

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИФЕТРИЛИНА В ТАБЛЕТКАХ

З.С. Шпрах, Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева, Н.А. Дмитричева, Л.И. Смирнова

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Владимировна Игнатьева chem_analysis@ronc.ru

Введение. В ряду аналогов гипоталамического гормона соматостатина, синтезированных в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, получен пентапептид — цифетрилин и создан лекарственный препарат цифетрилин, таблетки 6 мг. Одним из этапов стандартизации лекарственного средства является разработка методик количественного определения действующего вещества в готовом лекарственном препарате.

Цель исследования — разработка и валидация методики количественного определения содержания цифетрилина в лекарственном препарате цифетрилин, таблетки 6 мг.

Материалы и методы. В данной работе использованы цифетрилин, таблетки 6 мг, субстанция цифетрилина (филиал «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»), вспомогательные вещества (лактозы моногидрат, микрокристаллическая целлюлоза, картофельный крахмал, повидон, тальк, стеарат магния), соответствующие требованиям Европейской фармакопеи действующего издания, спирт этиловый 95 %. Метод исследования — спектрофотометрия.

Результаты. Разработана методика спектрофотометрического количественного определения содержания цифетрилина в лекарственном препарате цифетрилин, таблетки 6 мг. С целью подтверждения достоверности и точности результатов проведена валидация аналитической методики. Методика оценена по валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность).

Выводы. Разработанная методика обеспечена специфичностью, правильностью, линейностью, сходимостью и внутрилабораторной прецизионностью и может применяться в диапазоне 70–130 % номинального значения содержания цифетрилина в препарате.

Ключевые слова: цифетрилин, количественное определение, спектрофотометрия, валидация

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-55-61

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF CYPHETRYLIN ASSAY IN TABLETS

Z.S. Shprakh, E.V. Ignatieva, I.V. Yartseva, N.A. Dmitricheva, L.I. Smirnova

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. In N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center have been synthesized a number of hypothalamic hormone somatostatin analogues, including pentapeptide cyphetrylin, and drug Cyphetrylin tablets 6 mg has been created. One of the drug standardization step is development of assay technique for acting substance in the final preparation.

Objective. Development and validation of cyphetrylin assay in tablets.

Materials and methods. The study used cyphetrylin, tablets 6 mg, cyphetrylin powder substance (FSBI “N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center”, branch “Naukaprofi”), lactose monohydrate, cellulose microcrystalline, potato starch, povidone, talc, magnesium stearate (European Pharmacopoeia current edition), 95 % ethyl alcohol. Method of assay — spectrophotometry.

Results. The technique for assay of cyphetrylin in drug “Cyphetrylin, tablets 6 mg” has been developed. Validation was performed to confirm test validity and accuracy. The technique was estimated by validation characteristics: specificity, linearity, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision).

Conclusion. The developed technique has the required characteristics: specificity, accuracy, repeatability, intermediate precision, linearity and can be used in the range of 70–130 % of nominal cyphetrylin content in preparation.

Key words: cyphetrylin, assay, spectrophotometry, validation

Введение

Аналоги гипоталамического гормона соматостатина (октреотид, ланреотид, пасиреотид и др.)

занимают особое место в лечении больных с функционально активными нейроэндокринными опухолями. Как и природный соматостатин, его аналоги

подавляют выделение гормона роста, ингибируют секрецию глюкагона, инсулина, гастрина, секретина, холецистокинина, вазоактивного интестинального пептида, однако являются метаболически стабильными и, следовательно, обладают более выраженным и продолжительным терапевтическим действием [1, 2].

На протяжении ряда лет в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России проводились исследования по поиску потенциальных противоопухолевых соединений в ряду аналогов гипоталамических гормонов [3–5]. По результатам доклинических исследований для клинического изучения отобран защищенный по функциональным группам пентапептид – метиловый эфир N^α-трет-бутилоксикарбонил-S-тетрагидропиранил-L-цистеинил-L-фенилаланил-D-триптофил-N^ε-карбобензоксид-L-лизил-L-треонина – цифетрилин в лекарственной форме таблеток [3–7].

Один из этапов исследований по созданию лекарственного средства – разработка методик количественного определения содержания действующего вещества в готовом лекарственном препарате. При этом большое значение имеют методы анализа, позволяющие быстро и надежно выявить отклонения в качестве и свойствах препарата на самых ранних стадиях исследования. Простым и надежным методом контроля качества лекарственных средств признана спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой (УФ) областях спектра. Применение этого метода отличается высокой достоверностью, воспроизводимостью и точностью и позволяет значительно упростить методики количественного анализа.

Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предлагаемых задач [8]. Валидация аналитической методики проводится как при внедрении новой методики на этапе разработки нового лекарственного препарата, так и при изменении условий анализа лекарственных средств.

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения содержания цифетрилина в препарате цифетрилин, таблетки 6 мг, методом прямой спектрофотометрии. Валидацию разработанной методики проводили по следующим критериям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность) [8, 9].

Материалы и методы

Препараты и реактивы

Цифетрилин, таблетки 6 мг, субстанция цифетрилина (филиал «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России), вспомогательные вещества (лактозы моногидрат, микрокри-

сталлическая целлюлоза, картофельный крахмал, повидон, тальк, стеарат магния), соответствующие требованиям Европейской фармакопеи действующего издания, спирт этиловый 95 %.

Приборы и аппаратура

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

Результаты и обсуждение

Для количественного определения содержания действующего вещества в таблетках цифетрилина применен метод спектрофотометрии. В УФ-спектре поглощения растворов субстанции цифетрилина в области длин волн от 200 до 350 нм наблюдаются максимумы при 274 ± 2 нм, 282 ± 2 нм и 290 ± 4 нм. Аналитическое значение имеет максимум при 282 ± 2 нм, так как удельный показатель поглощения при данной длине волны имеет наибольшее значение и растворитель в данной области спектра прозрачен (рис. 1).

Для оценки возможности применения метода исследована зависимость интенсивности поглощения цифетрилина от его концентрации в растворах. Линейный характер зависимости для растворов цифетрилина в диапазоне концентраций 0,02–0,20 мг/мл продемонстрирован на рис. 2.

При изучении спектральных характеристик растворов лекарственного препарата и вспомогательных веществ, входящих в его состав, показано, что вспомогательные вещества не влияют на положение максимумов полос поглощения действующего вещества, но имеют небольшое собственное поглощение в исследуемой области (рис. 3). В связи с этим в качестве раствора сравнения использовали раствор вспомогательных веществ. Для снижения систематических и случайных ошибок в методику анализа введен способ расчета по стандартному образцу (СО) – субстанции цифетрилина.

Методика

Для приготовления испытуемого раствора точную навеску растертых таблеток, соответствующую массе 1 таблетки, растворяли в 100 мл спирта этилового 95 % и фильтровали.

В качестве раствора СО использовали раствор субстанции цифетрилина и вспомогательных веществ в спирте этиловом, а в качестве раствора сравнения – раствор вспомогательных веществ в спирте этиловом.

Измерение оптической плотности (ОП) испытуемого раствора проводили параллельно с измерением ОП раствора СО относительно раствора сравнения в максимуме при длине волны 282 ± 2 нм.

Содержание цифетрилина в таблетке (X, мг) рассчитывали по формуле:

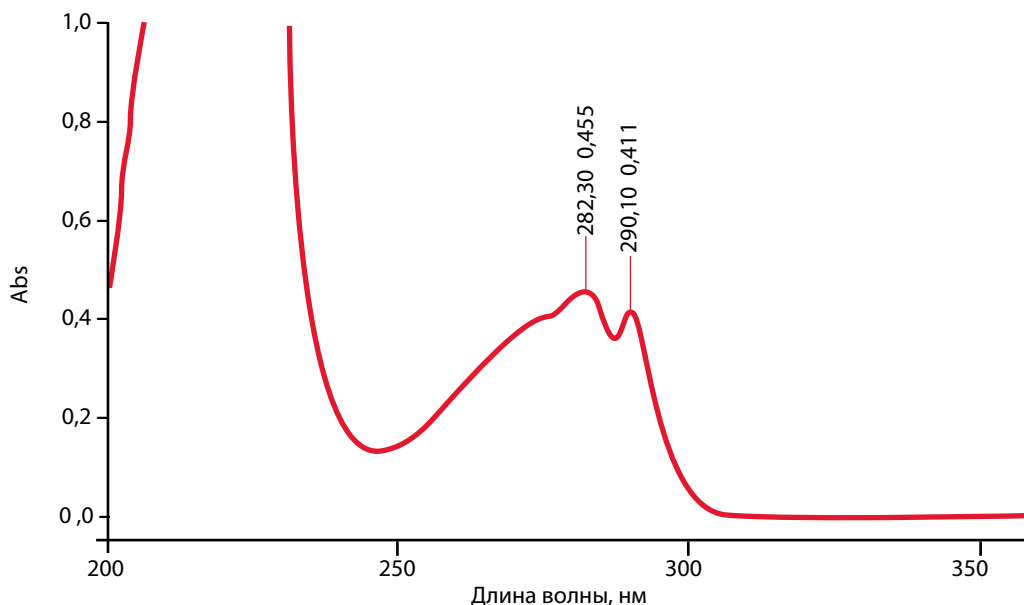


Рис. 1. Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,008 % спиртового раствора субстанции цифетрилина

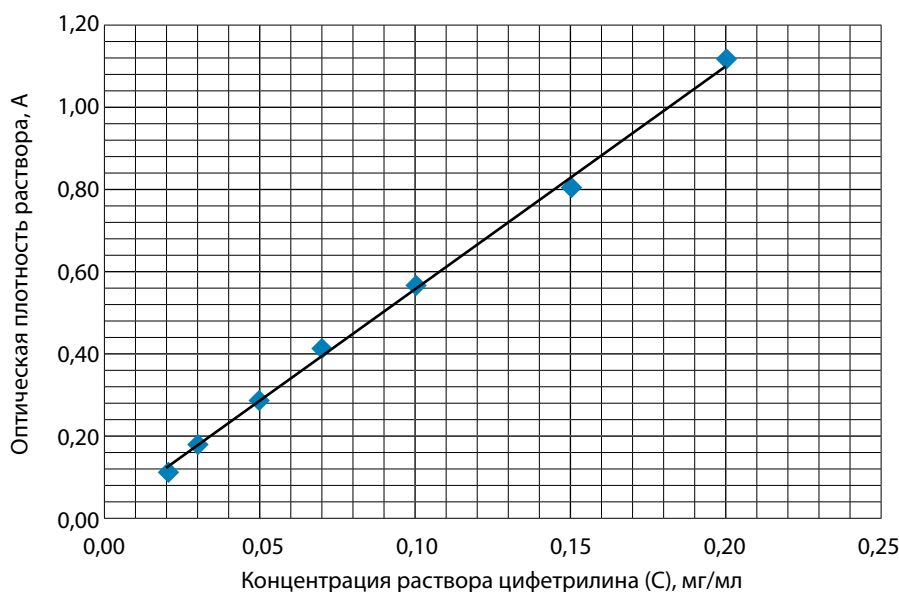


Рис. 2. Зависимость оптической плотности раствора цифетрилина (A) от его концентрации (C)

$$X = \frac{A \times a_0 \times G \times P}{A_0 \times a \times 100},$$

где: A – ОП испытуемого раствора; A_0 – ОП раствора СО; a – навеска испытуемого образца, мг; a_0 – навеска СО, мг; G – средняя масса таблетки, мг; P – содержание цифетрилина в СО, %.

Валидация методики количественного определения

Валидацию разработанной методики количественного определения содержания цифетрилина в препарате цифетрилин, таблетки 6 мг, проводили в соответствии с установленными требованиями [8]

на образцах препарата и модельных смесях, полученных в лабораторных условиях. Исследовали следующие валидационные характеристики: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность).

Главное условие **специфичности** методики – способность безусловно определять анализируемое вещество при наличии других компонентов, которые могут присутствовать в образце, например вспомогательных веществ.

Выше было показано, что присутствие в таблетках цифетрилина вспомогательных веществ не влияет на положение максимумов поглощения в УФ-спек-

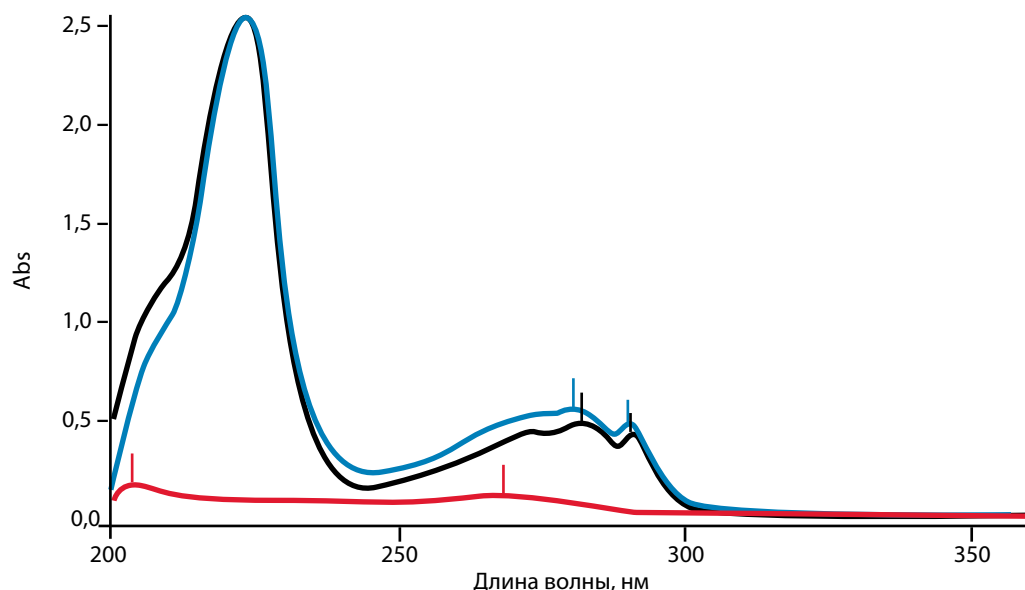


Рис. 3. Ультрафиолетовые спектры поглощения спиртовых растворов субстанции цифетрилина (выделен красным цветом), таблеток цифетрилина (выделен синим цветом) и вспомогательных веществ

трах поглощения. Небольшое собственное поглощение вспомогательных веществ — около 0,08 единиц ОП (см. рис. 3) компенсируется использованием в качестве раствора сравнения раствора вспомогательных веществ, то есть разработанная методика специфична в отношении цифетрилина.

Валидационный параметр «линейность» проверяли экспериментально измерением аналитического сигнала (ОП) для проб с различным содержанием цифетрилина в пределах аналитической области методики — от 70 до 130 % номинального содержания цифетрилина в таблетке. Регрессионный анализ полученных данных проводили методом наименьших квадратов с использованием линейной модели $y = bx + a$ (где 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, представленные в табл. 1, показывают, что коэффициент корреляции r , равный 0,995133, отвечает необходимому условию $|r| \geq 0,99$, а результаты количественного определения содержания цифетрилина в препарате по разработанной методике хорошо описываются уравнением линейной зависимости $y = 0,0589x - 0,0099$. Подтверждением линейной зависимости исследуемых величин служит также графическое изображение регрессионной прямой (рис. 4).

Правильность методики подтверждали анализом серии модельных смесей, которые готовились из вспомогательных веществ с добавлением навески, соответствующей 70, 80, 90, 100, 110, 120 и 130 % номинального содержания цифетрилина в препарате.

На каждом уровне проводили 3 определения. Как известно, приемлемыми критериями правильности спектрофотометрической методики являются величина относительной ошибки среднего результата, не превышающая 2,0 %, и отсутствие значимой систематической ошибки. Результаты анализа оценивали, сравнивая полученные результаты с ожидаемым значением величины (содержанием цифетрилина в модельной смеси, мг). Полученные данные приведены в табл. 2, 3.

Таблица 1. Результаты оценки параметров линейной зависимости при количественном определении содержания цифетрилина в модельных смесях

Процент от номинального содержания	Содержание цифетрилина в пробе, мг	Оптическая плотность, ед.	Параметры линейной зависимости $y = bx + a$
70	4,20	0,241	Угловой коэффициент линейной зависимости $b = 0,0589$ Свободный член линейной зависимости $a = -0,0099$ Коэффициент корреляции $r = 0,995133$ $y = 0,0589x - 0,0099$
80	4,80	0,265	
90	5,40	0,308	
100	6,00	0,337	
110	6,60	0,372	
120	7,20	0,408	
130	7,80	0,462	

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, относительная ошибка среднего результата ($\varepsilon = 1,20$ %) не превышает 2,0 %; результаты лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа ($\bar{x} \pm \Delta x$), который составил $100,68 \pm 1,21$, и прибли-

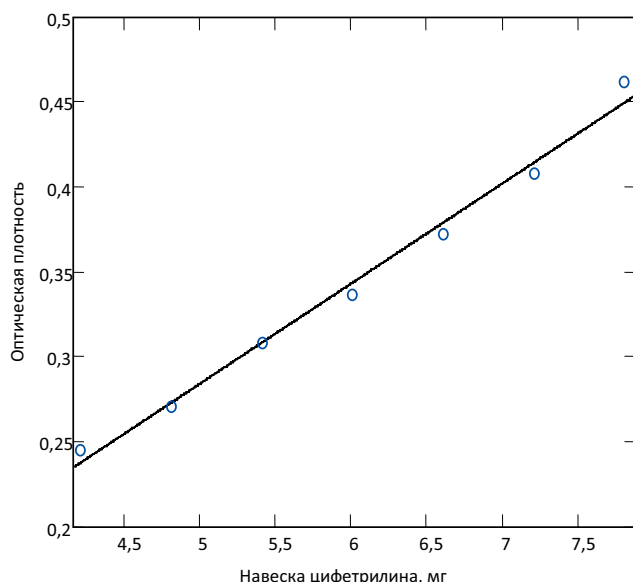


Рис. 4. Регрессионная прямая для количественного определения содержания цифетрилина в таблетках методом спектрофотометрии

жаются к истинному значению. Численное значение коэффициента нормированных отклонений t (коэффициента Стьюдента), рассчитанное по результатам анализа, составило 1,172. Табличное значение коэффициента Стьюдента при 95 % доверительной вероятности и степени свободы $f = 20$ равно 2,086, т. е. $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ (95 %, 20). Все эти данные позволяют считать, что результаты, полученные нашим методом, являются правильными и не отягощены систематической ошибкой.

Прецизионность исследовали на однородных образцах как сходимость и внутрिलाбораторную (промежуточную) прецизионность.

Сходимость методики оценивали по результатам анализов пробы, полученной растиранием в агатовой ступке 20 таблеток. Анализ проводил в одинаковых условиях с использованием одного и того же спектрофотометра один и тот же исследователь в короткий промежуток времени. Для 2 серий, отличающихся временем выпуска, выполнено по 7 параллельных определений и проведена статистическая обработка полученных результатов. Результаты представлены в табл. 4, 5.

Среднее значение содержания цифетрилина (\bar{x} , мг) в представленных сериях лекарственной формы равно 5,98 и 5,91 мг соответственно и находится

Таблица 2. Результаты оценки правильности методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках

Процент от номинального содержания	№ п/п	Содержание цифетрилина в анализируемой пробе, мг	Найдено цифетрилина	
			мг	%
70	1	4,26	4,36	102,35
	2	4,29	4,49	104,65
	3	4,22	4,36	103,26
80	4	4,75	4,89	102,85
	5	4,86	4,74	97,44
	6	4,82	4,73	98,22
90	7	5,46	5,34	97,73
	8	5,34	5,43	101,68
	9	5,43	5,60	103,15
100	10	6,15	6,08	98,86
	11	6,04	5,83	96,62
	12	5,92	6,08	102,68
110	13	6,65	6,52	98,05
	14	6,52	6,74	103,42
	15	6,70	6,53	97,51
120	16	7,25	7,11	98,12
	17	7,32	7,51	102,55
	18	7,28	7,12	97,76
130	19	7,78	7,88	101,32
	20	7,86	8,06	102,55
	21	7,82	8,09	103,48

в пределах установленной нормы (5,4–6,6 мг). Относительная ошибка среднего результата составила 1,66 и 1,57 % соответственно. При доверительной вероятности = 95 % для проанализированных образцов цифетрилина доверительный интервал результата отдельного определения ($\bar{x} \pm \Delta x$) составил $5,98 \pm 0,099$ и $5,91 \pm 0,093$ мг соответственно. Численное значение коэффициента Стьюдента $t_{(p, f)}$, рассчитанное по результатам анализа 2 выборок, составил 0,459 и 0,260

Таблица 3. Метрологические характеристики среднего результата анализа при оценке правильности методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках

№	m	f	\bar{X} , %	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	P, %	t (p, f) табл.	t (p, f) выч.	Δx	ε , %
1	21	20	100,68	7,04302	2,65387	0,57912	95	2,086	1,172	1,208	1,20

соответственно. Табличное значение коэффициента Стьюдента при 95 % доверительной вероятности и степени свободы $f = 6$ равно 2,45, т. е. $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ (95 %, 6). Результаты, полученные данным методом, являются сходимыми и не отягощены систематической ошибкой.

При исследовании **внутрилабораторной** (промежуточной) **прецизионности** анализ проводили 2 сотрудника в разные дни. 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 1,66 и 1,17 % соответственно. Численное значение коэффициент Стьюдента $t_{(p, f)}$, рассчитан по результатам анализа 2 выборок, составил 0,459 и 0,400 соответственно. Табличное значение коэффициент Стьюдента при 95 %

доверительной вероятности и степени свободы $f = 6$ равно 2,45, т. е. $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ (95 %, 6). Следовательно, методика анализа воспроизводима.

Обобщающий отчет по валидации данной методики количественного определения цифетрилина в таблетках представлен в табл. 8.

Заключение

Разработана и валидирована спектрофотометрическая методика количественного определения содержания основного действующего вещества в лекарственном препарате цифетрилин, таблетки 6 мг. По результатам эксперимента установлено, что данная методика специфична в отношении цифетрилина и обеспечена приемлемой правильностью, сходимостью, прецизионностью и линейностью как при нормальных рабочих концентрациях, так и в экстремальных точках диапазона концентраций.

Таблица 4. Результаты определения сходимости аналитической методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках

№ п/п	Найдено цифетрилина в таблетке, мг	
	Серия 02	Серия 03
1	6,05	5,85
2	5,90	5,89
3	5,85	5,81
4	6,13	5,97
5	6,08	5,82
6	5,89	5,93
7	5,97	6,10

Таблица 6. Результаты исследования промежуточной прецизионности методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках серии 02

№ п/п	Найдено цифетрилина в таблетке, мг	
	Исследователь 1	Исследователь 2
1	6,05	5,91
2	5,90	6,10
3	5,85	5,97
4	6,13	6,03
5	6,08	5,94
6	5,89	5,91
7	5,97	6,06

Таблица 5. Метрологические характеристики среднего результата анализа при определении сходимости методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках

Серия	m	f	\bar{X} , мг	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P, %	t (p, f) табл.	t (p, f) выч.	Δx	ε , %
02	7	6	5,98	0,01148	0,10715	0,04650	95	2,447	0,459	0,099	1,66
03	7	6	5,91	0,01037	0,10182	0,03848	95	2,447	0,260	0,093	1,57

Таблица 7. Метрологические характеристики среднего результата анализа при определении внутрилабораторной прецизионности методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках серии 02

№	m	f	\bar{X} , %	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P, %	t (p, f) табл.	t (p, f) выч.	Δx	ε , %
1	7	6	5,98	0,01148	0,10715	0,04650	95	2,45	0,459	0,099	1,66
2	7	6	5,99	0,00571	0,07559	0,02857	95	2,45	0,400	0,070	1,17

Таблица 8. Отчет по валидации методики количественного спектрофотометрического определения содержания цифетрилина в таблетках

Аналитическая характеристика	Принятый критерий	Результат
Специфичность	Вспомогательные вещества, входящие в состав таблетки, не должны влиять на положение и величину максимумов в УФ-спектре цифетрилина	Результаты соответствуют принятым критериям. Отклонения не замечены
Линейность	Коэффициент корреляции не менее 0,99	Уравнение линейной зависимости $y = 0,0589x - 0,0099$ Коэффициент корреляции равен 0,995133
Прецизионность (сходимость)	Относительная ошибка среднего результата не более 2,0 %	Относительная ошибка среднего результата равна 1,66 %.
Прецизионность (внутрилабораторная прецизионность)	Относительная ошибка среднего результата не более 2,0 %	Относительная ошибка среднего результата равна 1,41 % Доверительный интервал 0,085
Правильность	Относительная ошибка среднего результата не более 2,0 % в диапазоне концентраций от 70 до 130 % от рабочей концентрации анализируемого вещества. Значения, принимаемые за истинные, должны лежать внутри доверительного интервала	Относительная ошибка среднего результата равна 1,20 % Результаты лежат внутри доверительного интервала ($100,68 \pm 1,21$)
Диапазон аналитического метода	70–130 % от рабочей концентрации	Данная методика обеспечена приемлемой точностью, правильностью и линейностью в экстремальных точках диапазона (70 и 130 %) так же хорошо, как при нормальных рабочих концентрациях

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Pless J. The history of somatostatin analogs. J Endocrinol Invest 2005;28:1–4. PMID: 16625837.
 2. Strosberg J.R., Kvols L.K. A review of the current clinical trials for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Expert Opin Investig Drugs 2007;16(2):219–24. DOI: 10.1517/13543784.16.2.219. PMID: 17243941.
 3. Кубасова И.Ю., Смирнова З.С., Осетрова И.П. и др. Изучение противоопухолевой активности структурных аналогов соматостатина. Российский биотерапевтический журнал 2003;2(1):29.
 4. Смирнова Л.И., Смирнова З.С., Устинкина С.В. и др. Синтез и противоопухолевая активность гормона гипоталамуса меланостатина и его аналогов.

В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышникова. М., 2003. ?
 5. Шпрах З.С., Ярцева И.В., Смирнова Л.И. и др. Синтез и химико-фармацевтические характеристики аналога соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью. Химико-фармацевтический журнал 2012;48(3):19–22.
 6. Михеевич Е.И., Яворская Н.П., Голубева И.С. и др. Исследование возможности создания лекарственной формы Цифетрилина для перорального применения. Российский биотерапевтический журнал 2012;11(1):3–8.
 7. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Михеевич Е.И. и др. Перспективность

создания лекарственной формы отечественного аналога гипоталамического гормона соматостатина для лечения гормонозависимых опухолей (обзор). Биофармацевтический журнал 2016;8(2):14–19.
 8. Государственная фармакопея Российской Федерации: 13-е изд. М., 2015. Т. 1.
 9. Ярцева И.В., Игнатъева Е.В., Дмитричева Н.А. и др. Валидация методики количественного определения цифетрилина в лекарственной форме. Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):151.