

Н. Д. Бунятян^{1, 2}, Л. Л. Николаева^{1, 3}, Ю. В. Олефир¹,
Е. В. Санарова³, Н. А. Оборотова^{1, 3}, А. Б. Прокофьев^{1, 2},
Е. В. Игнатьева³, И. В. Ярцева³, И. Д. Гулякин³

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРМУСТИНА В ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

¹ ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Минздрава России, Россия, 127051, Москва.

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Россия, 119991, Москва; e-mail: ndbun@mail.ru

³ ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина" Минздрава России, Россия, 115478, Москва.

Приведены результаты валидации методики количественного спектрофотометрического определения ормустина в лиофилизированной лекарственной форме. Показано, что методика пригодна для определения количественного содержания ормустина по параметрам: специфичность, линейность, правильность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность.

Ключевые слова: валидация; спектрофотометрия; ормустин.

Ормустин — оригинальная субстанция из класса нитрозомочевин, которая представляет собой смесь изомеров по положению нитрозогруппы: N^δ-нитрозо-N^δ-[(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитина и N^δ-[(2-хлорэтил)-N-нитрозо-карбамоил]-L-орнитин. На основе данной субстанции в лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина" Минздрава России была разработана лиофилизированная лекарственная форма (ЛФ) ормустина [1].

По химической структуре субстанция ормустина (рис. 1) является производным аминокислоты, содержит в своем составе amino- и карбоксильную группу, легко гидролизует атом хлора и хромофорную нитрозогруппу [2]. Наличие данных групп позволяет использовать различные методы для количественного определения препарата: спектрофотометрию (СФМ), полярографию, хроматографический анализ, а также титрование amino- и карбоксильной группы или иона хлора.

Простым и надежным методом контроля качества лекарственных препаратов является СФМ, так как большинство входящих в их состав веществ поглощают в видимой и УФ-областях оптического диапазона. Применение данного метода отличается высокой достоверностью, воспроизводимостью и точностью, и позволяет значительно упрощать методики количественного анализа. Именно поэтому данный метод выбран для определения количественного содержания ормустина в ЛФ [3, 4].

Важнейшим критерием оценки любой аналитической методики служит доказательство её валидности, включающей взаимосвязанную систему характеристик — специфичность, линейность, правильность и прецизионность [5].

Целью настоящего исследования является проведение валидации количественного спектрофотометрического определения ормустина в лиофилизированной ЛФ.

Экспериментальная часть

Субстанция ормустина (ФГБУН ИОС им. И. Я. Пастера УрО РАН, Россия), "Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг" (ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина" Минздрава России, Россия) [6], Kollidon 17PF (BASF, Германия), кислота соляная х.ч. (ЗАО Мосреактив, Россия), спектрофотометр Cary 100 (Agilent Technologies, США).

Методика количественного определения

Разведение ЛФ. Содержимое флакона растворяют в кислоте хлористоводородной 0,01 М, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора до метки тем же растворителем, перемешивают. Время между началом приготовления испытуемого раствора и измерением оптической плотности не должно превышать 30 мин.

Приготовление раствора стандартного образца. Около 125 мг (точная навеска) субстанции ормустина растворяют в кислоте хлористоводородной 0,01 М, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём раствора до метки тем же растворителем, перемешивают. Время между началом приготовления испытуемого раствора и измерением оптической плотности не должно превышать 30 мин.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора и раствора стандартного образца на спектрофо-

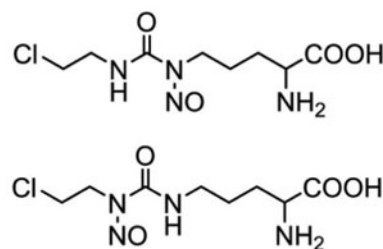


Рис. 1. Структурная формула ормустина

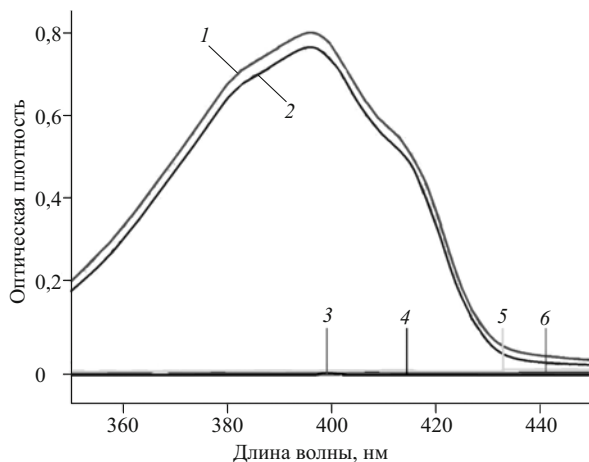


Рис. 2. Электронный спектр поглощения субстанции ормустина (1) и лиофилизированной ЛФ (2), Kollidon 17PF (3) и раствора 0,1 М хлористоводородной кислоты (4), L-орнитина (5) и N-(2-хлорэтил)карбамоил-L-орнитина (6)

тометре в максимуме поглощения при длине волны (396 ± 2) нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения кислоту хлористоводородную 0,01 М.

Содержание ормустина X (мг) во флаконе вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot V_1 \cdot a_0}{D_0 \cdot V_0}$$

где D_1 — оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 — оптическая плотность раствора стандартного образца; V_1 — величина разбавления испытуемого раствора; V_0 — величина разбавления раствора стандартного образца; a_0 — навеска стандартного образца, в миллиграммах.

Результаты и их обсуждение

Электронный спектр субстанции имеет 2 полосы поглощения: одну, интенсивную, с максимумом поглощения вблизи (228 ± 2) нм, и другую, меньшей интенсивности, с максимумом при (396 ± 2) нм. Обе эти по-

Таблица 1
Результаты определения параметров линейной зависимости при количественном определении ормустина в модельных смесях

Концентрация ормустина		Среднее значение оптической плотности, нм	Регрессия
%	мг/мл		
80	20,0	0,625	0,625
90	22,5	0,703	0,702
100	25,0	0,782	0,779
110	27,5	0,86	0,856
120	30,0	0,932	0,933
Статистические характеристики		Результаты	
Наклон прямой (b)		0,0308	
Отрезок на оси ординат (a)		0,0094	
Коэффициент корреляции (r)		0,999856	

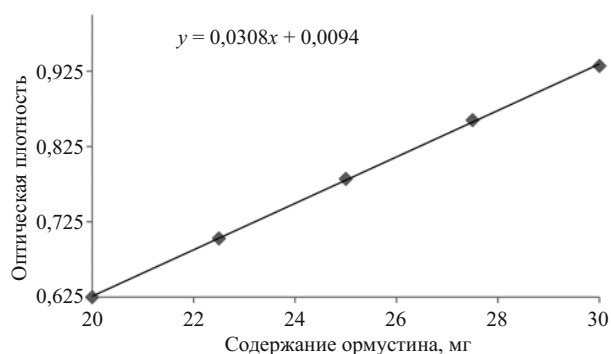


Рис. 3. График регрессивной прямой

лосы можно использовать для количественного определения ормустина, но использование коротковолновой полосы сопряжено с большой возможностью случайных и систематических ошибок. Многие органические соединения, в том числе примеси ормустина, (содержание L-орнитина не более 0,5 % и N-(2-хлорэтил)карбамоил-L-орнитина — не более 0,5 %), имеют максимум поглощения при (230 ± 4) нм, и вспомогательное вещество, входящее в состав ЛФ (Kollidon 17PF с максимумом при (210 ± 4) нм поглощают в этой области спектра. В связи с этим определение содержания ормустина проводили при длине волны (396 ± 2) нм. Кроме того, меньшая интенсивность этой полосы позволяет использовать для измерения более концентрированные растворы, в то время как при измерении оптической плотности в области (228 ± 2) нм приходится использовать более высокое разбавление, что увеличивает погрешность измерений.

Валидацию методики количественного определения проводили в соответствии с установленными требованиями на образцах препарата и модельных смесях, полученных в лабораторных условиях из компонентов препарата, соответствующих требованиям нормативных документов для входного контроля качества. Изучение разработанной методики проводилось по таким валидационным характеристикам, как специфичность, линейность, правильность и прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность). Протокол валидации с установленными критериями приемлемости был разработан в соответствии с утвержденными правилами и рекомендациями.

Основные валидационные критерии, по которым оценивали данную методику: при определении специфичности вспомогательные вещества и растворители не должны препятствовать количественному определению, методика считается линейной, если показатель коэффициента корреляции не ниже 0,995; доверительный интервал должен включать 100 %; коэффициент вариации при определении сходимости и внутрилабораторной прецизионности не должен превышать 2 %.

Специфичность. Для подтверждения специфичности аналитической методики проводили сравнение спектров поглощения действующего и вспомогательных веществ (рис. 2).

Результаты исследования правильности методики количественного спектрофотометрического определения ормустина в ЛФ

Концентрация, %	№ пробы	Масса ормустина, мг		Отклик, %		
		навеска	найденное значение			
80	1	100,6	100,8	100,2		
	2	99,5	99,4	99,9		
	3	99,8	99,6	99,8		
90	1	112,8	112,7	99,91		
	2	112,3	111,7	99,97		
	3	113,0	113,3	100,27		
100	1	125,7	125,3	99,68		
	2	124,7	124,6	99,92		
	3	125,1	124,9	99,84		
110	1	138,0	137,7	99,78		
	2	137,5	136,7	99,42		
	3	137,5	137,7	100,15		
120	1	150,0	149,8	99,87		
	2	150,2	150,6	100,27		
	3	150,0	149,8	99,87		
Статистические характеристики						
\bar{X}	S	S^2	$S_{\bar{x}}, \% (RSD)$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
99,89	0,256	0,066	0,097	0,14	99,89 \pm 0,14	0,14

На рис. 2 показано, что кривая ЛФ и субстанции ормустина схожи, а вспомогательные компоненты не поглощают в выбранном диапазоне. Следовательно, данный метод может использоваться для определения ормустина в ЛФ.

Линейность предложенной методики анализа определяли доказательством линейного соотношения между концентрацией действующего вещества (ормустина) в ЛФ и величиной сигнала (значение оптической плотности). Первоначально изготавливались модельные растворы с концентрацией ормустина от 80 % (20 мг/мл) до 120 % (30 мг/мл) от номинального содержания (25 мг/мл). Затем определяли среднюю оптическую плотность из ряда определений для каждой концентрации и проводили статистическую обработку данных с построением и решением уравнения регрессии вида $y = a + bx$ (табл. 1).

Уравнение регрессии для данной зависимости имеет вид:

$$y = 0,0308x + 0,0094.$$

О достаточно тесной линейной связи между концентрацией ормустина и оптической плотностью говорит близость коэффициента корреляции к 1 (по абсолютной величине). Дополнительным подтверждением линейности зависимости исследуемых величин является графическое изображение регрессионной прямой (рис. 3).

Правильность. Для доказательства правильности аналитической методики проводили количественное определение активного вещества в модельных смесях, отличающихся только содержанием действующего вещества (метод плацебо), в диапазоне концентраций 100 – 150 мг/флакон (80 – 120 %). Оценивали результаты анализа сравнением полученного результата с

ожидаемым значением величины содержания ормустина в модельной смеси, мг.

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, спектрофотометрическая методика определения содержания ормустина в ЛФ признана правильной, так как получаемые результаты близки к истинному значению, доверительный интервал включает 100 % и относительная погрешность единичного результата не превышает 1 %.

Сходимость и промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность. Для изучения сходимости сравнивали результаты, полученные в одинаковых условиях, а именно с использованием одного и того же спектрофотометра одним и тем же исследователем в короткий промежуток времени (табл. 3). Так как количественное содержание действующего вещества должно составлять $(100 \pm 1,5) \%$, то коэффициент вариации

Таблица 3
Результаты определения сходимости аналитической методики количественного определения ормустина в лиофилизированной ЛФ

Серия	Образец	Ормустин, мг/флакон				
07	1	125,07				
	2	125,1				
	3	124,82				
	4	124,95				
	5	125,02				
	6	124,96				
	7	125,08				
Статистические характеристики						
\bar{X}	S	S^2	$S_{\bar{x}}, \% (RSD)$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
125,0	0,01	0,001	0,003	0,09	125,0 \pm 0,09	0,07

Результаты определения промежуточной прецизионности методики количественного определения ормустина в лиофилизированной ЛФ

Серия	Образец	Ормустин, мг/флакон							
		исследователь 1	исследователь 2						
08	1	125,07	125,0						
	2	125,1	125,15						
	3	124,9	124,9						
	4	124,9	125,05						
	5	125,0	125,1						
	6	125,0	125,1						
	7	125,02	124,9						
Статистические характеристики									
№	\bar{X}	S	S^2	$S_{\bar{x}}, \% (RSD)$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$	$F_{\text{практ}}$	$t_{\text{практ}}$
1	125,0	0,08	0,006	0,025	0,07	125,0 \pm 0,07	0,06	1,7	0,6
2	125,03	0,1	0,01	0,03	0,09	125,03 \pm 0,09	0,07		

не должен превышать 1,0 [5], по данным анализа для данного метода количественного определения он составил меньше 1, следовательно, изменчивость вариационного ряда незначительна, и можно сделать вывод о сходимости предложенной методики анализа.

Анализ с целью определения внутрилабораторной прецизионности производился 2 сотрудниками на одинаковых спектрофотометрах с целью показать, что аналитическая методика обеспечивает получение согласующихся результатов независимо от изменений внешних условий при использовании однородных проб (табл. 4).

При сравнении результатов определения содержания ормустина, полученных 2 сотрудниками в разные дни, видно, что различия между средними значениями и стандартными отклонения результатов сотрудников 1 и 2 незначительны ($F(5\%; 6; 6) = 4,28 > F_{\text{практ}} = S_2^2/S_1^2 = 1,7$) и носят случайный характер. Результаты сравнения значения расчетного [7] и табличного значения коэффициента Стьюдента у 2 независимых выборок ($t(5\%; 12) = 2,18 > t_{\text{практ}} = 0,6$) указывают на отсутствие систематических ошибок в методике.

В соответствии с требованиями ОФС “Валидация аналитических методик” проведена валидация спектрофотометрического метода количественного опреде-

ления ормустина в лиофилизированной ЛФ. По результатам внутрилабораторного эксперимента установлено, что метрологические характеристики таких валидационных параметров методики, как специфичность, правильность, сходимость, линейность и внутрилабораторная прецизионность, соответствуют валидационным критериям.

ЛИТЕРАТУРА

1. L. Nikolaeva, N. Oborotova, N. Bunyatyan, et al., *Pharmaceuticals*, **9**(68), 1 – 9 (2016). doi:10.3390 / ph9040068.
2. G. L. Levit, L. B. Radina, V. P. Krasnov, et al., *Pharm. Chem. J.*, **30**(4), 227 – 230 (1996); *Хим.-фарм. журн.*, **30**(4), 227 – 230 (1996).
3. Е. В. Санарова, А. П. Полозкова, Г. А. Меерович и др., *Хим.-фарм. журн.*, **46**(6), 54 – 56 (2012); *Pharm. Chem. J.*, **46**(6), 386 – 388 (2012).
4. Е. В. Игнатъева, Н. А. Дмитричева, И. В. Ярцева и др., *Рос. биотер. ж.*, **15**(1), 43 – 44 (2016).
5. В. В. Береговых, *Валидация аналитических методик для производства лекарств*, Литтерра, Москва (2008).
6. Патент РФ 2569729, Противоопухолевое средство.
7. ОФС. 1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента. <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0013-15-statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-eksperimenta>.

Поступила 15.09.17

VALIDATION OF METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ORMUSTINE IN LYOPHILIZED DOSAGE FORMS

N. D. Bunyatyan^{1,2}, L. L. Nikolaeva^{1,3}, Yu. V. Olefir², E. V. Sanarova³, N. A. Oborotova^{1,3}, A. B. Prokof'ev^{1,2}, E. V. Ignat'eva³, I. V. Yartseva³, and I. D. Gulyakin³

¹ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

² Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia

³ N. N. Blokhin Russian Oncological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia

Results of validation of the method of quantitative spectrophotometric determination of ormustine in lyophilized dosage form are presented. It is shown that the procedure is suitable for determining the quantitative content of ormustine with respect to parameters such as specificity, linearity, accuracy, repeatability and intra-laboratory precision.

Keywords: validation of method; spectrophotometry; ormustine.