

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

2 – ООО «Центр
фармацевтической
аналитики» (ООО «ЦФА»),
117246, Россия, г. Москва,
Научный проезд, 20, стр. 3

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

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

2 – Center of Pharmaceutical
Analytics Ltd., 20,
Nauchny Proezd, Moscow,
117246, Russia

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

* адресат для переписки:
E-mail: lvovanna1@yandex.ru

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОКСИФЛОКСАЦИНА ДЛЯ ТЕСТА «РАСТВОРЕНИЕ» МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Л.А. Меньшикова¹, А.А. Львова^{2*}, И.Е. Шохин^{2,3}, Ю.Е. Болдина²,
Т.Н. Комаров², Ю.В. Медведев^{1,2}

Резюме. Проведена валидация методики количественного определения моксифлоксацина. Количественное определение проводили методом УФ-спектрофотометрии. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитическая область. По результатам исследования основные валидационные характеристики метода соответствуют критериям приемлемости, приведенным в ГФ РФ XIII, ОФС «Валидация аналитических методик».

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

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

L.A. Menshikova¹, A.A. Lvova^{2*}, I.E. Shohin^{2,3}, Yu.E. Boldina², T.N. Komarov², Yu.V. Medvedev^{1,2}

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, and analytical range. It was shown that main validation characteristics meet the Russian State Pharmacopoeia XIII requirements.

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

ВВЕДЕНИЕ

Моксифлоксацин является антибактериальным средством группы фторхинолонов IV поколения, обладает бактерицидным действием [1, 2]. С 2012 года моксифлоксацин включён в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов [3].

При разработке и анализе лекарственных средств (ЛС) в твердых дозированных лекарственных формах важное практическое значение имеет испытание «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм» (ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0014.15) (далее – «Растворение») [4]. Данное испытание позволяет 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 [5].

Валидация методики – экспериментальное доказательство того, что методика обеспечивает получение необходимой и достоверной информации об объекте анализа и пригодна для практического использования. Валидация методики теста «Растворение», как и любой аналитической

методики, также проводится по основным валидационным характеристикам [4, 7].

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 [6–9]. Валидацию проводят как для собственно теста «Растворение», так и для аналитической методики количественного определения [7].

Целью данного исследования являлось проведение валидации методики количественного определения моксифлоксацина с последующей оценкой полученных результатов. Количественное определение проводили методом УФ-спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы

В качестве исследуемого соединения была взята субстанция моксифлоксацина: 1-циклопропил-6-фтор-1,4-дигидро-8-метокси-7-[(4aS,7aS)-октагидро-

6Н-пирроло[3,4-в]пиридин-6-ил]-4-оксо-3-хинолинкарбоновая кислота (в виде гидрохлорида) [2]. Структурная формула представлена на рисунке 1.

Согласно опубликованным данным моксифлоксацин относится к 1 классу БКС [11].

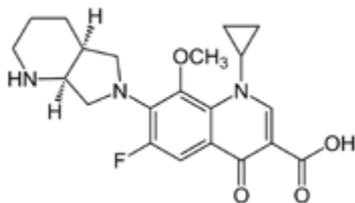


Рисунок 1. Структурная формула моксифлоксацина

Оборудование

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



Agilent Technologies Cary 8454 UV-Vis

Приготовление сред растворения

0,1 М раствор хлористоводородной кислоты. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 500 мл воды очищенной, 8,5 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, доводили объем раствора до 1000 мл водой очищенной и тщательно перемешивали.

Ацетатный буферный раствор с pH 4,5. В мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 2,99 г натрия ацетата безводного и растворяли в 200 мл воды очищенной. К полученному раствору прибавляли 14 мл 2 Н 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 с pH 6,8. 3,40 г калия дигидрофосфата и 3,55 г натрия гидрофосфата вносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяли в 200 мл воды очищенной, доводили водой очищенной до метки. Измеряли pH раствора на pH-метре, при необходимости доводили значение pH до значения 6,8 раствором фосфорной кислоты или 0,1 М раствором натрия гидроксида.

Приготовление стандартных растворов

Для приготовления исходного стандартного раствора моксифлоксацина 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 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты и перемешивали. Концентрация приготовленного раствора приблизительно равна 0,5 мг/мл (раствор А). 5,0 мл полученного раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 200 мл, объем раствора доводили до метки соответствующей средой растворения, перемешивали. Концентрация приготовленного раствора равна 12,5 мкг/мл (раствор Б).

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

Таблица 1.

Приготовление стандартных растворов моксифлоксацина

Концентрация приготовленного раствора моксифлоксацина, мкг/мл	Количество компонента, мл	
	Стандартный раствор левофлоксацина	Среда растворения
1,25	2,5 (Б)	до 25
3,75	3 (Б)	до 10
6,25	10 (Б)	до 20
8,75	14 (Б)	до 20
11,25	9 (Б)	до 10
13,75	5,5 (А)	до 200
16,25	6,5 (А)	до 200

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.

Программное обеспечение

Валидированная автоматическая таблица Microsoft Excel для валидации методики количественного определения;

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

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ

Валидацию методики проводили согласно ГФ РФ XIII, ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик», по следующим характеристикам: специфич-

ность, линейность, правильность, прецизионность (на двух уровнях: сходимость, промежуточная прецизионность), аналитическая область.

Специфичность

Для определения специфичности методики на спектрофотометре последовательно снимали спектры:

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

- стандартного раствора моксифлоксацина 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 распад, 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 не наблюдалось поглощения в диапазоне, соответствующему максимуму поглощения моксифлоксацина в стандартном растворе с концентрацией действующего вещества 100%. Пример полученных спектров стандартного раствора моксифлоксацина и среды растворения приведен на рисунке 2.

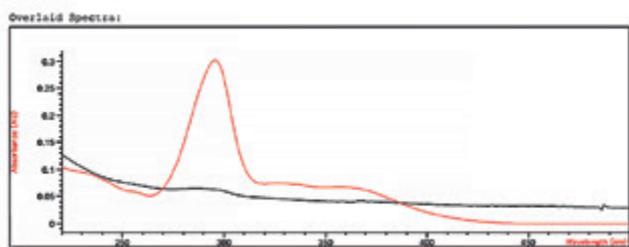


Рисунок 2. Спектры стандартного раствора моксифлоксацина с концентрацией действующего вещества 100% и среды растворения ацетатного буферного раствора с pH 4,5

Линейность

Проводили измерение оптической плотности 7 образцов стандартных растворов моксифлоксацина с концентрациями 1,25 мкг/мл, 3,75 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 8,75 мкг/мл, 11,25 мкг/мл, 13,75 мкг/мл, 16,25 мкг/мл. Для построения калибровочных кривых использовали линейную регрессию с нормированием 1/x. По полученным значениям был построен калибровочный график, приведенный на рисунке 3, совместно с уравнением калибровочной кривой. Коэффициент корреляции составил 0,9999.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанных по уравнению линейной зависи-

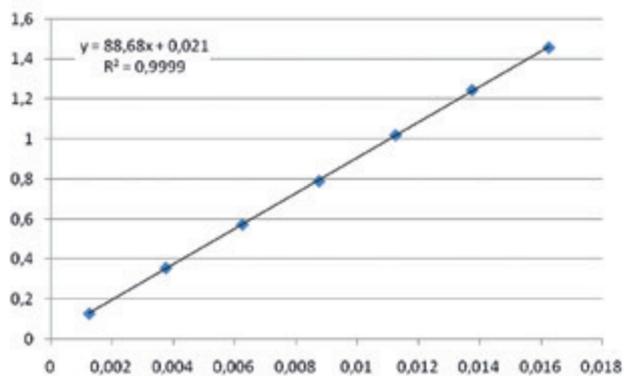


Рисунок 3. Калибровочный график зависимости оптической плотности моксифлоксацина от концентрации в растворе

мости, от фактических значений приведены в таблице 2.

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%
$C_{\text{факт}}$ мкг/мл	1,25	3,75	6,25	8,75	11,25	13,75	16,25
$C_{\text{рассчит}}$ мкг/мл	1,23	3,80	6,24	8,69	11,27	13,81	16,21
$\epsilon, \%$	1,74	-1,23	0,08	0,69	-0,19	-0,47	0,27
Норма	Не более 2,00%						

Правильность и прецизионность

Проводили анализ 3 образцов стандартных растворов моксифлоксацина с концентрацией 1,25 мкг/мл, 8,75 мкг/мл, 16,25 мкг/мл. Каждый раствор измеряли на спектрофотометре 5 раз. Исследование проводили в двух последовательностях с участием двух разных аналитиков. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности ($\epsilon, \%$), приведенные в таблицах 3 и 4.

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

Аналитическая область

Интервал между верхним и нижним значением концентрации анализируемого компонента в пробе, в рамках которого доказана приемлемая правильность, прецизионность и линейность методики, – 1,25 мкг/мл и 16,25 мкг/мл (10% и 130% соответственно).

Таблица 3. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Правильность и прецизионность (сходимость) методики

Введено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл), среднее значение (n=5)	RSD, % (n=5)	ε, % (n=5)
1,25	1,27	1,24	1,57	0,74
	1,25			
	1,24			
	1,23			
	1,22			
8,75	8,63	8,69	1,35	0,59
	8,91			
	8,67			
	8,65			
	8,63			
16,25	16,24	16,19	0,39	0,33
	16,26			
	16,13			
	16,13			
	16,23			

Таблица 4.

Правильность и прецизионность (промежуточная прецизионность) методики

Введено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл), среднее значение (n=10)	RSD, % (n=10)	ε, % (n=10)
1,25	1,27	1,24	1,52	0,74
	1,23			
	1,25			
	1,24			
	1,22			
8,75	8,75	8,69	1,63	0,59
	8,91			
	8,67			
	8,65			
	8,52			
16,25	16,25	16,19	0,41	0,31
	16,26			
	16,13			
	16,23			
	16,13			

Проведена валидация методики количественного определения моксифлоксацина методом УФ-спектрофотометрии. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитическая область. По результатам исследования основные валидационные характеристики соответствуют критериям приемлемости. Методика может быть использована для количественного определения моксифлоксацина методом УФ-спектрофотометрии при проведении теста «Растворение».

ЛИТЕРАТУРА

1. Регистр лекарственных средств России: РЛС. Энциклопедия лекарств. URL: <http://www.rlsnet.ru/> (дата обращения 16.03.16).
2. М.Д. Машковский. Лекарственные средства. 16-е изд. – М.: Новая волна, 1216 с.
3. Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП). Утвержден распоряжением Правительства РФ от 7 декабря 2011 г. № 2199-р. – М. 2011.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд., ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм». – М. 2015.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд., ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». – М. 2015.
6. 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.
7. Тест «Растворение» в разработке и регистрации лекарственных средств. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / Под ред. И.Е. Шохина. – М.: Перо, 2015. 264 с.
8. USP 33 – NF 28. Monograph 1092 «The Dissolution Procedure: Development and Validation».
9. К.С. Давыдов, 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.
10. URL: http://apps.who.int/prequal/info_applicants/BE/BW_general_2012October.pdf (дата обращения 11.11.2015).
11. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. — М.: Гриф и К., 2013. 328 с.