

1 – ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, 143442, Россия, Московская обл., Красногорский район, п/о Отрадное, пос. Светлые горы, владение 1

2 – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8

1 – FSBS SCBMT FMBA, 1, pos. Svetlye gory, p/o Otradnoe, Krasnogorskiy r-n, Moscow region, 143442, Russia

2 – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: lvovaanna1@yandex.ru

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА ДЛЯ ТЕСТА КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

А.А. Львова^{1*}, И.Е. Шохин¹, Л.А. Меньшикова¹, Т.Н. Комаров¹, Ю.Е. Болдина¹, Ю.В. Медведев²

Резюме. Проведена валидация методики количественного определения левофлоксацина для теста кинетики растворения его таблеток. Количественное определение проводили методом УФ-спектрофотометрии. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитический диапазон. По результатам исследования основные валидационные характеристики метода соответствуют критериям приемлемости, приведенным в ОФС «Валидация аналитических методик».

Ключевые слова: валидация, левофлоксацин, УФ-спектрофотометрия, тест кинетики растворения.

VALIDATION OF UV-SPECTROMETRY ASSAY METHOD FOR DISSOLUTION PROFILE TEST FOR LEVOFLOXACINE TABLETS

A.A. Lvova^{1*}, I.E. Shohin¹, L.A. Menshikova¹, T.N. Komarov¹, Yu.E. Boldina¹, Yu.V. Medvedev²

Abstract. Validation of UV-spectrometry assay method for dissolution profile test for levofloxacin tablets was carried out. The evaluated validation characteristics were: specificity, linearity, accuracy, precision, analytical range. It was shown that main validation characteristics meet the Russian State Pharmacopoeia requirements.

Keywords: validation, levofloxacin, UV-spectrophotometry, dissolution profile test.

ВВЕДЕНИЕ

Важнейшее значение для разработки и анализа лекарственных средств (ЛС) в твердых дозированных лекарственных формах имеет испытание «Растворение» (ОФС 42-0003-04) [1], при помощи которого можно осуществлять выбор оптимального состава лекарственной формы, оценивать поведение действующего вещества при проведении сравнительных исследований *in vitro*, контролировать изменения в процессе производства, определять качество готового препарата [2].

Как и любой другой аналитический метод, методики теста «Растворение» должны быть подвергнуты валидации. Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика обеспечивает получение необходимой и достоверной информации об объекте анализа и пригодна для практического использования [3].

Критерии приемлемости основных валидационных характеристик теста «Растворение» различаются в разных нормативных документах (USP, ICH, АРФП), при этом лабораториям рекомендуется разработать

собственную стандартную операционную процедуру по валидации теста «Растворение» на основании указанных документов [1, 4–6]. Валидацию проводят как для собственно теста «Растворение», так и для аналитической методики количественного определения [7]. При этом для теста кинетики растворения по сравнению с показателем «Растворение» рекомендуется валидировать более широкий аналитический диапазон, а также учитывать необходимость проведения исследования в нескольких (обычно с pH 1,2, 4,5, 6,8) средах растворения [7].

Целью данного исследования являлось проведение валидации методики количественного определения левофлоксацина при выполнении теста кинетики растворения. Количественное определение проводили методом УФ-спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Таваник®, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 500 мг («Санофи Винтроп Индустрия», Франция), вспомогательные вещества: натрия стеарилфумарат, гидро-

меллоза, кросповидон; пленочная оболочка: гипромеллоза, макрогол 8000, тальк, титана диоксид, железа оксид красный, железа оксид желтый.

Как и другие фторхинолоны, обладает широким спектром антибактериального действия. Превосходит другие хинолоны по активности в отношении пневмококков, микоплазм и хламидий. Эффективен в отношении микроорганизмов, устойчивых к большинству антибиотиков и сульфаниламидам. Оказывает бактерицидное действие. Применяют преимущественно при инфекциях дыхательных путей [8].

В качестве действующего вещества исследуемое лекарственное средство содержит левофлоксацин: (-)-(S)-9-фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пиперазинил)-7-оксо-7H-пиридо[1,2,3-де]-[1,4]-бензоксазин-6-карбоновой кислоты гемигидрат.

Структурная формула представлена на рисунке 1.

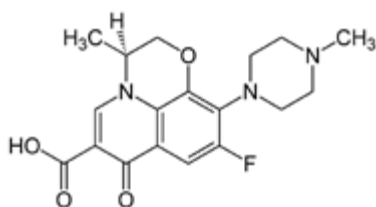


Рисунок 1. Структурная формула левофлоксацина

Согласно опубликованным данным левофлоксацин относится к 1 классу БКС [9, 10].

Оборудование

- УФ-спектрофотометр Agilent Technologies Cary 8454 UV-Vis, США.



Agilent Technologies Cary 8454 UV-Vis

Пробоподготовка

Приготовление сред растворения.

0,1 М раствор хлористоводородной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 500 мл воды очищенной, 8,7 мл хлористоводород-

ной кислоты концентрированной, доводили объем раствора до 1000 мл водой очищенной и тщательно перемешивали.

0,2 М раствор уксусной кислоты

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 200 мл воды очищенной, прибавляли 11,6 мл уксусной кислоты ледяной, давали раствору охладиться до комнатной температуры, доводили объем раствора до метки водой очищенной и тщательно перемешивали.

Ацетатный буферный раствор pH 4,5

В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 2,99 г натрия ацетата тригидрата и растворяли в 200 мл воды очищенной. К полученному раствору прибавляли 14 мл 0,2 М раствора уксусной кислоты, доводили объем раствора до метки водой очищенной и тщательно перемешивали. Измеряли pH раствора на pH-метре, при необходимости доводили pH до 4,5 0,2 М раствором уксусной кислоты или 0,1 М раствором натрия гидроксида.

Фосфатный буферный раствор pH 6,8

4,67 г натрия гидрофосфата и 4,609 г калия дигидрофосфата вносили в мерный стакан вместимостью 1000 мл, прибавляли 400 мл воды очищенной, перемешивали с использованием магнитной мешалки в течение приблизительно 30 мин до полного растворения, затем переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, доводили объем раствора до метки водой очищенной и тщательно перемешивали.

Измеряли pH раствора на pH-метре, при необходимости доводили pH до 6,8 раствором фосфорной кислоты или 0,1 М раствором натрия гидроксида.

Приготовление стандартных растворов

Для приготовления исходного стандартного раствора левофлоксацина 51,0 мг субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты. Содержимое колбы перемешивали до полного растворения навески, объем раствора доводили до метки соответствующей средой растворения и перемешивали. Концентрация приготовленного раствора приблизительно равна 0,5 мг/мл (раствор А). 5,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 200 мл, объем раствора доводили до метки соответствующей средой растворения, перемешивали. Концентрация приготовленного раствора приблизительно равна 0,0125 мг/мл (раствор Б).

Стандартные растворы готовили путем разведения растворов А и Б средой растворения (таблица 1).

Количественное определение проводили методом УФ-спектрофотометрии. Измеряли оптическую плотность стандартных растворов на спектрофотометре в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм в области максимального поглощения при длине волны

294 нм, используя в качестве раствора сравнения среду для растворения.

Таблица 1.

Приготовление стандартных растворов левофлоксацина

Концентрация приготовленного раствора левофлоксацина, мг/мл	Количество компонента, мл	
	Стандартный раствор левофлоксацина	Среда растворения
0,00125	2,5 (Б)	до 25
0,00375	3 (Б)	до 10
0,00625	10 (Б)	до 20
0,00875	14 (Б)	до 20
0,01125	9 (Б)	до 10
0,01375	5,5 (А)	до 200
0,01625	6,5 (А)	до 200

Программное обеспечение

- Agilent UV-Visible ChemStation, ver. B.05.02 [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики

Валидацию методики проводили согласно ГФ XII, том 2, ОФС «Валидация аналитических методик» по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (на двух уровнях: сходимости, промежуточная прецизионность), аналитический диапазон.

Специфичность

Для определения специфичности методики на спектрофотометре последовательно снимали спектры:

– бланка (среда растворения – 0,1М HCl; ацетатный буферный раствор pH 4,5; фосфатный буферный раствор pH 6,8);

– плацебо-раствора (смесь компонентов исследуемого ЛС, не содержащих левофлоксацина);

– стандартного раствора левофлоксацина с концентрацией действующего вещества 100% в приведенных средах растворения.

Определение специфичности проводили в данных средах растворения, т.к. тест «Растворение», согласно «Руководству по экспертизе лекарственных средств», т. 1 [11], проводили в трех средах, моделирующих основные разделы ЖКТ, в которых происходит распада, высвобождение и абсорбция активного ингредиента (0,1 М раствор хлористоводородной кислоты; ацетатный буферный раствор 4,5; фосфатный буферный раствор 6,8).

На полученных спектрах бланков и плацебо не наблюдалось пиков, соответствующих пику левофлоксацина в стандартном растворе с концентрацией действующего вещества 100%. Пример полученных спектров стандартного раствора левофлоксацина и среды растворения приведен ниже на рисунке 2.

Линейность

Проводили измерение оптической плотности 7 образцов стандартных растворов левофлоксацина с концентрациями: 0,00125 мг/мл, 0,00375 мг/мл, 0,00625 мг/мл, 0,00875 мг/мл, 0,01125 мг/мл, 0,01375 мг/мл, 0,01625 мг/мл. Для построения калибровочных кривых использовали линейную регрессию с нормированием $1/x$. Коэффициент корреляции составил 0,9997.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости, от фактических значений приведены в таблице 2.

Правильность и прецизионность

Проводили анализ 3 образцов стандартных растворов левофлоксацина с концентрацией 0,00125 мг/мл, 0,00875 мг/мл, 0,01625 мг/мл. Каждый раствор измеряли на спектрофотометре 5 раз. Исследование проводили в двух последовательностях, с участием двух разных аналитиков. Для полу-

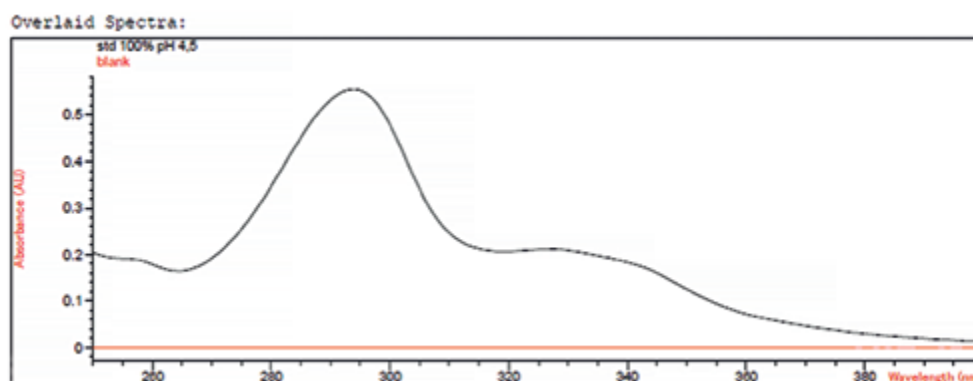


Рисунок 2. Спектры стандартного раствора левофлоксацина с концентрацией действующего вещества 100% и среды растворения ацетатного буферного раствора с pH 4,5

Таблица 2.

Отклонения концентраций калибровочных растворов от фактических значений

Код пробы	Std 10%	Std 30%	Std 50%	Std 70%	Std 90%	Std 110%	Std 130%
$C_{\text{факт}}$, мг/мл	0,00125	0,00375	0,00625	0,00875	0,01125	0,01375	0,01625
$C_{\text{рассчит}}$, мг/мл	0,00126	0,00378	0,00618	0,00879	0,001114	0,01392	0,01618
ϵ , %	-0,9341	-0,7544	1,1441	-0,4003	1,0177	-1,2636	0,4372
Норма	Не более 2,00%						

Таблица 3.

Правильность и прецизионность (сходимость) методики

Введено (мг/мл)	Найдено (мг/мл)	Найдено (мг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	ϵ , % (n=5)
0,00125	0,00126	0,001243	0,00001039	0,83591	0,5530
	0,00124				
	0,00124				
	0,00124				
	0,00124				
0,00875	0,00868	0,008660	0,00007893	0,91145	1,0251
	0,00865				
	0,00861				
	0,00858				
	0,00879				
0,01625	0,01625	0,016190	0,00005121	0,31634	0,3714
	0,01623				
	0,01619				
	0,01615				
	0,01613				

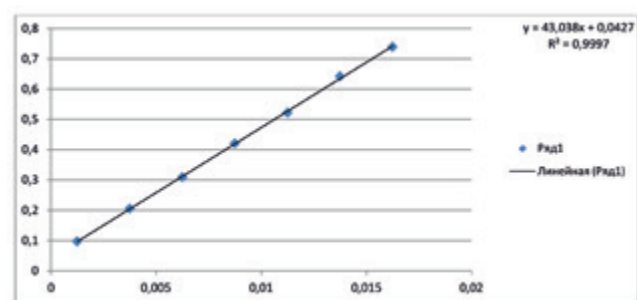


Рисунок 3. Калибровочный график зависимости оптической плотности левофлоксацина от концентрации в растворе

ченных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в таблицах 3 и 4.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (правильность) соответствуют нормам (не более 2,00%).

Аналитический диапазон

Интервал между верхним и нижним значением концентрации анализируемого компонента в пробе, в рамках которого доказана приемлемая правильность, прецизионность и линейность методики, – 0,00125 мг/мл и 0,01625 мг/мл (10% и 130% соответственно).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена валидация методики количественного определения левофлоксацина методом УФ-спектрофотометрии. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитический диапазон. По результатам исследования основные валидационные характеристики соответствуют критериям приемлемости. Методика обладает достаточной точностью и селективностью для проведения теста «Растворение» методом УФ-спектрофотометрии.

Таблица 4.

Правильность и прецизионность
(промежуточная прецизионность) методики

Введено (мг/мл)	Найде- но (мг/мл)	Найдено (мг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD,% (n=5)	ε , % (n=5)
0,00125	0,00126	0,001259	0,000006258	0,4971	-0,7110
	0,00125				
	0,00125				
	0,00126				
	0,00126				
	0,00126				
0,00875	0,00872	0,008655	0,00005157	0,5959	1,0905
	0,00866				
	0,00863				
	0,00858				
	0,00868				
	0,00872				
0,01625	0,01602	0,01608	0,00005445	0,3385	1,0280
	0,01615				
	0,01612				
	0,01608				
	0,01604				
	0,01602				

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный стандарт качества лекарственного средства. ОФС 42-0003-04 «Растворение». – М. 2004.
2. Методические рекомендации для разработчиков и производителей лекарственных средств по изучению сравнительной кинетики растворения твердых дозированных лекарственных форм (Утверждены Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития). – М.: Ремедиум, 2010.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. Т. 2. – М. 2007.
4. И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, К.С. Давыдова. Современные подходы к валидации методик испытания «Растворение» // Химико-фармацевтический журнал. 2011. Т. 45. № 3. С. 92–95.
5. К.С. Давыдова, Ю.И. Кулинич, И.Е. Шохин. Тест «Растворение» в контроле качества лекарственных средств // Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике. 2010. № 5. С. 42–43.
6. USP 33 – NF 28. Monograph 1092 «The Dissolution Procedure: Development and Validation».
7. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. Шохина И.Е. – М.: Перо, 2015. 264 с.
8. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. 16-е изд. – М.: Новая волна, 1216 с.
9. M. Koeppel, R. Cristofolletti, E. Fernandes, S. Storpirtis, H. Junginger, S. Kopp, K. Midha, V. Shah, S. Stavchansky, J. Dressman, D. Barends. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: levofloxacin. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21374601> (дата обращения 20.07.2015).
10. General notes on Biopharmaceutics Classification System (BCS)-based biowaiver applications. URL: http://apps.who.int/prequal/info_applicants/BE/BW_general_2011November.pdf (дата обращения 20.07.2015).
11. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. – М.: Гриф и К., 2013. 328 с.