

Спектрофотометричне визначення кількісного вмісту левоміцетину 0,02% в ізотонічному розчині аптечного виготовлення

О.А.Євтіфєєва, А.Ю.Бочкарьова, В.А.Георгіянц

Національний фармацевтичний університет, кафедра якості, стандартизації та сертифікації ліків
Харків, Україна

Проведено валідацію спектрофотометричної методики кількісного визначення ізотонічного розчину левоміцетину 0,02%, виготовленого в умовах аптеки. Валідація була здійснена згідно з вимогами Державної Фармакопеї України. Вивчення валідаційних характеристик методики, статистична обробка отриманих результатів експерименту дозволяють визначити придатність методики для розв'язання поставлених завдань в умовах аптек та лабораторій з контролю якості лікарських засобів.

Ключові слова: валідація аналітичних методик, кількісний аналіз, розчин левоміцетину 0,02% ізотонічний.

Дана екстемпоральна лікарська форма — очні краплі, які виготовляють про запас, що зберігаються готовими до видачі за рецептом або на замовлення. Їх не виготовляють у великих масштабах у промисловому виробництві. Прописують у невеликих кількостях (5–10 мл) з розрахунком використання препарату протягом нетривалого часу. Виготовлення лікарського засобу про запас здійснюється згідно з правилами аптечної технології відповідних лікарських форм. Левоміцетин — антибіотик широкого спектру дії, має бактеріостатичну дію, що й обумовлює його затребуваність в аптечній рецептурі.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

При проведенні дослідження використовували субстанцію левоміцетину (фірма «Lachema a.s.» Чехія), яка відповідає вимогам ВР 98, Eur. Ph. 2000. Для роботи застосовували аналітичне обладнання: спектрофотометр 46 «Ломо»; ваги АВ 204 S/A METTLER TOLEDO, рН-метр РВ-11, фірми «Sartorius AG» (Німеччина); реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, мірний посуд класу А, який відповідає ДОСТу 29228-91 [2].

Спектрофотометричне визначення ізотонічного розчину левоміцетину 0,02% методом стандарту проводили за допомогою вимірювання оптичних густин при обраній довжині хвилі 278 нм розчину випробуваного зразка (A_x) і розчину порівняння (A_{st}) з концентрацією C_{st} і розрахунку концентрації C_x аналізованого компонента, виходячи з формули [6]:

$$Y_i = \frac{C_i}{C_{st}} = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100$$

Вимірювання проводили з використанням кювети завдовжки 1 см при температурі

ВСТУП

Валідація є важливою частиною системи забезпечення і контролю якості лікарських засобів. Згідно з вимогами Державної Фармакопеї України (ДФУ) методики кількісного визначення лікарських засобів повинні бути валідовані. У даний час існує ряд рекомендацій щодо організації процесу валідації методик та її проведення. Але слід враховувати, що для кожного окремого випадку валідація аналітичних методик вимагає індивідуального підходу [4].

Метою роботи було проведення валідації аналітичної методики та аналіз метрологічних характеристик кількісного спектрофотометричного визначення ізотонічного розчину левоміцетину 0,02%. Склад [1]:

- левоміцетину — 0,02 г;
- натрію хлориду — 0,9 г;
- води очищеної до 100 мл.

(20 ± 1) еС за однакових умов з мінімальним інтервалом у часі.

Методика кількісного визначення левоміцетину у лікарській формі.

Розчин порівняння 0,02 г (точна наважка) субстанції поміщали у мірну колбу місткістю 100 мл і суспендували у 5 мл води Р. Коли субстанція цілком була змочена, додавали 70 мл води Р та перемішували до повного розчинення, потім доводили об'єм розчину водою Р до 100,0 мл. 5,0 мл одержаного розчину поміщали у мірну колбу місткістю 50 мл, доводили об'єм водою Р до мітки (готували чотири паралельних розведення).

Випробуваний та модельні розчини готували в умовах аптеки за правилами аптечної технології: m г (точна наважка) субстанції поміщали у мірну колбу місткістю 250 мл, додавали 170 мл води Р та перемішували до повного розчинення, потім доводили об'єм водою Р до мітки. Далі розведення готували за такою самою схемою (готували три паралельних розведення). Кількість натрію хлориду у всіх модельних розчинах вводили відповідно до пропису [9, 11].

Розчин «плацебо»: 0,9 г натрію хлориду поміщали у мірну колбу місткістю 100 мл, доводили об'єм водою Р до мітки. Визначення оптичної густини розчину плацебо проводили тричі.

Відразу після виготовлення вимірювали оптичну густину розчинів випробуваного зразка та зразка порівняння при довжині хвилі 278 нм відносно розчинника – вода Р.

Вимірювання оптичної густини проводили з вийманням кювети.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили відповідно до статті, що наведена в Доповненні 1 ДФУ [5-7].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Існує набір типових валідаційних характеристик, які визначаються безпосередньо та є необхідними у процесі валідації аналітичних методик: правильність, збіжність, специфічність, лінійність, діапазон застосування, відтворюваність [5-7]. Для опрацювання спектрофотометричного методу нами було отримано та вивчено ультрафіолетовий спектр поглинання від 200 нм до 320 нм, характер залежності оптичної густини від концентрації випробуваного розчину у допустимих межах концентрації. Отриманий ультрафіолетовий спектр поглинання свідчить про належність левоміцетину до похідних

p -заміщених нітробензолу [3] і має максимум при довжині хвилі 278 нм, що також відповідає аналітичній довжині хвилі, яку рекомендує Європейська фармакопея [12].

Відповідно до вмісту левоміцетину (0,02%) в лікарській формі й враховуючи вимоги АНД [10] (у нашому випадку $\pm 15\%$) ми обрали діапазон застосування методики від 70 до 130%. У діапазоні цих концентрацій повинно забезпечуватись методикою дотримання вимог до лінійності, відтворюваності у межі припустимих (критичних) статистичних значень для валідаційних характеристик методики [5].

Перед початком експерименту перш за все було проведено теоретичний розрахунок критеріїв прийнятності методики аналізу [5-7, 12]: максимальноприпустимої повної невизначеності методики, яка встановлює $\max \Delta A_s = 4,8\%$, максимальної систематичної похибки – $\max \delta = 1,54$, критичного значення $RSD_0\% = \frac{\max \Delta A_s}{t(95\%, n-2)} = 2,71$, індексу кореляції $R_c = 0,9924$, критичного значення практичної невизначеності вільного члена лінійної залежності – $a = 5,12$.

Вплив плацебо визначали, вимірюючи оптичну густину (A_{blank}) розчину натрію хлориду 0,9% тричі з вийманням кювети. Паралельно вимірювали оптичну густину розчину порівняння (A_{st}). Було визначено середнє значення оптичної густини розчину плацебо $A_{blank} = 0,0013$; $A_{st} = 0,601$. Критерієм незначимості впливу плацебо є виконання нерівності $\delta_{exc} \leq \max \delta = 0,32 \times \max \Delta A_s = 0,5\%$. У даному випадку вплив плацебо у сумарне поглинання препарату становить $\delta_{exc} = \frac{100 \times 0,0013}{0,601} = 0,22\%$. За отриманими результатами маємо нерівність

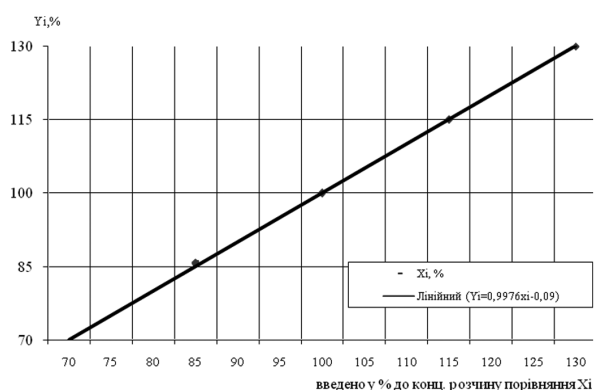


Рис. 1. Графік залежності оптичної густини від концентрації левоміцетину в нормалізованих координатах.

ТАБЛИЦЯ 1

Результати аналізу модельних розчинів для визначення левоміцетину та результати їх статистичної обробки

№ модельного розчину	Наважки левоміцетину, мг ($m_{ст} = 0,0200$)	Введено у % до концентрації розчину порівняння ($X_{іфакт} \%$)	Оптичні густини A_i ($A_{ст} = 0,601$)	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння ($Y_i \%$)	Знайдено у % до введеного $Z_i = 100(Y_i/X_i)$
1	0,0348	69,60	0,418	69,55	99,93
2			0,419	69,72	100,17
3			0,420	69,88	100,41
4	0,0430	86,00	0,515	85,69	99,64
5			0,514	85,52	99,45
6			0,516	85,86	99,83
7	0,0502	100,40	0,601	100,00	99,60
8			0,600	99,83	99,44
9			0,602	100,17	99,77
10	0,0575	115,00	0,692	115,14	100,12
11			0,691	114,98	99,98
12			0,692	115,14	100,12
13	0,0651	130,20	0,780	129,78	99,68
14			0,782	130,12	99,94
15			0,781	129,95	99,81
середнє Z%					99,86
відносне стандартне відхилення, $S_z \%$					0,28
відносний довірчий інтервал, $\Delta_{кс} \% = t(95\%, 14) * S_z$					0,49
критичне значення для збіжності результатів, $\Delta_{кс} \%$					4,80%
систематична похибка, δ					0,14
критерій невизначеності систематичної похибки: 1) $\delta \leq \Delta_{кс} / \sqrt{n} = 1,54 / \sqrt{15}$, 2) якщо не виконується 1, то $\delta \leq 1,54$					0,40
загальний висновок про методику					коректна

0,22% ≤ 0,5%, тобто фонове поглинання є незначущим, і методика характеризується припустимою специфічністю.

Оцінку лінійної залежності проводили на всьому діапазоні застосування методики. Вивчення характеру залежності оптичної густини від концентрації проводили, використовуючи 15 модельних розчинів для аналізу, тобто 5 аналітичних розчинів з точними наважками концентрацій: 70%, 85%, 100%, 115%, 130% з подальшим приготуванням на основі кожного по три паралельних розведення (більш детально ця стандартизована процедура описана в роботі) [8]. Побудову калібрувального графіку проводили в нормалізованих координатах [5-

7] (рис. 1). Для кожного з п'яти розчинів зразка розраховували середні значення оптичної густини (A_i). Одержані результати обробляли методом найменших квадратів для прямої $Y = b \times x + a$ згідно з вимогами ДФУ. Розраховані статистичні величини b, S_b, a, S_a, S_r (залишкове стандартне відхилення) та r (коефіцієнт кореляції) – наведені на рис. 1 та в табл. 1.

Вимоги до параметрів лінійної залежності у даному випадку виконуються на всьому діапазоні застосування методики (70-130%).

Для проведення вимірів та розрахунку метрологічної оцінки збіжності та правильності методики було одержано чотири значення оптичних густин для розчину порівняння та

ТАБЛИЦЯ 2

Результати визначення впливу коливання рН на поглинання оптичної густини аналітичними розчинами

№ розчину	Оптичні густини A_i^*			Середнє	$S_{r\text{pH}}$	RSD _{r^{рН}} %	$\Delta_{r\text{pH}} \%$	max δ , %
	Випробування 1: +1 крп. 0,01 М НСl	Випробування 2: без додавання	Випробування 3: +1 крп. 0,01 М NaOH					
1	0,5153	0,5148	0,5160	0,5154	0,0006	0,06	0,18	1,54
2	0,5998	0,6011	0,5999	0,6003	0,0007	0,07	0,21	
3	0,6930	0,6900	0,6938	0,6923	0,0020	0,20	0,58	

Примітка: * – значення оптичної густини є середнім з вимірів розчину.

ТАБЛИЦЯ 3

Стабільність у часі досліджуваного розчину та розчину порівняння

Розчин	Термін дослідження стабільності n , хв. (A_i)*					Середнє	RSD _r , %	Δ_r , %	max δ , %
	0	15	30	45	60				
досліджуваний	0,6000	0,5990	0,6040	0,6040	0,6010	0,6024	0,41	0,87	1,54
порівняння	0,5980	0,6000	0,6000	0,6030	0,6020	0,6006	0,32	0,69	

Примітка: * – значення оптичної густини є середнім 3 вимірів розчину.

15 значень оптичних густин модельних розчинів. Отримані результати наведені в табл. 1.

Для оцінки робасності проводили дослідження впливу рН середовища на стабільність оптичного поглинання модельних розчинів (85%, 100%, 115%), при цьому відтворювали коливання рН \pm 10% (від 5,38 до 6,58). Було здійснено 3 випробування для визначення впливу рН середовища аналізованих розчинів: випробування 1 – додали по 1 краплі 0,01 М розчину НСІ; випробування 2 – без додавання; випробування 3 – додали по 1 краплі 0,01 М розчину NaOH. Для отриманих модельних розчинів вимірювали оптичну густину при обраній довжині хвилі.

Статистичні результати впливу коливань рН на результати аналізу наведено в табл. 2 та свідчать, що дана методика надійна при її виконанні в зазначених умовах.

ТАБЛИЦЯ 4

Результати дослідження відтворюваності методики

№ випробуваного розчину	Величини Z_i	
	Лаб. 1	Лаб. 2
1	99,83	99,4
2	100,17	99,98
3	100,41	99,69
4	99,64	99,75
5	99,45	99,99
6	99,83	99,99
7	99,6	100,21
8	99,44	99,8
9	99,77	100
10	100,12	100,19
11	99,98	99,84
12	100,12	99,84
13	99,68	100,79
14	99,94	100,79
15	99,81	100,95
Середнє	99,86	100,08
Об'єднане середнє, $Z_{\text{інтра}}$, %	99,97	
$S_{\text{інтра}}$, %	0,30	0,46
$SD_{\text{інтра}}$, %	0,39	
Міжлабораторна систематична похибка, д	0,03	
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_{\text{інтра}}$, %	0,21	

Перевірку стабільності аналітичного розчину проводили протягом години. Отримані результати наведені в табл. 3. Статистична оцінка впливу часу на аналізований розчин відповідає критеріям прийнятності, тобто не перевищує систематичну похибку max δ , %=1,54.

Щоб дослідити відтворюваність методики за методом стандарту в умовах іншої лабораторії, були проведені вимірювання оптичної густини розчинів однієї аналітичної серії на іншому обладнанні, в різні дні, у двох різних лабораторіях, різними аналітиками. Отримані результати, наведені в табл. 4, являють собою результати порівняння статистичних відхилень двох різних вимірювань і свідчать, що дана методика може бути коректно відтворена в іншій лабораторії.

Прогноз повної невизначеності методики розраховували за формулою: $\Delta As = \sqrt{(\Delta_{sp}^2 + \Delta_{FAO}^2)}$. Невизначеність кінцевої аналітичної операції у нашому випадку (спектрофотометрії) становить: $\Delta_{FAO} = 0,70\%$ [4, 8], невизначеність пробопідготовки за ДФУ [6] – $\Delta_{sp} = 1,40\%$, тобто $\Delta As = 1,57\%$ та відповідає вимогам $\Delta_{As} = 1,57\% \leq \max \Delta_{As} = 4,8\%$.

Статистичну обробку одержаних результатів експерименту проводили за схемою, наведеною в ДФУ [5-7].

ВИСНОВКИ

1. Здійснено валідацію аналітичної методики кількісного визначення ізотонічного розчину левоміцетину 0,02% аптечного виготовлення за валідаційними характеристиками: специфічність, робасність, лінійність, правильність, збіжність та відтворюваність. Отримані метрологічні характеристики методики не перевищують критерії прийнятності відповідно до ДФУ.

2. На основі отриманих результатів експерименту методика може бути використана при аналізі даної лікарської форми в умовах аптек та лабораторій з контролю якості лікарських засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек: Методичні рекомендації (затверджено наказом МОЗ України від 3 серпня 2005 р. №391). — 2-е вид. — Київ: МОЗ України, 2005. — 98 с.
2. ГОСТ 29228-91. Посуда лабораторная стеклянная. — М.: Изд-во стандартов, 1992. — 9 с.
3. Государственная фармакопея СССР. — 10-е изд. — М.: Медицина, 1968. — 1080 с.
4. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Подпужников Ю.В. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта // Фармаком. — 2004. — №3. — С. 3-17.
5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — Доповнення 1. — Харків: РІРЕГ. — 2004. — 520 с.
7. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — Доповнення 2. — Харків: РІРЕГ. — 2008. — 608 с.
8. Евтифеева О.А., Георгиянц В.А. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения эктемпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества // Фармаком. — 2007. — №1. — С. 69-81.
9. Максютин Н.П., Каган Ф.Е., Кириченко Л.А., Митченко Ф.А. Методы анализа лекарств. — К.: Здоров'я, 1984. — 224 с.
10. Наказ МОЗ України «Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки» від 15.12.2004 р. №626. // Єженедельник «Аптека». — 2005. — №3. — С. 74-76.
11. Справочник провизора-аналитика / Под ред. Д.С.Волоха, Н.П.Максютинной. — К.: Здоровье, 1989. — 200 с.
12. European Pharmacopoeia. — 5th ed. — Electronic version. — 2779 p.
13. Pharmaceutical analysis. Takeru Higuchi and einar brochmann-hanssen — New York-London-Sydney: INTERSINCEN PUBLISHERS, 2002. — P. 574-578.
14. Technical guide for the elaboration of monographs, European Pharmacopoeia. — 4th Edition. — 2005. — 67 p.

О.А.Евтифеева, А.Ю.Бочкарева, В.А.Георгиянц. Спектрофотометрическое определение количественного содержания левомицетина 0,02% в изотоническом растворе аптечного изготовления. Харьков, Украина.

Ключевые слова: валидация аналитических методик, количественный анализ, раствор левомицетина 0,02% изотонический.

Проведена валидация аналитической методики количественного определения изотонического раствора левомицетина 0,02% спектрофотометрическим методом, изготовленного в условиях аптеки. Валидация была проведена согласно требованиям Государственной Фармакопеи Украины. Изучение валидационных характеристик методики, статистическая обработка полученных результатов эксперимента позволяют определить пригодность методики для решения поставленных задач в условиях аптек и лабораторий по контролю качества лекарственных средств.

О.А.Evtifeyeva, A.Yu.Bochkarova, V.A.Georgiyants. Spectrophotometric quantitative determination of the pharmacy medicinal isotonic solution of the laevomycetin 0,02%. Kharkiv, Ukraine.

Key words: validation of the analytical method, quantitative analysis, isotonic solution of the laevomycetin 0,02%.

The validation of the analytical method of the quantitative determination of the isotonic solution with laevomycetin 0,02% is conducted. The validation was carried out under the scheme that is resulted in the State Pharmacopoeia of Ukraine. Definition of the parameters of the validation, the statistical treatment of received experimental results was carried out. It has allowed coming to conclusion about suitability of the given method for the decision of a task in view in the conditions of chemist's shops and the state laboratories.

Надійшла до редакції 01.02.2009 р.