною будовою та при незначних витратах аналізу отримати достовірні дані про якість лікарського засобу.

Згідно з Державною Фармакопеею України (ДФУ) метод спектрофотометрії в ультрафіолетовій ділянці спектра використовують для проведення випробувань на ідентифікацію, чистоту та кількісного аналізу субстанцій і готових лікарських засобів (ЛЗ). При аналізі методів ідентифікації речовин за УФ-спектром поглинання, наведених у ДФУ, виявлено, що з цією метою застосовують метод визначення максимуму поглинання при певній довжині хвилі, питомого показника поглинання та відношення оптичного поглинання речовини при довжині хвилі двох максимумів або мінімумів [3–6].

При здійсненні контролю якості екстемпоральних лікарських засобів (ЕЛЗ) для випробування на ідентифікацію використовують хімічні методи та метод спектрофотометрії, оскільки спектрофотометричне устаткування є обов'язковим для лабораторій з аналізу ЛЗ та досить розповсюдженим для виробничих аптек. З метою оцінки хімічних методів ідентифікації компонентів ЕЛЗ раніше було проведено науково-теоретичне обґрунтування підходів стандартизації та розроблено процедуру валідації методик [7]. Тому для отримання в умовах лабораторій та аптек коректних результатів якісного аналізу актуально дослідити аспекти валідації, здійснити стандартизацію підходів до оцінки випробування на

ідентифікацію компонентів ЕЛЗ методом спектрофотометрії та провести опрацювання даної схеми при розробці та валідації методики ідентифікації папаверину гідрохлориду в екстемпоральній лікарській формі (ЕЛФ).

Методи дослідження. Для проведення дослідження було використано субстанцію папаверину гідрохлориду виробництва фірми "Recordati", серії № 09100023, яка відповідає вимогам ДФУ [5]; мірний посуд класу А, який відповідає вимогам ДФУ; аналітичне обладнання: спектрофотометр "SPECORD 200", спектрофотометр 46 "Ломо"; аналітичні ваги АВ 204 S/A METTLER TOLEDO.

Для експерименту приготували модельні розчини папаверину гідрохлориду.

Приготування модельних розчинів для ЛФ 2,00 % розчину в діапазоні 80,00–120,00 %. Готують п'ять розчинів згідно з діапазоном застосування методики [3, 5] у концентраціях 80,00, 90,00, 100,00, 110,00, 120,00 % від номінальної. Точну наважку папаверину гідрохлориду (m, г) поміщають у мірну колбу місткістю 100,00 мл та доводять водою Р до 100,00 мл.

Методика ідентифікації папаверину гідрохлориду в ЕЛФ 2,00 % розчину за УФ-спектром поглинання. 1,00 мл розчину папаверину гідрохлориду поміщають у мірну колбу місткістю 100,00 мл, доводять 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої до мітки (розчин А). 10,00 мл розчину А поміщають у мірну колбу місткістю 100,00 мл, доводять 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої до мітки. Вимірюють УФ-спектр поглинання розчину в ділянці від 270 до 320 нм, який повинен мати два максимуми при довжинах

хвиль 285 та 310 нм. Співвідношення оптичної густини в максимумі при довжині хвилі 310 нм до оптичної густини в максимумі при довжині хвилі 285 нм повинно бути від 1,25 до 1,30.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ “Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту” [4].

Результати й обговорення. Застосування абсорбційної спектрофотометрії в УФ та видимій ділянках спектра для якісного аналізу лікарських речовин обмежене через неспецифічність. Провести ідентифікацію речовин шляхом порівняння спектрів поглинання аналітичного розчину та розчину стандартного зразка або за збігом положень максимумів, на відміну від спектрофотометрії в інфрачервоній ділянці, неможливо. За наявності того чи іншого максимуму при певній довжині хвилі можна припустити наявність у структурі того чи іншого хромофору та ідентифікувати хіба що клас речовин. Стандартних спектрів для різних фармацевтичних речовин взагалі немає [2, 8, 9]. Винятки становлять випадки, коли крива поглинання оптичної густини характеризується декількома максимумами і мінімумами (надзвичайно сильні або слабкі ділянки оптичного поглинання). В таких випадках для субстанцій при використанні спектрофотометричного методу як критерій, який підвищує специфічність визначення, використовують співвідношення величин оптичної густини при довжині хвилі двох максимумів або мінімумів, які характеризують хімічну структуру речовини. Для здійснення ідентифікації компонентів ЕЛФ можна застосовувати саме цей тип випробування. Селективність ідентифікації може бути підвищена шляхом комбінування тонкошарової хроматографії з хімічними реакціями.

При цьому характері визначення умовою випробування на ідентифікацію є експериментально отримана величина співвідношення, математичне значення якої повинно перебувати у певних інтервалах значень з довірчою імовірністю 95,00 %. Тобто, невизначеність даного випробування можна охарактеризувати стандартним відхиленням та/або шириною довірчого інтервалу. Тому ми пропонуємо такий порядок проведення експерименту:

1. Дослідження ультрафіолетового спектра поглинання аналізованої речовини та визначення аналітичних довжин хвиль для здійснення аналізу. Співвідношення зазначених величин спектральної поглинальної здатності, як правило, не повинно перевищувати 5. Такі умови дозволяють запобігти приготуванню додаткових розведень, що підвищує точність визначення.

2. Розробка методики, визначення оптимального порядку розведення аналітичного розчину на основі оцінки невизначеності прободготовки.

3. Дослідження валідаційних характеристик: прецизійність (на рівні збіжності та відтворюваності) на всьому діапазоні застосування методики, робасність і прогноз повної невизначеності аналізу.

4. Дослідження проводять на п'яти випробуваних ЛФ з різними рівновіддаленими концентраціями аналізованої речовини на всьому діапазоні застосування. Далі, відповідно до методики аналізу, готують по три паралельних розведення аналітичних розчинів для аналізу, кожний з яких аналізують тричі (n=15).

5. Визначення відтворюваності здійснюють на різних серіях модельних розчинів, у трьох різних лабораторіях, на різному обладнанні, щоб урахувати вплив невеликих змін умов проведення та спектральну похибку аналізу.

6. З метою встановлення критичних значень для допусків коливання величини співвідношення при довжині хвилі двох максимумів або мінімумів використовують “принцип незначущості” [3–6].

Для проведення ідентифікації субстанції папаверину гідрохлориду ДФУ регламентує методи абсорбційної спектрофотометрії в інфрачервоній ділянці та тонкошарової хроматографії [5]. Американська та Російська Фармакопеї рекомендують проводити ідентифікацію субстанції папаверину гідрохлориду за наявністю максимумів при певних довжинах хвиль [2, 9].

З метою розробки спектрофотометричного методу ідентифікації папаверину гідрохлориду у водному розчині було розглянуто спектри поглинання та обрано аналітичні довжини хвиль, прийнятні для аналізу. Для проведення ідентифікації за співвідношенням величин оптичного поглинання важливо, щоб при одній концентрації величина поглинання максимумів, які обирають для аналізу, перебувала в певних межах величин. Враховуючи те, що найбільш розповсюдженим спектрофотометричним обладнанням лабораторій з аналізу та виробничих аптек є СФ-46, ми обрали концентрацію аналітичного розчину 2×10^{-5} г/мл, при якій поглинальна здатність у максимумах була в межах від 0,3 до 0,8 за умови використання стандартних 1 см кювет (рис. 1).

Для оцінки коректності відтворювання методики проведено прогнозування максимально допустимої невизначеності результатів [4, 5]. Невизначеність даної методики прогнозували за результатами розрахунку невизначеності прободготовки – стадій зважування та розведення, використовуючи фармакопейні вимоги до гра-

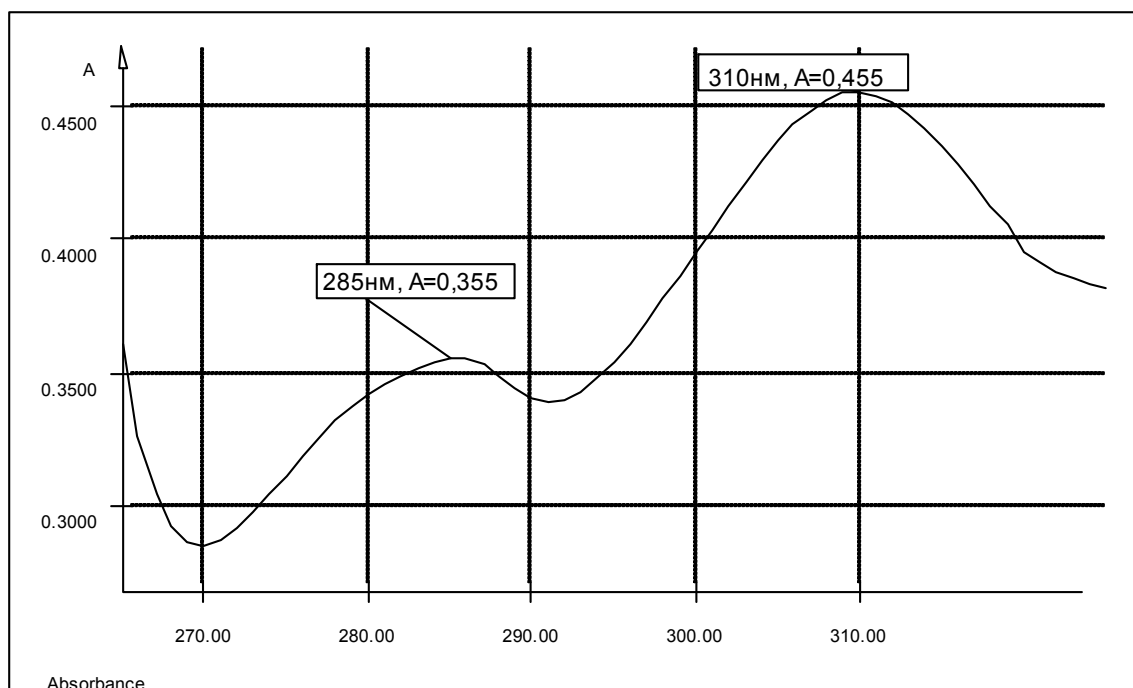


Рис. 1. Спектр поглинання папаверину гідрохлориду в концентрації 2×10^{-5} г/мл у 0,01 М розчині хлористоводневої кислоти.

нично припустимих похибок для мірного посуду, ваг та приладів, і значення невизначеності кінцевої аналітичної операції $\Delta_{FAO} = 0,70\%$ для спектрофотометричного визначення [1]. Ре-

зультати розрахунку повної невизначеності методики спектрофотометричного випробування на ідентифікацію папаверину гідрохлориду наведено в таблиці 1.

Таблиця 1. Оцінка повної невизначеності методики ідентифікації папаверину гідрохлориду методом прямої спектрофотометрії

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %
<i>Випробовуваний розчин для лікарської форми 2,00 % розчину папаверину гідрохлориду</i>		
Зважування на аналітичних вагах, г	m_{st}	$0,0002/20 \times 100 = 0,001$
Доведення до об'єму мірної колби, мл	100,0	0,05
Узяття аліквоти піпеткою (на 5 мл), мл	1,0	0,6
Доведення до об'єму мірної колби, мл	100	0,12
Узяття аліквоти піпеткою (на 5 мл), мл	10,0	0,5
Доведення до об'єму мірної колби, мл	100	0,12
Невизначеність пробопідготовки	$\Delta_{sp} = \sqrt{(0,001^2 + 0,05^2 + 0,6^2 + 0,12^2 + 0,5^2 + 0,12^2)} = 0,8$	
Прогноз повної невизначеності методики	$\Delta_{As} = \sqrt{(0,8^2 + 0,70^2)} = 1,06\%$	

Розрахований за результатами експерименту довірчий інтервал співвідношення при обраних довжинах хвиль 310 та 285 нм для модельних розчинів папаверину гідрохлориду в діапазоні 80,00–120,00 % дорівнює 0,92 % від середнього значення $\sim 1,28$. Теоретична прогнозована невизначеність випробування $\Delta_{As} = \sqrt{(\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2)}$ (невизначеність мірного посуду відповідно до про-

понованого порядку розведення) складає $\Delta_{As} = 1,06\%$ і перевищує експериментально отримане значення $\Delta_{As} (\%) \leq \max \Delta_{As}$. Щоб покрити невеликі зміни або спектральні огріхи, прийнятні допуски формували з урахуванням критерію незначущості $\max \Delta_{As} = 0,32 \times B$, тому в нашому випадку допуски дорівнюють

$B = \max \Delta_{As} / 0,32 = 3,31 \approx 3,0\%$. Тобто, при ідентифікації папаверину гідрохлориду в 2,00 % розчині інтервал значень співвідношення оптичної густини при смугах поглинання 310 та 285 нм не повинен перевищувати значення від 1,25 до 1,30.

Визначення оптичного поглинання та його співвідношення при обраних хвилях для модельних розчинів папаверину гідрохлориду

було проведено на всьому діапазоні концентрацій $\pm 20,00\%$ від номінальної за прописом.

Отримані дані (табл. 2) щодо відносного стандартного відхилення 0,40 % та довірчого інтервалу окремого значення $\Delta x = \pm 0,69\%$ (що складає довірчий інтервал величини співвідношення від 1,26 до 1,28), задовольняють вимоги до зазначених меж критичних значень 1,25–1,30.

Таблиця 2. Метрологічні характеристики в діапазоні застосування методики ідентифікації папаверину гідрохлориду в ЕЛФ методом спектрофотометрії

Модельний розчин, %	Оптична густина		Співвідношення оптичної густини
	$\lambda=285$ нм	$\lambda=310$ нм	
80,00	0,291	0,371	1,2749
	0,290	0,370	1,2759
	0,291	0,371	1,2749
90,00	0,327	0,417	1,2752
	0,328	0,417	1,2713
	0,328	0,418	1,2744
100,00	0,360	0,461	1,2806
	0,362	0,463	1,2790
	0,361	0,462	1,2798
110,00	0,403	0,512	1,2705
	0,402	0,511	1,2711
	0,402	0,511	1,2711
120,00	0,445	0,563	1,2652
	0,444	0,562	1,2658
	0,445	0,563	1,2652
Середнє значення			1,2730
Відносне стандартне відхилення S_z , %			0,40
Довірчий інтервал окремого значення Δx , %			$\pm 0,69$

Щоб урахувати вплив невеликих змін умов проведення та спектральну похибку аналізу, запропоновано проводити експериментальне визначення довірчого інтервалу на всьому діапазоні застосування методики та в умовах різних лабораторій на різному обладнанні.

Відтворюваність методики досліджували в умовах трьох різних лабораторій з контролю якості лікарських засобів. Проведено аналіз розчинів однієї аналітичної серії на різному обладнанні, в різні дні, різними аналітиками. Отримані метрологічні оцінки відтворюваності методики наведено в таблиці 3.

Таблиця 3. Результати вивчення відтворюваності методики ідентифікації папаверину гідрохлориду в ЕЛФ методом спектрофотометрії

Діапазон 80,00–120,00 % Модельні розчини, n=15	Співвідношення оптичної густини A_{310}/A_{285} , Z_i		
	лаб. 1	лаб. 2	лаб. 3
Середнє значення	1,2730	1,2785	1,2814
Об'єднане середнє Z_{intra}	1,2776		
Відносне стандартне відхилення RSD_z , %	0,39	0,69	0,43
Відносне стандартне відхилення RSD_{intra} , %	0,52		
Відтворюваність Δ_{intra} , %	$\pm 0,92$		

Довірчий інтервал дорівнює від 1,26 до 1,29 та свідчить про те, що метрологічні характеристики методики перебувають у межах максималь-

но допустимих значень відповідно до критичних меж інтервалу значень від 1,25 до 1,30. Результати експерименту довели, що дану методику

можна використовувати в умовах лабораторій з контролю якості ЛЗ та ВМП.

Висновки. Обґрунтовано підходи до формування критичних значень для допусків коливання величини співвідношення при довжині хвилі двох максимумів або мінімумів для методик ідентифікації компонентів ЕЛЗ на основі методу спектрофотометрії. За допомогою цих підходів встановлено інтервал критичних значень для допусків співвідношення оптичного поглинання папаверину гідрохлориду в максимумах A_{310}/A_{285} , що дорівнює 1,25–1,30, та валідовано методику ідентифікації папаверину гідрохлориду в ЕЛФ.

Підтверджено чутливість та специфічність запропонованої методики в умовах різних лабораторій з контролю якості лікарських засобів. Вивчено метрологічні характеристики методики в діапазоні застосування: прецизійність на рівні внутрішньолабораторної точності, відтворюваність в умовах різних лабораторій, а також повну невизначеність. Доведено, що методика дозволяє контролювати якість виготовлених в умовах аптеки розчинів папаверину гідрохлориду та може бути коректно відтворена в різних лабораторіях з контролю якості лікарських засобів.

Література

1. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях / А. И. Гризодуб, Н. Н. Зволинская, Н. Н. Архипова и др. // Фармаком. – 2004. – № 2. – С. 20–34.
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации / Изд-во “Научный центр экспертизы средств медицинского применения”, 2008. – 704 с.
3. Державна Фармакопея України / Держ. п-во “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків : РІРЕГ, 2001. – С. 556 с.
4. Державна Фармакопея України / Держ. п-во “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид., 1 допов. – Х. : РІРЕГ, 2004. – 520 с.
5. Державна Фармакопея України / Держ. п-во “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид., 2 допов. – Харків : РІРЕГ, 2008. – 608 с.
6. Державна Фармакопея України / Держ. п-во “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид., 3 допов. – Х. : РІРЕГ, 2009. – 190 с.
7. Євтіфеева О. А. Стандартизація підходів до оцінки хімічних методів ідентифікації речовин, які входять до складу екстемпоральних лікарських препаратів / О. А. Євтіфеева // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2010. – № 1. – С. 19–24.
8. European Pharmacopoeia. – 6th ed. – Strasbourg : European Directorate for the Quality of Medicines, 2008. – Vol. 2. – 3308 p.
9. The USP Pharmacists’ Pharmacopoeia. – 2-nd ed. – Rockville, 2008. – 1519 p.

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ПІДХОДІВ К ОЦЕНКЕ ІСПЫТАНИЙ ПО ІДЕНТИФІКАЦІИ КОМПОНЕНТОВ ЕКСТЕМПОРАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ МЕТОДОМ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

О. А. Евтифеева

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: впервые научно обосновано подходы к формированию критических значений для допусков колебания величины соотношения при длине волны двух максимумов или минимумов для методик идентификации компонентов экстемпоральных лекарственных средств на основании метода спектрофотометрии. На основании этих подходов разработано и валидировано методику идентификации папаверина гидрохлорида в экстемпоральной лекарственной форме. Согласно полученным экспериментальным данным, методика может быть корректно воспроизведена и пригодна для использования в аптечных условиях и лабораториях по контролю качества лекарственных средств.

Ключевые слова: стандартизация, спектрофотометрия, испытание по идентификации, экстемпоральные лекарственные средства, папаверина гидрохлорид.

STANDARDIZATION OF APPROACHES TO ASSESSMENT OF TESTS ON IDENTIFICATION OF COMPONENTS OF EXTEMPORANEOUS PREPARATIONS BY SPECTROPHOTOMETRY METHOD

O. A. Yevtifiyeva

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: for the first time the scientific-theoretical substantiation of approaches to forming of critical values for limits of oscillation of size of correlation at length of wave of two maximums or minimums for the methods of identification by spectrophotometry method of medicinal substances those enter into the composition of extemporaneous preparation was conducted. On the basis of this approach the method of identification of papaverine hydrochloride in extemporaneous preparations was developed and validated.

Key words: standardization, spectrophotometry, identification, extemporaneous preparations, papaverine hydrochloride.