

УДК 615.074

А. А. Кучинская¹, Н. И. Заяц²¹Борисовский завод медицинских препаратов²Белорусский государственный технологический университет**ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА
В ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ «ХЛОРОПИРАМИН, КРЕМ»**

Статья посвящена валидации методики количественного определения действующего вещества – хлоропирамина – в лекарственном средстве (ЛС) «Хлоропирамин, крем для наружного применения 10 мг/г».

Цель исследования – документально подтвердить данными по валидации, что спектрофотометрическая методика пригодна для количественного определения содержания хлоропирамина гидрохлорида в ЛС «Хлоропирамин, крем для наружного применения 10 мг/г» и позволяет получать результаты с требуемыми метрологическими характеристиками.

Объектом исследования являлись опытные образцы ЛС «Хлоропирамин, крем для наружного применения 10 мг/г». Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре РВ 2201А. Для проведения валидации был разработан план валидации, включающий определение следующих валидационных характеристик: избирательность, правильность, диапазон применения, линейность и прецизионность (повторяемость и внутрिलाбораторная воспроизводимость). Для каждой валидационной характеристики были рассчитаны критерии приемлемости. В соответствии с разработанным планом были проведены экспериментальные исследования, установлены валидационные характеристики и их соответствие критериям приемлемости.

Результатами валидации, проведенной в соответствии с ТКП 030-2013 (02040), подтверждена пригодность применения УФ-спектрофотометрической методики для количественного определения хлоропирамина гидрохлорида в ЛС «Хлоропирамин, крем для наружного применения 10 мг/г».

Ключевые слова: валидация, хлоропирамин, крем, количественное содержание, валидационные характеристики, критерии приемлемости.

A. A. Kuchinskaya¹, N. I. Zayats²¹Borisev Factory of Medical Preparations²Belarusian State Technological University**VALIDATION OF THE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD
OF DETERMINATION OF DRUG SUBSTANCE IN MEDICINE
“CHLOROPYRAMINUM, CREAM”**

The article is devoted to validation of method of quantitative determination of drug substance – chloropyramine in medicine “Chloropyraminum, cream for external application, 10 mg/g”.

The research purpose was to confirm documentarily that a spectrophotometric method is suitable for quantitative determination of chloropyramine hydrochloride in medicine “Chloropyraminum, cream for external application, 10 mg/g” and allows getting results with the required metrology characteristics. The research objects were the samples of medicine “Chloropyraminum, cream for external application, 10 mg/g”. The absorbance measurements were conducted at the spectrophotometer of RV 2201A.

It was developed the plan of validation, including the determination of the following validation characteristics: selectivity, trueness, application range, linearity and precision (repeatability and reproducibility within the laboratory). For every validation characteristic the criteria of acceptability were calculated. In accordance with the developed plan the experimental researches were carried out and it was found out that validation characteristics were in the accordance with the criteria of acceptability. As a result of validation which was carried out in accordance with ТКП 030-2013 (02040) it was confirmed that spectrophotometric method for determination of chloropyramine hydrochloride in medicine “Chloropyraminum, cream for external application, 10 mg/g” is available.

Key words: validation, chloropyramine, cream, quantitative analysis, validation characteristics, criteria of acceptability.

Введение. «Хлоропирамин» (супрастин) – один из самых широко применяемых седативных антигистаминных препаратов. Обладает значительной антигистаминной активностью,

периферическим антихолинергическим и умеренным спазмолитическим действием. Эффективен в большинстве случаев для лечения сезонного и круглогодичного аллергического

риноконъюнктивита, отека Квинке, крапивницы, атопического дерматита, экземы, зуда различной этиологии; в парентеральной форме – для лечения острых аллергических состояний, требующих неотложной помощи. Лекарственный препарат производят в различных лекарственных формах (таблетки, растворы для инъекций, мази, кремы) и он имеет множество торговых названий («Хлоропирамин», «Супрастин», «Аллергозан» и др.).

Лекарственное средство «Хлоропирамин-крем» – крем белого цвета, однородной консистенции, в состав которого входят: хлоропирамина гидрохлорид, полиэтиленгликоль 400, полиэтиленгликоль 4000.

Действующим веществом ЛС является хлоропирамина гидрохлорид (N-[(4-хлорфенил)метил]-N',N'-диметил-N-2-пиридинил-1,2-этандиамина гидрохлорид) – белый или почти белый кристаллический порошок со слабым запахом, легко растворим в воде и хлороформе, растворим в 96%-ном спирте.

Количественное определение хлоропирамина гидрохлорида можно проводить двумя методами: спектрофотометрическим и методом неводного титрования с хлорной кислотой.

Метод неводного титрования основан на реакции хлоропирамина гидрохлорида с ацетатом ртути (II), образовавшийся ацетат хлоропирамина оттитровывают 0,1 М раствором хлорной кислоты до появления зеленого окрашивания (индикатор – 0,1%-ный раствор кристаллического фиолетового).

Основными недостатками метода неводного титрования являются использование герметизированной титровальной установки и токсичных летучих растворителей.

Спектрофотометрический метод определения основан на способности растворов хлоропирамина гидрохлорида поглощать УФ-излучение, при этом максимум поглощения наблюдается при длине волны (λ_{\max}), равной 244 нм.

Для подтверждения пригодности аналитических методик предусмотрена процедура валидации, которая включает в себя следующие этапы: разработка плана валидации, проведение экспериментальных исследований, статистическая обработка результатов и оформление отчета по валидации.

Цель данной работы – документально подтвердить данными по валидации, что спектрофотометрическая методика пригодна для количественного определения содержания хлоропирамина гидрохлорида в ЛС «Хлоропирамин, крем для наружного применения 10 мг/г» и позволяет получать результаты с требуемыми метрологическими характеристиками.

Основная часть. Объектами исследований являлись опытные образцы ЛС «Хлоропирамин, крем для наружного применения 10 мг/г». Компоненты кремовой основы ЛС: полиэтиленгликоль 400; полиэтиленгликоль 4000.

Для приготовления испытуемого раствора 1,000 г ЛС растворяли в 50,0 мл 96%-ного спирта. 5,0 мл полученного раствора доводили до 100,0 мл 96%-ным спиртом и перемешивали.

В качестве раствора стандартного образца (СО) хлоропирамина гидрохлорида брали 0,050 г хлоропирамина гидрохлорида, растворяли в 50,0 мл 96%-ного спирта; 1,0 мл полученного раствора доводили до 100,0 мл 96%-ным спиртом и перемешивали. Раствор сравнения: 96%-ный спирт. Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре РВ 2201А. Условия проведения измерений: длина волны 244 нм; кювета с толщиной слоя 10 мм. По результатам измерений оптических плотностей испытуемого раствора и раствора СО хлоропирамина гидрохлорида рассчитывали концентрация хлоропирамина гидрохлорида в ЛС.

Результаты и обсуждение. В качестве валидационных характеристик были выбраны: избирательность, правильность, диапазон применения, линейность и прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная воспроизводимость).

В соответствии с рекомендациями [1–2] для каждой валидационной характеристики были установлены критерии валидации, представленные в таблице ниже.

Избирательность определяли путем сравнения оптической плотности раствора «плацебо» и раствора препарата при аналитической длине волны 244 нм. Критерий приемлемости – компоненты «плацебо» не должны влиять на определение хлоропирамина гидрохлорида в ЛС.

Для определения линейности методики в пределах диапазона применения (70–130% от номинального содержания хлоропирамина гидрохлорида) проводили анализ на 5 уровнях концентраций: 0,007, 0,008, 0,010, 0,012, 0,013 мг/мл, что соответствует 70, 80, 100, 120 и 130% от номинального содержания хлоропирамина гидрохлорида в ЛС соответственно. Используя нормализованные координаты, методом наименьших квадратов рассчитывали уравнение линейной зависимости:

$$A_i/A_{st} \cdot 100 = b(C_i / C_{st}) \cdot 100 + a,$$

где A_i – оптическая плотность; A_{st} – оптическая плотность 100% для заданных значений аргумента; C_i – концентрация, C_{st} – концентрация 100%.

В соответствии с рекомендациями, приведенными в [2], помимо требований к коэффициенту корреляции и остаточному стандартному отклонению (RSD_0) были рассчитаны критерии приемлемости для свободного члена a , так как для спектрофотометрии обязательно определить, проходит ли прямая линия через начало координат.

Повторяемость оценивалась по результатам 6 параллельных анализов, выполненных на одной серии ЛС в течение одного дня в одних и тех же условиях. Критерий приемлемости – относительное стандартное отклонение (RSD , %) для определений не должно превышать 2,0%.

Внутрилабораторная воспроизводимость оценивалась по результатам 6 параллельных анализов одной серии ЛС, проводимых двумя аналитиками в разные дни. В качестве результатов испытаний, выполненных одним из аналитиков, используются результаты, полученные при определении повторяемости. Результаты испытаний проверялись на однородность выборки по Q -тесту. Для выявления статистически значимых различий между дисперсиями и средними арифметическими значениями результатов двух серий, полученных в разных условиях, использовали критерии Фишера и Стьюдента. Критерии приемлемости – расчетные значения критерия Фишера и критерия Стьюдента не должны превышать табличных значений для доверительной вероятности 95% и заданного числа измерений; относительное стандартное отклонение результатов (RSD , %), рассчитанное для количественного содержания хлоропирамина гидрохлорида, полученное в условиях повторяемости, не должно превышать 2,0%.

Правильность методики количественного определения проверялась путем испытаний модельных растворов, приготовленных с известным количеством хлоропирамина гидрохлорида для трех концентраций, входящих в диапазон применения методики: 8,0; 10,0; 12,0 мг/г (80; 100; 120% от номинального содержания хлоропирамина гидрохлорида) с использованием 6 воспроизведений для каждой концентрации. Подтверждение правильности полученных данных осуществлялось путем вычисления смещения $|x_{\text{ср}} - \mu|$, проверки значимости отличия случайной величины $x_{\text{ср}}$ от константы μ и среднего значения степени восстановления (\bar{Z}). Критерий приемлемости – процент восстановления, полученный при анализе растворов с содержанием активного вещества 80, 100 и 120%, скорректированный на 100%, должен находиться в пределах от 95,0 до 105,0%; сме-

щение результата измерения, отнесенное к абсолютному СКО среднего значения, не должно превышать значения критерия Стьюдента для доверительной вероятности $P = 95\%$ и заданного числа измерений.

При определении специфичности методики было установлено, что компоненты раствора плацебо не имеют абсорбции при длине волны 244 нм и методика определения количественного содержания хлоропирамина в ЛС избирательна по отношению к определяемому компоненту.

При статистической обработке линейной зависимости полученных значений содержания хлоропирамина гидрохлорида от заданного содержания коэффициент корреляции линейного регрессионного графика составил 0,999, значение свободного члена – 1,63, остаточное стандартное отклонение – 0,0015. Таким образом, методика линейна в диапазоне 70–130%, что соответствует концентрации рабочих растворов 0,007–0,013 мг/мл хлоропирамина.

Установлена сходимость (повторяемость) методики испытания количественного определения хлоропирамина гидрохлорида. Относительное стандартное отклонение среднего значения (RSD , %), рассчитанное для содержания хлоропирамина гидрохлорида в ЛС и полученное в условиях повторяемости, составило 0,23%, что соответствует критерию приемлемости – не более 2,0%.

Подтверждена внутрилабораторная воспроизводимость методики: расчетные значения критериев Фишера и Стьюдента не превышает предельных значений; относительное стандартное отклонение среднего значения (RSD , %) для результатов количественного определения хлоропирамина гидрохлорида равно 0,3% в ЛС, что соответствует критерию приемлемости – не более 2,0%.

Правильность методики подтверждена соответствующими испытаниями на модельных образцах для трех концентраций, входящих в диапазон применения методики испытаний, при 6 повторениях. Полученные результаты определения не имеют выбросов – выборки однородны. Средний процент восстановления (\bar{Z}) составил 97,99%, что соответствует установленному критерию приемлемости 95,0–105,0%. Смещение результата измерения, отнесенное к абсолютному СКО среднего значения, не превышает значения критерия Стьюдента для $P = 95\%$ и заданного числа измерений.

Результаты определения валидационных характеристик и показателей точности методики количественного определения хлоропирамина гидрохлорида представлены в таблице.

Результаты валидации (диапазон $D = 70\text{--}120\%$, допуск содержания $B = \pm 5\%$, $n = 6$)

Валидационный критерий	Полученное значение	Критическое значение
Специфичность Компоненты «плацебо» не должны искажать результат	Соответствует	–
Линейность: $y = bx + a$ Остаточное стандартное отклонение $RSD_0 \leq \frac{b \cdot 0,32 \cdot B}{t_{(0,95;n-2)}}, \%$ Свободный член $ a \leq \Delta_a = t_{(0,95;n-2)} \cdot RSD_a$	0,0015 1,63	$\max RSD_0 = 0,497$ $\max a = 3,17$
Коэффициент корреляции $r \geq \sqrt{1 - \frac{b \cdot 0,32 \cdot B / t_{(0,95;n-2)}}{RSD_y}}$	0,999	$\min r = 0,99$
Правильность Процент восстановления $\bar{Z}, \%$ Критерий Стьюдента	$\bar{Z} = 97,99$ $t_0 = 1,75$	$\bar{Z} = 95 - 105$ $t_{(0,95;5)} = 2,57$
Повторяемость Коэффициент вариации RSD, %	0,23	$\max RSD = 2$
Промежуточная прецизионность Коэффициент вариации RSD, % Критерий Стьюдента $t_0 \leq t_{(0,95;f)}$ Критерий Фишера $F_0 \leq F_{(0,95;f_1;f_2)}$	0,30 0,13 1,71	$\max RSD = 2\%$ $t_{(0,95;10)} = 2,23$ $F_{(0,95;5;5)} = 5,05$

Заключение. Результаты валидации подтверждена пригодность применения спектрофотометрической методики для количественно-

го определения хлоропирамина гидрохлорида в ЛС «Хлоропирамин, крем для наружного применения 10 мг/г».

Литература

1. Квалификация лабораторного оборудования – метрологическая концепция / Д. А. Леонтьев [и др.] // Фармацевтическая отрасль. 2013. № 5. С. 116–120.
2. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: метод. рекомендации. М.: Спорт и культура – 2000, 2007. 192 с.

References

1. Leontiev D. A., Grizodub A. I., Zinchenko A. A., Dorunda I. M., Zinchenko I. A. Qualification of laboratory equipment – metrological conception. *Pharmaceuticheskaja otrast'* [Pharmaceutical field], 2013, no. 5, pp. 116–120 (In Russian).
2. *Rukovodstvo dlya predpriyatij farmatsevticheskoy promyshlennosti: metod. rekomenatsii* [Guide for enterprises of pharmaceutical field: methodological recommendations]. Moscow, Sport and culture – 2000, 2007. 192 p.

Информация об авторах

Кучинская Анна Александровна – инженер. Борисовский завод медицинских препаратов. (222120, Минская область, г. Борисов, ул. Чапаева, 64/27, Республика Беларусь). E-mail: Anechka.kuchinskaya@mail.ru

Заяц Наталия Ивановна – кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры физико-химических методов сертификации продукции. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: Zayatsni@belstu.by

Information about the authors

Kuchinskaja Anna Aleksandrovna – engineer. Borisov Factory of Medical Preparations (64/27, Chapayeva str., 222120, Borisov, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: Anechka.kuchinskaya@mail.ru

Zayats Natalia Ivanovna – PhD (Engineering), Assistant Professor, Assistant Professor, Department of Physical-Chemical Methods of Products Certification. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Zayatsni@belstu.by

Поступила 23.02.2016