

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРАНОЗЫ В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

З.С. Шпрах, Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Владимировна Игнатьева chem_analysis@ronc.ru

Введение. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработан и изучен препарат из класса нитрозоалкилмочевины — араноза, который в настоящее время выпускается научно-производственным филиалом «Наукпрофи». Один из этапов стандартизации лекарственного средства — разработка методик количественного определения активного вещества в готовом лекарственном препарате.

Цель исследования — разработка и валидация методики количественного определения содержания аранозы в лекарственном препарате.

Материалы и методы. В данной работе использованы: «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г»; араноза, субстанция-порошок (филиал «Наукпрофи» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России); поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский, сорбиновая кислота. Метод исследования — спектрофотометрия.

Результаты. Разработана методика спектрофотометрического количественного определения аранозы в лекарственном препарате «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г». Для подтверждения достоверности и точности полученных результатов проведена процедура валидации. Методика оценена по валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность.

Выводы. Разработанная методика обеспечена правильностью, сходимостью, прецизионностью, линейностью и может применяться в диапазоне 80–120 % от номинального значения содержания аранозы в препарате.

Ключевые слова: противоопухолевые препараты, араноза, количественное определение, спектрофотометрия, валидация

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-57-62

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ARANOSA ASSAY IN THE DOSAGE FORM

Z.S. Shprakh, E.V. Ignateva, I.V. Yartseva

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Aranosa, a drug of nitrosoalkylureas class, was developed and studied at N.N. Blokhin NMRCO, Russia, and at present it is produced by N.N. Blokhin NMRCO branch “Naukoprofi”. One of the stages of the drug standardization is the development of an assay technique for quantitative determination of active substance in the final drug dosage form.

Objective. Development and validation of an assay for quantitative determination of Aranosa in the dosage form.

Materials and methods. The study used “Aranosa, lyophilisate for solution for injection 0.5 g”; Aranosa, substance-powder (N.N. Blokhin NMRCO branch “Naukoprofi”); polyvinylpyrrolidone low-molecular medical; sorbic acid. Method: spectrophotometry.

Results. An assay was developed for quantitative spectrophotometric determination of Aranosa in the dosage form “Aranosa, lyophilisate for solution for injection 0.5 g”. Validation was performed to prove reliability and accuracy of the obtained results. The assay was evaluated by validation characteristics, such as specificity, linearity, trueness, precision.

Conclusions. The developed assay is provided with trueness, repeatability, precision, and linearity and can be used in the range of 80–120 % of nominal Aranosa content in the dosage form.

Key words: antitumor drugs, aranosa, quantitative determination, spectrophotometry, validation

Введение

Араноза — 3-(а-L-арабинопиранозил)-1-метил-1-нитрозомочевина — отечественный противоопухолевый препарат, разработанный и изученный в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России. Араноза широко применяется в качестве противоопухолевого средства при меланоме кожи как в монотерапии, так и в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами [1–3].

Основной показатель, подтверждающий возможность безопасного и эффективного использования лекарственного препарата (ЛП) в клинической практике, — его качество, т. е. соответствие требованиям фармакопейной статьи или иного нормативного документа [4]. В соответствии с руководством Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации ЛП для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) термин «качество» включает такие критерии, как подлинность, количественное определение и примеси [5]. Критерий «количественное определение» — один из наиболее важных для оценки качества как активной фармацевтической субстанции, так и готового ЛП при серийном производстве и обращении на фармацевтическом рынке. Соответствие данному критерию обеспечивает правильную дозировку активного вещества в ЛП и, следовательно, ожидаемый терапевтический эффект. Для количественного определения используют аналитические методики, основанные на физико-химических и биологических свойствах лекарственного средства (ЛС).

Для контроля качества субстанции желательно использовать прямые методы определения содержания активного вещества. Так, для прямого определения аранозы в субстанции в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России была разработана и валидирована методика, основанная на измерении объема азота, образующегося при обработке аранозы избытком разбавленной щелочи при комнатной температуре [6]. В то же время при определении содержания активного вещества в лекарственной форме (ЛФ) часто используют относительные методы анализа, поскольку в качестве стандартного образца можно использовать субстанцию, из которой приготовлена ЛФ. Для определения содержания аранозы в ЛФ была применена спектрофотометрия (СФМ) в УФ-области спектра, которая является простым и надежным методом контроля количественного содержания активного вещества и отличается высокой достоверностью, воспроизводимостью, точностью и простотой исполнения.

Экспериментальным доказательством того, что аналитическая методика пригодна для решения предполагаемых задач, служит ее валидация, которая проводится при внедрении новой методики при разработке ЛС, а также при изменении состава готового ЛС и условий его анализа [7–9].

Данная работа посвящена разработке и валидации методики количественного определения содержания действующего вещества в препарате «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г» методом прямой СФМ. Валидацию разработанной методики проводили по следующим кри-

териям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность) в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 [7].

Материалы и методы

Препараты и реактивы

«Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г»; араноза, субстанция-порошок (филиал «Наукопрофи» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России); вспомогательные вещества — поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский м. м. 12600 (ПВП), сорбиновая кислота.

Приборы и аппаратура. Спектрофотометр Cary-100 (Varian, США); весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия).

Методика количественного определения аранозы в лекарственной форме. Для приготовления испытуемого раствора содержимое 1 флакона растворяли в небольшом количестве воды, переносили в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводили водой до метки. Затем 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки водой.

В качестве раствора стандартного образца (СО) использовали раствор субстанции аранозы и вспомогательных веществ в воде, а в качестве раствора сравнения — раствор вспомогательных веществ в воде в соответствующих концентрациях.

Измерение оптической плотности испытуемого раствора проводили параллельно с измерением оптической плотности раствора СО относительно раствора сравнения в максимуме при длине волны (240 ± 2) нм.

Содержание аранозы в одном флаконе в граммах (X) вычисляли по формуле

$$X = \frac{A \times a \times C}{A_0 \times 100},$$

где A — оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 — оптическая плотность раствора СО аранозы; a — навеска СО аранозы, г; C — содержание аранозы в субстанции, %.

Результаты

Для количественного анализа лиофилизата аранозы применен метод СФМ [5]. В электронном спектре поглощения водных растворов субстанции аранозы в области от 200 до 300 нм наблюдается максимум при длине волны (240 ± 2) нм (рис. 1). Растворы вспомогательных веществ, входящие в состав ЛФ, имеют максимумы поглощения: ПВП — при 195 нм, сорбиновой кислоты — при 256 нм, т. е. максимум (240 ± 2) нм может быть использован в качестве аналитического.

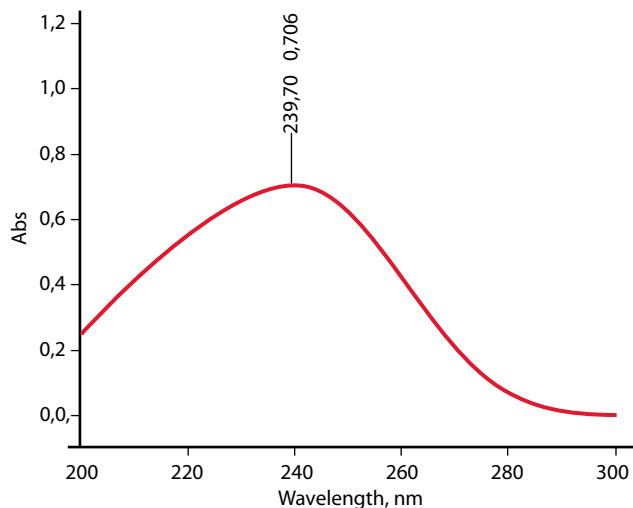


Рис. 1. УФ-спектр поглощения 0,002 % водного раствора субстанции аранозы

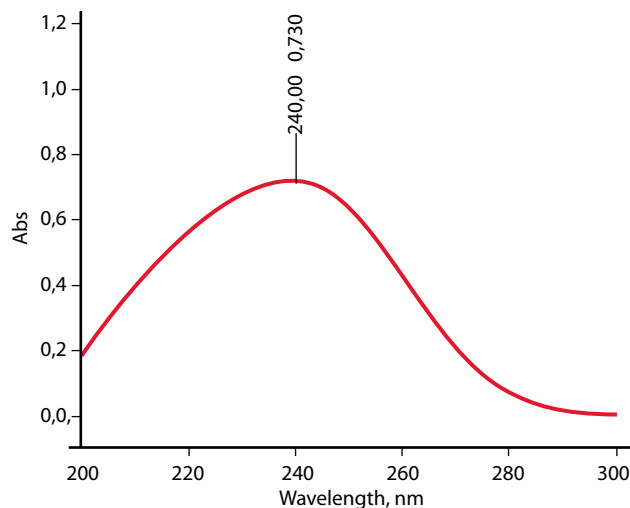


Рис. 2. УФ-спектр поглощения водного раствора лекарственной формы аранозы ($C = 0,02$ мг/мл)

Для оценки возможности применения метода СФМ исследована зависимость интенсивности поглощения аранозы в растворах от её концентрации. Установлено, что в диапазоне концентраций растворов от 0,01 до 0,04 мг/мл зависимость имеет линейный характер, т. е. соблюдается закон Бугера—Ламберта—Бера.

При изучении спектральных характеристик растворов ЛП и вспомогательных веществ, входящих в его состав, показано, что вспомогательные вещества не влияют на положение максимума поглощения действующего вещества (см. рис. 1, рис. 2). Рабочей концентрацией растворов аранозы выбрана концентрация 0,02 мг/мл, при которой оптическая плотность раствора составляет около 0,7 единиц оптической плотности. При этом концентрация сорбиновой кислоты в растворе ЛФ составляет 0,00016 мг/мл и ее поглощение не мешает определению основного действующего вещества. В то же время ПВП в рабочем растворе находится в концентрации 0,02 мг/мл и имеет небольшое собственное поглощение. В связи с этим в качестве раствора сравнения использовали раствор вспомогательных веществ в соотношениях, эквивалентных составу ЛФ.

Для снижения систематических и случайных ошибок в методику анализа введен способ расчета по СО — субстанции аранозы.

Валидация методики количественного определения

Валидацию разработанной методики количественного определения аранозы в препарате «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г» проводили на образцах препарата и модельных смесях, полученных в лабораторных условиях, в соответствии с установленными требованиями

ОФС.1.10012.15 и ОФС.1.1.0013.15 [7]. Исследовали следующие валидационные характеристики: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность) [10].

Главное условие **специфичности** методики — способность однозначно определять анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут содержаться в образце, например вспомогательных веществ.

Ранее было показано, что присутствие в лиофилизате аранозы вспомогательных веществ не влияет на положение максимумов поглощения в электронных спектрах поглощения (см. рис. 1, 2). Небольшое собственное поглощение ПВП — около 0,06 единиц оптической плотности — компенсируется использованием в качестве раствора сравнения раствора вспомогательных веществ, т. е. разработанная методика специфична в отношении аранозы.

Валидационный параметр «линейность» проверяли экспериментально измерением аналитического сигнала (оптической плотности) для пяти проб с различным содержанием аранозы в пределах аналитической области методики — от 80 до 120 % от номинального содержания аранозы во флаконе. Регрессионный анализ полученных данных проводили методом наименьших квадратов с использованием линейной модели $y = bx + a$ (x — количество определяемого вещества, y — величина отклика, b — угловой коэффициент, a — свободный член) и рассчитывали коэффициент корреляции r по экспериментально измеренным значениям переменной y для заданных значений аргумента x .

Полученные данные (табл. 1) показывают, что коэффициент корреляции r , равный 0,9980, отвечает необходимому условию $|r| \geq 0,99$, а результаты

количественного определения аранозы в препарате по разработанной методике хорошо описываются уравнением линейной зависимости $y = 1,3357x + 0,0195$. Подтверждением линейной зависимости исследуемых величин является также графическое изображение регрессионной прямой (рис. 3).

Таблица 1. Результаты определения параметров линейной зависимости количественного определения аранозы в модельной смеси

Процент от номинального содержания, %	Содержание аранозы в пробе, г	Оптическая плотность	Параметры линейной зависимости $y = bx + a$
80	0,405	0,566	Угловой коэффициент линейной зависимости $b = 1,3357$; свободный член линейной зависимости $a = 0,0195$; коэффициент корреляции $r = 0,9980$; $y = 1,3357x + 0,0195$
90	0,453	0,624	
100	0,496	0,675	
110	0,547	0,745	
120	0,596	0,823	

Правильность аналитического метода характеризуется близость результатов испытаний, полученных данным методом, к истинному значению. Правильность валидируемой методики подтверждали анализом серии модельных смесей, включающих все компоненты ЛФ и известное количество определяемого вещества в пределах аналитической области — от 80 до 120 % от номинального содержания аранозы во флаконе. На каждом уровне проводили 3 определения. Как известно, приемлемыми критериями правильности спектрофотометрической методики являются величина относительной ошибки среднего результата, не превышающая 2 %, и отсутствие значимой систематической ошибки. Результаты анализа оценивали путем сравнения полученных результа-

тов с ожидаемым значением величины (содержание аранозы в модельной смеси, г). Полученные данные приведены в табл. 2, 3.

Таблица 2. Результаты определения правильности методики количественного спектрофотометрического определения аранозы в препарате

Содержание аранозы в анализируемой пробе, г	Найдено	
	г	%
0,405	0,398	98,27
0,408	0,403	98,77
0,402	0,399	99,25
0,496	0,500	100,80
0,507	0,515	101,58
0,499	0,498	99,80
0,596	0,588	98,66
0,589	0,597	101,36
0,578	0,567	98,09

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, относительная ошибка среднего результата ($\bar{\varepsilon} = 1,03$ %) не превышает 2 %; результаты лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа ($\bar{x} \pm x$), который составил $99,62 \pm 1,02$, и приближаются к истинному значению, а численное значение коэффициента нормированных отклонений (коэффициент Стьюдента), рассчитанное по результатам анализа обеих выборок, меньше табличного. Эти данные позволяют считать, что результаты, полученные данным методом, правильные и не отягощены систематической ошибкой.

Прецизионность методики характеризуется рассеянием результатов, получаемых с ее использованием, относительно значения среднего результата. Прецизионность методики спектрофотометрического анализа аранозы определяли, оценивая повторяемость (сходимость) результатов и внутрилабораторную прецизионность.

Сходимость методики оценивали по результатам анализов образцов в 2 сериях, различающихся по времени выпуска и серии субстанции, из которой была наработана ЛФ аранозы. Анализ проводили в одинаковых условиях с использованием одного и того же спектрофотометра, одним и тем же исследователем, в короткий промежуток времени. Для взятых для анализа серий ЛФ выполнено по 7 параллельных определений и проведена статистическая обработка полученных результатов. Результаты представлены в табл. 4, 5.

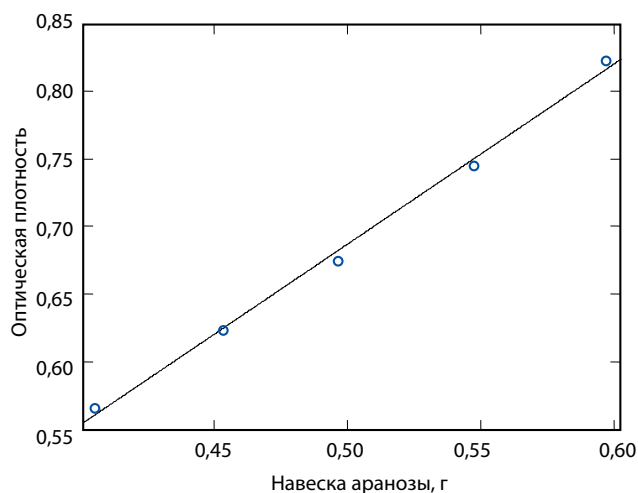


Рис. 3. Графическое изображение регрессионной прямой

Таблица 3. Метрологические характеристики среднего результата анализа при определении правильности методики

m	f	\bar{x} %	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	P , %	$t(p, f)$ табл.	$t(p, f)$ выч.	Δx	$\bar{\varepsilon}$, %
9	8	99,62	1,7798	1,3341	0,4447	95	2,306	0,855	1,02	1,03

Таблица 4. Результаты определения сходимости аналитической методики количественного определения аранозы в препарате

Найдено аранозы во флаконе, г	
серия 1	серия 2
0,507	0,500
0,512	0,496
0,517	0,507
0,512	0,496
0,514	0,495
0,507	0,497
0,510	0,493

Среднее значение содержания аранозы (\bar{x} , г) в представленных сериях ЛФ равно 0,511 и 0,498 г, соответственно, и находится в пределах установленной нормы (0,450–0,550 г). Относительная ошибка среднего результата составила 0,66 и 0,86 %. При

доверительной вероятности $P = 95$ % для проанализированных образцов аранозы доверительный интервал результата отдельного определения ($\bar{x} \pm \Delta x$) составил $(0,511 \pm 0,003)$ г и $(0,498 \pm 0,004)$ г. Численное значение коэффициента Стьюдента, рассчитанное по результатам анализа 2 выборок, меньше табличного значения (см. табл. 3). Таким образом, результаты, полученные данным методом, являются сходимыми и не отягощены систематической ошибкой.

При исследовании *внутрилабораторной* (промежуточной) *прецизионности* анализ производился двумя сотрудниками в разные дни. Было проанализировано по 6 образцов одной серии ЛФ аранозы. Результаты приведены в табл. 6, 7. При сравнении результатов, полученных 2 сотрудниками, видно, что различия между средними значениями результатов 1-го и 2-го сотрудников незначительны. Относительная ошибка среднего результата для 2 исследователей составила 0,79 и 0,80 % соответственно. Численное значение коэффициента Стьюдента, рассчитанное по результатам анализа 2 выборок, меньше табличного значения. Следовательно, методика анализа воспроизводима.

Таблица 5. Метрологические характеристики среднего результата анализа

Серия	m	f	\bar{x} , г	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	P , %	$t(p, f)$ табл.	$t(p, f)$ выч.	Δx	$\bar{\varepsilon}$, %
1	7	6	0,511	0,0000132	0,00364	0,00138	95	2,447	1,974	0,003	0,66
2	7	6	0,498	0,0000212	0,00461	0,00174	95	2,447	1,312	0,004	0,86

Таблица 6. Результаты исследования промежуточной прецизионности методики количественного определения аранозы в лекарственной форме

Серия ЛФ	Найдено аранозы во флаконе, г	
	исследователь 1	исследователь 2
Серия 3	0,500	0,505
	0,506	0,503
	0,502	0,497
	0,498	0,501
	0,495	0,495
	0,502	0,498

Таблица 7. Метрологические характеристики среднего результата анализа при определении промежуточной прецизионности

Серия 3	<i>m</i>	<i>f</i>	\bar{x} , г	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	P , %	$t(p, f)$ табл.	$t(p, f)$ выч.	Δx	$\bar{\varepsilon}$, %
Исполнитель 1	6	5	0,501	0,0000143	0,00378	0,00154	95	2,571	0,324	0,004	0,79
Исполнитель 2	6	5	0,500	0,0000146	0,00382	0,00156	95	2,571	0,107	0,004	0,80

Заключение

Разработана и валидирована методика спектрофотометрического количественного определения основного действующего вещества в ЛФ «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г».

По результатам эксперимента установлено, что данная методика обеспечена приемлемой правильностью, сходимостью, прецизионностью, линейностью, как при нормальных рабочих концентрациях, так и в экстремальных точках диапазона концентраций.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Харкевич Г.Ю., Демидов Л.В. Современный взгляд на лекарственное лечение диссеминированной меланомы кожи. Практическая онкология 2012;2(13):143–9. [Harkevich G.Yu., Demidov L.V. Modern view on the medicinal treatment of disseminated skin melanoma. Prakticheskaya Onkologiya = Practical oncology 2012;2(13):143–9 (In Russ.).]
- Харкевич Г.Ю., Орлова К.В., Тимофеев И.В., Демидов Л.В. Отечественный противоопухолевый препарат араноза в лечении пациентов с метастатической меланомой кожи – результаты проспективного рандомизированного исследования. Фарматека 2017;8:66–70. [Harkevich G.Yu., Orlova K.V., Timofeev I.V., Demidov L.V. National antitumor drug Aranosa in the treatment of patients with metastatic skin melanoma – the results of a prospective randomized study. Pharmateka = Pharmatec 2017;8:66–70 (In Russ.).]
- Шпрах З.С., Барышников А.Ю. Отечественные противоопухолевые препараты. В кн.: Рациональная фармакотерапия в онкологии. Под ред. М.И. Давыдова и В.А. Горбуновой. М.: ЛитТерра, 2012;95–101. [Shprakh Z.S., Baryshnikov A.Yu. National antitumor drugs. In: Rational pharmacotherapy in oncology. Eds. M.I. Davydov and V.A. Gorbunova. M.: LitTerra, 2012;95–101 (In Russ.).]
- Об обращении лекарственных средств с поправками и изменениями: Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ. [On circulation of medicinal products with amendments and changes: Federal Law of the Russian Federation of 12 April 2010 No. 61-FZ (In Russ.).] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://government.ru/docs/all/101658>.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances (Q6A). [Electronic resource]. Access mode: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.
- Ярцева И.В., Игнатьева Е.В., Гатинская Л.Г. и др. Валидация метода количественного определения аранозы в субстанции. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». М., 2008. С. 56. [Yartceva I.V., Ignateva E.V., Gatinskaja L.G. et al. Validation of the method for quantitative determination of Aranose in a substance. Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation “Domestic Antitumor Preparations”, Moscow, 2008. P. 56 (In Russ.).]
- Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII изд., Т. 1. М., 2015. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII edn. Vol. 1. Moscow, 2015. (In Russ.).]
- ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1) [Electronic resource]. Electronical data. Geneva corp. 2005. – Access mode: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guide-lines.html>.
- Эрмер Й., Миллер Дж.Х. МакБ. Валидация методик в фармацевтическом анализе: примеры наилучшей практики. М.: ВИАЛЕК, 2013. 495 с. [Ermer J., Miller J.H. McB. Validation of methods in pharmaceutical analysis: examples of best practices. Moscow: VIALEK, 2013. 495 p. (In Russ.).]
- Шпрах З.С., Игнатьева Е.В., Ярцева И.В. Валидация метода количественного определения аранозы в лекарственной форме. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». М., 2018. С. 85. [Shprakh Z.S., Ignateva E.V., Yartceva I.V. Validation of the method of quantitative determination of Aranose in a dosage form. Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation “National Antitumor Drugs”. Moscow, 2018. P. 85 (In Russ.).]