

УДК 615.07:615.252.349:54.062:543.42.062

К. Н. ТОРАЕВ, Л. В. ЕВСЕЕВА, С. Н. ГУБАРЬ

*Национальный фармацевтический университет, г. Харьков*

## СТАНДАРТИЗАЦІЯ ТРЕБОВАНИЙ К КОЛИЧЕСТВЕННОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ БЕНФОТИАМИНА В СУБСТАНЦІИ И ГОТОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

*Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения основного вещества в субстанции бенфотиамина и в готовой лекарственной форме (ГЛФ) методом стандарта. Валидационные характеристики методики: линейность, правильность, прецизионность в диапазоне концентраций от 0,006 до 0,016 мг/мл отвечают критериям приемлемости.*

**Ключевые слова:** бенфотиамин, количественное определение, спектрофотометрический метод, валидация, критерии приемлемости.

### ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ

Эффективное лечение сахарного диабета 2-го типа (СД2) – сложнейшая проблема современной медицины. Поскольку заболевание полиорганическое, с вовлечением в патологический процесс многих органов и систем организма, носящее хронический характер, поэтому проведение терапии требует учета основных звеньев патогенеза заболевания и сведения до минимума или предотвращения связанных с ним осложнений.

Результаты ряда отечественных и зарубежных исследований подтверждают эффективность применения препаратов бенфотиамина для лечения диабетической полиневропатии. В настоящее время бенфотиамин используется в клинической практике в комплексной терапии для лечения СД2 [2, 7].

При проведении исследований по разработке и стандартизации препарата в форме таблеток на основе метформина и бенфотиамина для лечения СД2 нами было предварительно изучены показатели качества активных фармацевтических ингредиентов (АФИ), исходя из требований международных рекомендаций и стандартов. Регламентация требований к показателям качества АФИ метформина в виде монографии присутствует в Европейской, Американской, Британской и Японской фармакопеях, а монография

на бенфотиамин пока не включена ни в одну фармакопею. Поэтому актуальным вопросом является разработка и стандартизация требований к качеству как АФИ, так и ГЛФ, в состав которых входит бенфотиамин.

### АНАЛИЗ ПОСЛЕДНИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПУБЛИКАЦИЙ

Требования к показателям качества АФИ бенфотиамина различных производителей позволяют определить основные физико-химические показатели для стандартизации бенфотиамина как фармацевтической субстанции.

На данный момент в Украине зарегистрирована субстанция бенфотиамина производства фирмы «Йонезава Гамари Чемикалз, Лтд», Япония, в соответствии с Государственным реестром лекарственных средств Украины (регистрационное удостоверение № UA/10784/01/01№771, срок действия которого с 15.07.2010 г. по 15.07.2015 г.).

На основании результатов экспериментальных исследований субстанции бенфотиамина (серии №ВТР-У12352), производства фирмы «Йонезава Гамари Чемикалз, Лтд», Япония, а также с учетом спецификаций других производителей и требований Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) к фармацевтическим субстанциям нами были разработаны спецификация и методики входного контроля АФИ бенфотиамина.

© Коллектив авторов, 2015

### ВЫДЕЛЕНИЕ НЕРЕШЕННЫХ РАНЕЕ ЧАСТЕЙ ОБЩЕЙ ПРОБЛЕМЫ

Спектрофотометрический метод широко используется в анализе ЛС и является одним из самых простых и точных методов. Однако, для анализа фармацевтических субстанций с допусками содержания основного вещества  $\pm 1\%$  этот метод не может быть использован из-за очень малого значения допустимой неопределенности анализа ( $\max \Delta_{As}$ ). В этих случаях используются только прямые методы количественного определения [6].

В связи с тем, что для АФИ бенфотиамин допуски содержания основного вещества, как правило, составляют  $\pm 2\%$ , существует возможность использования спектрофотометрической методики количественного определения основного вещества в АФИ бенфотиамин методом стандарта. В соответствии с требованиями ГФУ при разработке методики для целей количественного определения необходимо было разработать процедуру валидации данной методики, провести экспериментальные исследования по изучению метрологических параметров методики, рассчитать валидационные характеристики и соответствие их критериям приемлемости [1].

### ФОРМУЛИРОВАНИЕ ЦЕЛЕЙ СТАТЬИ

Целью нашего исследования является разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения основного вещества в АФИ бенфотиамин и в ГЛФ методом стандарта согласно требований общей статьи 2.2.25 ГФУ «Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» [5]. Для подтверждения того, что аналитическая методика может быть использована для количественного определения бенфотиамин были проверены следующие валидационные характеристики: специфичность, линейность, правиль-

ность, прецизионность в необходимом рабочем диапазоне.

### ИЗЛОЖЕНИЕ ОСНОВНОГО МАТЕРИАЛА ИССЛЕДОВАНИЯ

При разработке методики и изучении валидационных характеристик было использовано аналитическое оборудование: спектрофотометр SPECORD 200 фирмы AnalytecJena, весы аналитические Ohaus Adventurer AR2140 2 класса точности; а также мерная посуда 1 класса точности (класс А).

Согласно литературным данным [9] бенфотиамин стабилен в водных растворах, а также в разбавленных растворах кислот и щелочей. Спектр поглощения водного раствора бенфотиамин в области длин волн от 220 до 350 нм имеет два максимума поглощения: при  $243 \pm 2$  нм и при  $268 \pm 2$  нм (рис. 1). Интерес к максимуму при длине волны 268 нм объясняется необходимостью дальнейшей разработки методик количественного определения бенфотиамин в смеси с другими АФИ, в частности с метформин, который имеет максимум поглощения при  $\lambda = 235$  нм, а при  $\lambda = 268$  нм имеет нулевое поглощение [8].

Измерение оптической плотности растворов бенфотиамин показали, что оптимальная концентрация испытуемого раствора для целей количественного анализа лежит в диапазоне от 0,006 мг/мл до 0,016 мг/мл. Показатели оптической плотности при таких значениях концентрации АФИ колеблются от 0,300 до 0,700 для  $\lambda = 243$  нм и от 0,200 до 0,500 нм для  $\lambda = 268$  нм. В качестве рабочей концентрации была принята концентрация 0,012 мг/мл (рис. 1).

На основании проведенных экспериментальных исследований была разработана спектрофотометрическая методика количественного определения основного вещества в АФИ бенфотиамин и в ГЛФ.

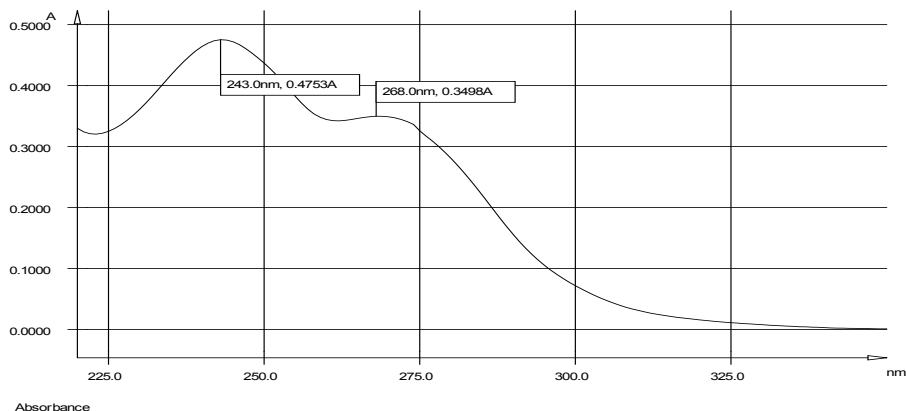


Рис. 1. Спектр поглощения раствора бенфотиамин в воде (0,012 мг/мл)

Методика:

*Испытуемый раствор.* 50,0 мг (точная навеска) субстанции бенфтиамина растворяют в 250 мл воды Р. В мерную колбу на 50 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят до метки водой Р.

*Раствор сравнения.* 50,0 мг (точная навеска) рабочего стандартного образца (РСО) бенфтиамина растворяют в 250 мл воды Р. В мерную колбу на 50 мл помещают 2,0 мл полученного раствора и доводят до метки водой Р.

Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре в области длин волн от 220 до 350 нм.

Для подтверждения того, что аналитическая методика может быть использована для количественного определения бенфотиамина в пределах необходимого диапазона для рабочей концентрации 0,012 мг/мл, нами были проведены исследования по определению аналитической эффективности выбранного метода при двух разных длинах волн: 243 нм и 268 нм.

Валидационные исследования включали доказательство специфичности, линейной зависимости, правильности, прецизионности в необходимом рабочем диапазоне. Кроме того, рассчитана неопределенность методики.

Максимальная допустимая неопределенности методики составляет [1]:

для субстанций с  $V = \pm 2,0\%$  –  $\max \Delta_{As} = 2,0\%$ ;  
для ГЛФ с  $V = \pm 5,0\%$  –  $\max \Delta_{As} = 1,6\%$ .

Неопределенность методики анализа складывается из неопределенности пробоподготовки и неопределенности конечной аналитической операции [1, 4]:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2}$$

Расчеты показали, что неопределенность пробоподготовки разработанной методики составляет 0,94.

Неопределенность спектрофотометрического метода определения, как конечной аналитической операции, была рассчитана в работе Гризодуба А.И и др. [4] и составляет 0,7. Исходя из этой цифры, мы можем рассчитать общую неопределенность методики. Полная неопределенность методики составляет 1,17:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{0,94^2 + 0,7^2} = 1,17.$$

Это значение не превышает предельную допустимую величину как для субстанций с  $V = \pm 2,0\%$ , так и для ГЛФ с  $V = \pm 5,0\%$  и выше.

Для проверки линейной зависимости отклика аналитического сигнала от concentra-

ции обычно используются модельные растворы в диапазоне концентраций от 80 до 120 % от номинального значения (рабочей концентрации) [1]. Однако если спектрофотометрическую методику количественного определения бенфотиамина использовать при дальнейшем исследовании ГЛФ для теста «Растворение», рационально проверить линейность методики в диапазоне от 50 до 130 %.

Для линейности используют, как правило, 5 растворов в диапазоне выбранных концентраций. Для определения прецизионности и правильности в выбранном диапазоне концентраций используют 9 модельных растворов.

Нами проведены исследования линейности методики одновременно с определением параметров прецизионности и правильности на 9-ти модельных растворах. В качестве растворителя использовали воду.

Расчеты и критерии приведены для параметров найдено/введено для нормализованных величин  $Z_i = Y_i/X_i \cdot 100$  (табл. 1).

Модельные растворы готовили из исходного раствора рабочего стандартного образца РСО.

На рис. 2-4 представлены графики линейной зависимости аналитического сигнала от фактической концентрации раствора бенфотиамина, построенные в нормализованных координатах, исходя из данных, представленных в табл. 1.

Для модельных растворов методом наименьших квадратов рассчитаны параметры линейной зависимости: свободный член  $a$ , остаточное стандартное отклонение, коэффициент корреляции. Критерии приемлемости, принятые согласно рекомендациям [1], приведены в табл. 2.

Расчитанные значения параметров линейной зависимости спектрофотометрической методики количественного определения бенфотиамина в диапазоне концентраций от 0,006 мг/мл до 0,016 мг/мл соответствуют критериям приемлемости, что подтверждает линейность методики в выбранном диапазоне концентраций для двух длин волн  $\lambda = 243$  нм и  $\lambda = 268$  нм.

Правильность и прецизионность (точность) изучают на модельных растворах, количественное содержание основного вещества в которых определено относительно стандартного раствора сравнения. Правильность методики оценивается по стандартному отклонению результатов от истинного значения, точность – от среднего значения выборки.

Правильность характеризуется двумя критериями:

– критерий статистической незначимости:

$$\delta\% = \left| \bar{Z} - 100 \right| \leq \frac{\Delta Z}{\sqrt{n}}.$$

Таблиця 1

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ПРАВИЛЬНОСТИ И ПРЕЦИЗИОННОСТИ МЕТОДИКИ В ЗАДАННОМ ДИАПАЗОНЕ НА МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРАХ БЕНФОТИАМИНА**

№ п/п	X <sub>i</sub> ВВЕДЕНО	Y <sub>i</sub> НАЙДЕНО		Z <sub>i</sub> = Y <sub>i</sub> / X <sub>i</sub> * 100%	
	Концентрация, мг/мл	Концентрация, мг/мл (243 нм)	Концентрация, мг/мл (268 нм)	Z <sub>i</sub> при 243 нм	Z <sub>i</sub> при 268 нм
C <sub>ст</sub>	0,0120				
1	0,0064	0,00641	0,00644	100,14	100,56
2	0,0080	0,00792	0,00792	99,03	99,02
3	0,0096	0,00962	0,00963	100,22	100,26
4	0,0104	0,01035	0,01037	99,53	99,76
5	0,0120	0,01185	0,01192	98,77	99,32
6	0,0128	0,01275	0,01277	99,59	99,79
7	0,0136	0,01353	0,01359	99,49	99,93
8	0,0144	0,01433	0,01437	99,54	99,80
9	0,0160	0,01622	0,01623	101,39	101,45
Ср. значение Z <sub>ср</sub>				99,75	99,99
S (стандартное отклонение)				0,77	0,71
Относительное стандартное отклонение S <sub>z</sub> (%) или RSD,%				0,77	0,71
Доверительный интервал, ΔZ=t(95%,8)*S <sub>z</sub> (%)=1,8595*S <sub>z</sub> (%)				1,42	1,01
Систематическая ошибка, δ =  Z <sub>ср</sub> -100				0,25	0,01
Критерий статистической незначимости ΔZ/√9				0,47	0,34

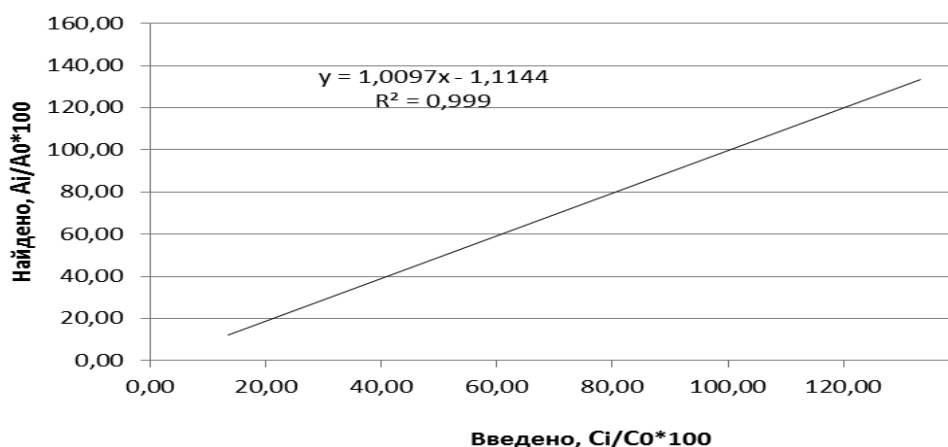


Рис. 2. График линейной зависимости  $Y_i = b \cdot X_i + a$  для бенфотиамина при  $\lambda = 243$  нм (в нормализованных координатах)

Таблиця 2

**ПРОВЕРКА ЛИНЕЙНОСТИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕНФОТИАМИНА В ДИАПАЗОНЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ ОТ 0,006 МГ/МЛ ДО 0,016 МГ/МЛ**

№	Требования		Полученные значения		Вывод
1	Субстанция (B = ±2%)	ГЛФ, КО (B = ±5%)	$\lambda = 243$ нм	$\lambda = 268$ нм	Рассчитанные параметры соответствуют критериям линейности
	$ a  \leq 3,2$ $S_0 \leq 1,06$ $r \geq 0,99702$	$ a  \leq 2,6$ $S_0 \leq 0,84$ $r \geq 0,99810$	$ a  = 1,1144$ RSD, % = 0,77 $S_0 = (RSD/b) = 0,76$ $R^2 = 0,999$ $r = 0,9995$	$ a  = 1,1062$ RSD, % = 0,71 $S_0 = (RSD/b) = 0,70$ $R^2 = 0,9993$ $r = 0,9996$	

– критерий практической незначимости — в случае, если приведенное выше соотношение не выполняется, используют критерий незначимости систематической погрешности ( $\delta$ ) по сравнению с максимально допустимой неопределенностью анализа ( $\max \Delta_{As}$ ):  $|\delta| \% \leq 0,32 \times \max \Delta_{As}$ .

Расчет выполнения критериев правильности приведен в табл. 3.

Критерий прецизионности: односторонний доверительный интервал  $\Delta Z$  не должен превышать полную неопределенность результатов анализа ( $\max \Delta_{As}$ ):

$$\Delta Z = t(95\%, 8) \times S_z(\%) \leq \max \Delta_{As}$$

Расчет выполнения критериев прецизионности (сходимости) приведен в табл. 4.

Из данных, приведенных в табл. 3 и 4, следует, что спектрофотометрическая методика количественного определения бенфотиамина при длинах волн  $\lambda = 243$  нм и при  $\lambda = 268$  нм для АФИ с  $B = \pm 2\%$  и для ГЛФ с  $B = \pm 5\%$  и более не имеет статистически значимой систематической ошибки, характеризуется достаточной правильностью и точностью (прецизионностью) в исследуемом диапазоне концентраций и является корректной.

При изучении стабильности растворов во времени определено, что оптическая плотность растворов остается стабильной в течение 24 часов. Изменение оптической плотности растворов через 24 часа было меньше критерия незначимости по сравнению с максимально допустимой неопределенностью анализа ( $\max \Delta_{As}$ ).

### ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения основного

вещества в АФИ и в ГЛФ бенфотиамина методом стандарта.

2. Валидационные параметры спектрофотометрической методики количественного определения бенфотиамина в диапазоне концентраций от 0,006 до 0,016 мг/мл соответствуют критериям пригодности.

3. Спектрофотометрическая методика количественного определения бенфотиамина может быть использована для определения бенфотиамина в АФИ с допусками содержания основного вещества от 98,0 до 102,0% и для ГЛФ с допусками содержания действующего вещества  $\pm 5,0\%$  и более.

### ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

1. Валідація аналітичних методик і випробувань / Державна Фармакопея України // Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». –1-е вид., 2 допов. – Х. : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – С. 85–100.
2. Верткин А. Л. Преимущества бенфотиамин-содержащих препаратов в лечении диабетической полинейропатии / А. Л. Верткин, В. В. Городецкий // Фарматека. – 2005. – № 10. – С. 1–6.
3. Гризодуб А. И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ / А. И. Гризодуб // Фармаком. – 2002. – № 3. – С. 42–50.
4. Гризодуб А. И. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А. И. Гризодуб, Д. А. Леонтьев, Н. В. Денисен

Таблица 3

#### ВЫПОЛНЕНИЕ КРИТЕРИЕВ ПРАВИЛЬНОСТИ МЕТОДИКИ

Параметр	$\delta =  Z_{cp} - 100 $	Критерий статистической незначимости ( $\Delta Z / \sqrt{9}$ )	Критерий практической незначимости ( $0,32 * \max \Delta_{As}$ )	Вывод
при длине волны $\lambda = 243$ нм	0,25	0,47	$0,32 * 2,0 = 0,64$ (АФИ с $B = \pm 2\%$ )	Рассчитанные параметры соответствуют первому и второму критерию
при длине волны $\lambda = 268$ нм	0,01	0,34	$0,32 * 1,6 = 0,51$ (ГЛС с $B = \pm 5\%$ )	

Таблица 4

#### ВЫПОЛНЕНИЕ КРИТЕРИЕВ ПРЕЦИЗИОННОСТИ МЕТОДИКИ

Параметр	$\Delta Z$	Требования критерия ( $\leq \max \Delta_{As}$ )	Вывод
при длине волны $\lambda = 243$ нм	1,42	$\max \Delta_{As} = 2,0\%$ (АФИ с $B = \pm 2\%$ )	Рассчитанный параметр соответствует критериям для АФИ и для ГЛФ
при длине волны $\lambda = 268$ нм	1,01	$\max \Delta_{As} = 1,6\%$ (ГЛФ с $B = \pm 5\%$ )	

- ко, Ю. В. Подпрудников // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 3 – 17.
5. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х. : РІРЕГ, 2001. – 556 с.
6. Леонтьев Д. А. Метрологический контроль качества результатов измерений / Д. А. Леонтьев, А. И. Гризодуб // Фармаком. – 2007. – № 2. – С. 16–25.
7. Маркина О. А. Значение лекарственной формы и пути введения витаминов группы В для обеспечения эффективного лечения диабетической полиневропатии / О. А. Маркина // Клиническая фармакология и терапия. – 2003. – № 2. – С. 6–9.
8. Подгайний Д. Г. Спектрофотометричне визначення діакамфу та метформіну в антидіабетичному засобі / Д. Г. Подгайний, С. І. Мерзлікін, М. Є. Блажеєвський // Фармаком. – 2009. – № 2. – С. 98–104.
9. Aguilar F. Benfotiamine, thiamine monophosphate chloride and thiamine pyrophosphate chloride, as sources of vitamin B1 added for nutritional purposes to food supplements / F. Aguilar, U. R. Charrondiere, B. Dusemund, P. Galtier // The EFSA Journal. – 2008. – Vol. 864. – P. 8–31.

### УДК 615.07:615.252.349:54.062:543.42.062

#### СТАНДАРТИЗАЦІЯ ВИМОГ ДО КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БЕНФОТІАМІНУ У СУБСТАНЦІЇ І ГОТОВІЙ ЛІКАРСЬКІЙ ФОРМІ

К. Н. Тораєв, Л. В. Євсєєва, С. М. Губарь

Розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення основної речовини в субстанції бенфотіаміну і в готовій лікарській формі (ГЛФ) методом стандарту. Валідаційні характеристики методики: лінійність, правильність, прецизійність в діапазоні концентрацій від 0,006 мг/мл до 0,016 мг/мл відповідають критеріям прийнятності.

**Ключові слова:** бенфотіамін, кількісне визначення, спектрофотометричний метод, валідація, критерії прийнятності.

### UDC 615.07:615.252.349:54.062:543.42.062

#### STANDARDIZATION OF THE REQUIREMENTS TO THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF BENFOTIAMINE IN THE SUBSTANCE AND THE DOSAGE FORM

K. N. Toraev, L. V. Ievsieieva, S. M. Gubar

A spectrophotometric method for assay of the basic substance in a substance benfotiamine and the dosage form (DF) by the method of standard was developed. The validation characteristics: linearity, accuracy, precision in the concentration range from 0,006 mg/ml to 0,016 mg/ml is conformed to the acceptable criteria.

**Key words:** benfotiamine, assay, spectrophotometric method, validation, acceptable criteria.

Адреса для листування:

61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4  
Кафедра управління якістю НФаУ  
Тел. 057 68-56-71

Надійшла до редакції:

14.01.2015 р.