

УДК 543.062:543.422.7:615.262.1
DOI: 10.15587/2519-4852.2017.108534

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПРЕДНІЗОЛОНУ В МАЗЯХ З ГІДРОФІЛЬНОЮ ОСНОВОЮ

© О. В. Ганєва, К. І. Проскуріна, О. А. Євтіфєєва, І. Ю. Петухова, О. Г. Кизим

Мета дослідження полягала у розробці методики спектрофотометричного кількісного визначення преднізолону у мазі з гідрофільною основою за методом стандарту і дослідженні її валідаційних характеристик для подальшого впровадження у лабораторії з аналізу якості лікарських засобів.

Методи. Для проведення експерименту використано фармакопейний стандартний зразок преднізолону ФСЗ Державної фармакопеї України № 11/1-2143 та гідрофільну мазь з діючою речовиною преднізолоном. У роботі використовували наступні методи досліджень: спектрофотометрія за методом стандарту, методи статистичної обробки даних хімічного експерименту. В ході експерименту використовували аналітичне обладнання, реактиви та мірний посуд, що відповідає вимогам Державної фармакопеї України.

Результати дослідження. Розроблено спосіб екстрагування преднізолону з мазі з гідрофільною основою для подальшого його спектрофотометричного визначення, а саме: підібрано фільтр (“Синя стрічка”), визначено необхідні умови вилучення. Встановлено, що процедуру вилучення преднізолону з основи потрібно повторювати тричі – тоді концентрація складає 99,62 % від номінальної. Визначено оптимальні умови спектрофотометрування: концентрація аналітичного розчину преднізолону 2×10^{-5} г/мл, довжина хвилі 244 нм. Вивчено валідаційні параметри розробленої методики: стабільність аналітичного розчину, лінійність, правильність, збіжність.

Висновки. Здійснено розробку методики спектрофотометричного кількісного визначення преднізолону у мазі з гідрофільною основою за методом стандарту. Оцінка валідаційних характеристик методики дозволяє зробити висновок, що методика є прийнятною для використання у лабораторіях з контролю якості лікарських засобів і може бути запроваджена для визначення преднізолону у мазях з гідрофільною основою

Ключові слова: кількісний аналіз, спектрофотометричний метод, валідація, преднізолон, мазь з гідрофільною основою

1. Вступ

Преднізолон – глюкокортикоїд середньої сили терапевтичної дії, що широко застосовується як системно, так і у вигляді м'яких лікарських форм. Так, гідрофільні мазі на основі преднізолону використовують для лікування захворювань шкіри таких як псоріаз, екзема, atopічний дерматит та інші дерматози. Завдяки наявності у складі, крім преднізолону, сечовини препарат діє більш глибоко, має кератолітичну дію, що дозволяє отримати максимальний фармакологічний ефект [1].

2. Постановка проблеми у загальному вигляді, актуальність теми та її зв'язок із важливими науковими чи практичними питаннями

Проблема забезпечення якості лікарських засобів є надзвичайно актуальною у всьому світі. Сьогодні при контролі якості лікарських засобів надається перевага фізико-хімічним методам аналізу. Вони дозволяють визначати органічні сполуки з різноманітною хімічною будовою та при малих витратах аналізу отримати достовірні данні про якість лікарського засобу. Надана робота є продовженням наукових досліджень у напрямку розробки та валідації методів контролю якості лікарських засобів аптечного та промислового виробництва.

3. Аналіз останніх досліджень і публікацій

З літератури відомо, що преднізолон у м'яких лікарських формах кількісно визначається прямими спектрофотометричними без використання специфічних реагентів [2, 3], фотоколориметричними, після проведення кольорових реакцій [4] та хроматографічними методами (ВЕРХ) [5]. Так, Американська та Британська фармакопеї рекомендують використовувати ВЕРХ [6, 7], для кремів Американська фармакопея рекомендує фотоколориметричне визначення за реакцією з фенілгідразинном (ряд авторів рекомендують цей метод і для мазей) [4, 7]. Також існують методики, засновані на ТШХ [5] та спектрофотометричному визначенні преднізолону в мазях [8, 9].

4. Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, якій присвячена стаття

Хроматографічні методи кількісного визначення відрізняються високою селективністю і точністю, проте мають ряд недоліків: вони малодоступні через велику вартість реактивів та обладнання. Спектрофотометрія за методом стандарту значно простіше у використанні, не потребує дорогих реактивів. Проте даний метод не відрізняється селективністю, тобто при наявності в розчині речовин, що поглинають в тій же області спектру, що і преднізолон, зна-

чення оптичної густини будуть завищені. Як правило, у складі мазей є консерванти (ніпагін і ніпазол), максимум спектрів яких – близько 250–260 нм, що поблизу преднізолону (244 нм). Це і є причиною меншого поширення спектрофотометрії в аналізі преднізолону в мазях. Проте, проаналізувавши склад об'єкту дослідження (0,5 г преднізолону, 10,0 г сечовини, 1,0 г едетату натрію, пропіленгліколь, рідкий парафін, цетиловий спирт, стеариловий спирт, макрополу цетостеариловий ефір, вода очищена), було зроблено висновок про можливість застосування спектрофотометричного методу для кількісного визначення преднізолону у мазі з гідрофільною основою.

5. Формулювання цілей (завдання) статті

Так, компоненти, що складають основу, та емульгатори не розчиняються у спирті етиловому, а сечовина, яка екстрагується з мазі разом з преднізолоном, поглинає лише в області 200–220 нм та не впливає на результати аналізу [4, 10]. Тому було вирішено розробити методику спектрофотометричного кількісного визначення преднізолону в мазі з гідрофільною основою за методом стандарту та дослідити її валідаційні характеристики для подальшого впровадження в лабораторії з аналізу якості лікарських засобів.

6. Вклад основного матеріалу дослідження (методів та об'єктів) з обґрунтуванням отриманих результатів

Для проведення експерименту використано фармакопейний стандартний зразок преднізолону ФСЗ Державної фармакопеї України (ДФУ) № 11/1-2143 (вміст згідно АНД 99,8 %) та гідрофільна мазь з діючою речовиною преднізолоном.

В ході експерименту використовувалося таке аналітичне обладнання: спектрофотометри Specord-200 та Thermo Scientific Evolution 60S, кювети товщиною 10 мм, аналітичні терези AB 204 S/A METTLER TOLEDO, реактиви та мірний посуд класу А, що відповідає вимогам ДФУ [2].

Методика кількісного спектрофотометричного визначення преднізолону в гідрофільній мазі за методом стандарту:

Випробовуваний розчин: До точної наважки мазі, еквівалентної 0,025 г преднізолону, додають 15–

20 мл 96 % спирту Р. Нагрівають на водяному нагрівнику при 60–70 °С до повного розчинення основи, потім охолоджують на льоду.

Отриману суміш фільтрують через фільтрувальний папір, попередньо змочений 96 % спиртом Р, до мірної колби ємністю 50,0 мл, намагаючись уникнути потрапляння основи на фільтр. Операцію повторюють тричі, починаючи від додавання спирту та доводять 96 % спиртом Р до мітки.

Стандартний розчин: Точну наважку порошку стандарту розчиняють у 96 % спирті Р, готуючи розчин з точною концентрацією преднізолону, еквівалентною 2×10^{-5} г/мл.

Процедура проведення: 2,0 мл випробовуваного розчину додають до мірної колби на 50,0 мл та доводять 96 % спиртом Р до мітки. Аналогічно додають 2,0 мл стандартного розчину до іншої мірної колби на 50,0 мл та доводять 96 % спиртом Р до мітки. Оптичну густину отриманих розчинів вимірюють при 243,5 нм, використовуючи як компенсаційний розчин 96 % спирт Р. Вміст преднізолону в мазі, у відсотках, розраховують за формулою:

$$C = \frac{A_i \times C_{st} \times V_{м.к.1} \times V_{м.к.2} \times m_{мази}}{A_{st} \times V_n \times m_n}$$

де A_i – оптична густина випробовуваного розчину;

A_{st} – оптична густина розчину стандарту;

C_{st} – концентрація стандартного розчину (г/мл);

$V_{м.к.}$ – об'єм мірної колби, мл;

V_n – об'єм піпетки, мл;

$m_{мази}$ – маса преднізолонової мазі за прописом, г;

m_n – маса наважки мазі для аналізу, г.

Вимірювання оптичної густини отриманих модельних розчинів проводили тричі з вийманням кювети. Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту» [2].

В ході аналізу було встановлено, що однократного вилучення преднізолону з мазі недостатньо (при цьому вилучається приблизно 70–80 % преднізолону від номінальної кількості – табл. 1), тому рекомендується проводити процедуру тричі.

Таблиця 1

Визначення оптимальної кількості операцій вилучення преднізолону з маzewої основи

Показник	Оптична густина випробовуваних розчинів		
	Оптична густина (A_{i-1}) розчину при 1-кр. вилученні зі зразку	0,6162*	0,6159*
Оптична густина (A_{i-3}) розчину при 3-кр. вилученні зі зразку	0,7771*	0,7792*	0,7783*
Оптична густина ($A_{ср}$) розчинів при 1-кр. вилученні зі зразків	0,6160±0,000173		
Оптична густина ($A_{ср}$) розчинів при 3-кр. вилученні зі зразків	0,7782±0,00105		
Відношення концентрації преднізолону до номінальної при 1-кр. вилуч., % ($A_{st}=0,7811$)	78,86		
Відношення концентрації преднізолону до номінальної при 3-кр. вилуч., % ($A_{st}=0,7811$)	99,62		
Систематична похибка результатів аналізу при 1-кр. вилуч., %	21,14		
Систематична похибка результатів аналізу при 3-кр. вилуч., %	0,38		
Критерій систематичної похибки, δ	3,20		

Примітка: * – середнє значення трьох вимірів випробовуваного зразку

Для підбору оптимального фільтру було проведено фільтрацію на паперовому фільтрі типу «Синя стрічка» та на скляному фільтрі Шотта та встановлено, що при використанні останнього крім преднізолону вилучаються допоміжні речовини, спиртовий розчин має жирні включення, а досліджуваний спектр має завищену оптичну густину (рис. 1).

Тому для фільтрації спиртового розчину преднізолону від основи та допоміжних речовин доцільно використовувати фільтри паперові обеззолені типу «Синя стрічка», оскільки вони дозво-

ляють отримати максимально чистий розчин, придатний для спектрофотометричного визначення.

При цьому необхідно не допускати потрапляння основи на паперовий фільтр, оскільки це значно ускладнює і навіть унеможлиблює процес фільтрації. Операцію нагрівання, охолодження і фільтрації проводили спочатку і для стандарту, щоб визначити похибку, внесену втратами при фільтрації. Було встановлено, що втрати є незначними ($A_{st}=0,7811$; $A_{st(фільтр)}=0,7750$; $\Delta_{Handle}=0,78\% \leq 1,024\% = \max \delta$), вписуються в межі статистичної невизначеності та можуть не враховуватися при рутинному аналізі [11].

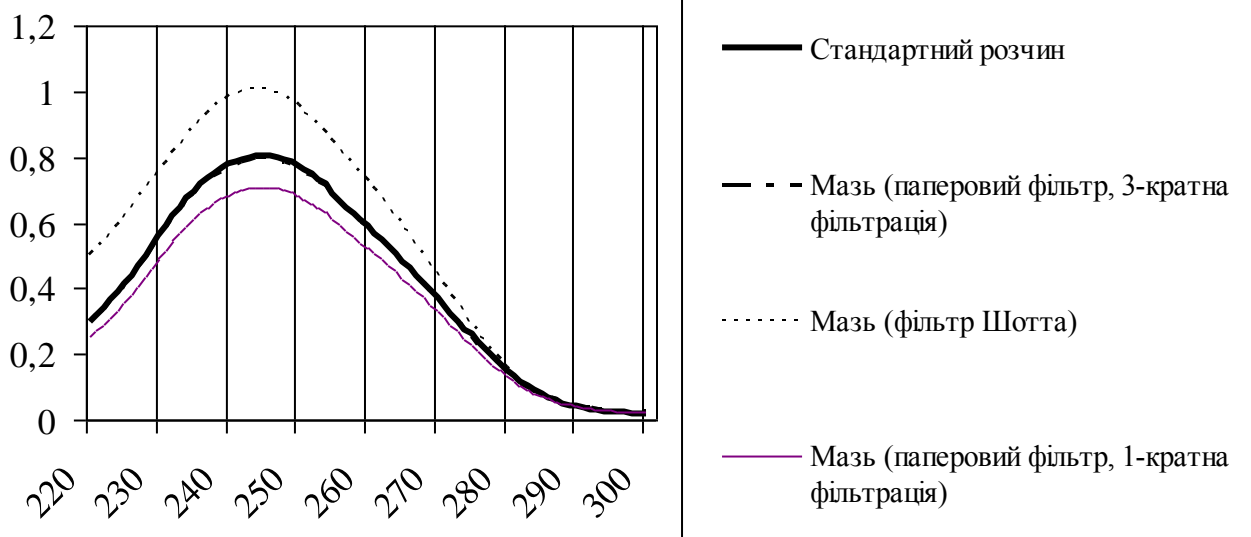


Рис. 1. Графік оптичної густини для розчинів стандарту та вилучення з мазі при використанні різних фільтрів

Для обраної методики спектрофотометричного визначення преднізолону за методом стандарту проводили валідаційні дослідження лінійності, прецизійності, правильності, стабільності тощо.

Для оцінки валідаційних характеристик було обрано мінімальний діапазон визначення 80–120 % згідно з ДФУ. Оцінку лінійності проводили за стандартизованою процедурою на всьому діапазоні визначення. Для цього використовували 9 модельних розчинів з точними концентраціями та розчин стандарту, оптичну густину

яких вимірювали тричі. Отримані результати були статистично оброблені методом найменших квадратів для прямої $Y=b \cdot x+a$ згідно з вимогами ДФУ. Побудову калібрувального графіку проводили в нормалізованих координатах (рис. 2). Розраховані статистичні величини b , S_b , a , S_a , RSD_0 , та r , а також отримані оптичні величини наведено в табл. 2, 3. Оцінку прецизійності та правильності проводили паралельно з визначенням лінійності, вимірюючи оптичну густину 9 модельних розчинів тричі (табл. 3) [2, 11, 12].

Графік залежності оптичної густини від концентрації преднізолону в нормалізованих координатах

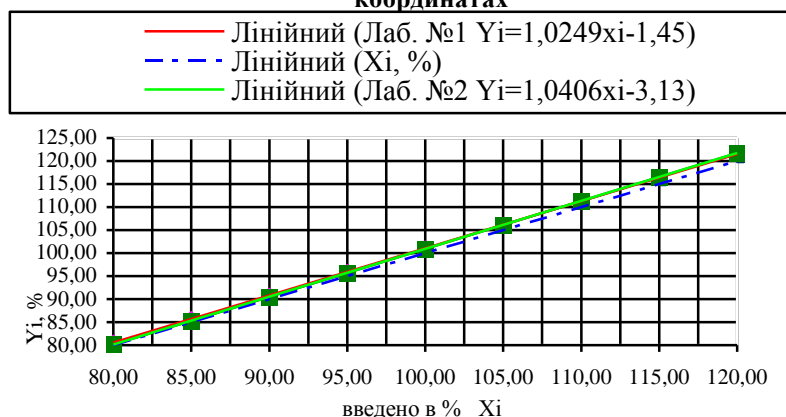


Рис. 2. Графік залежності оптичної густини від концентрації преднізолону у нормалізованих координатах

Таблиця 2

Результати вивчення лінійності методики спектрофотометричного визначення преднізолону у гідрофільній мазі у лабораторіях

№ модельного розчину	Введено $X_i, \%$	Оптичні густини A_i^*		Знайдено Y_i		$Y_i=b \cdot X_i+a$	
		Лаб. № 1 ($A_{st}=0,7811$)*	Лаб. № 2 ($A_{st}=0,7823$)*	Лаб. №1	Лаб. №2	Лаб. № 1	Лаб. № 2
1	80,00	0,6228	0,6231	79,73	79,65	80,54	80,11
2	85,00	0,6623	0,6622	84,79	84,65	85,67	85,31
3	90,00	0,7251	0,7232	92,83	92,45	90,79	90,51
4	95,00	0,7350	0,7350	94,10	93,95	95,92	95,72
5	100,00	0,7966	0,7972	101,98	101,90	101,04	100,92
6	105,00	0,8438	0,8332	108,03	106,51	106,16	106,12
7	110,00	0,8738	0,8751	111,87	111,86	111,29	111,32
8	115,00	0,9008	0,9060	115,32	115,81	116,41	116,53
9	120,00	0,9428	0,9503	120,70	121,48	121,54	121,73
Середнє значення, %						101,01	100,92
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності, b						1,0249	1,0406
Стандартне відхилення кутового коефіцієнту лінійної залежності, S_b						0,0384	0,0300
Вільний член лінійної залежності, a						-1,45	-3,13
Стандартне відхилення вільного члену лінійної залежності, S_a						3,87	3,02
Залишкове стандартне відхилення, S_0						1,49	1,16
Лінійний коефіцієнт кореляції, r						0,9998	0,9999
Стандартне відхилення, S_y						13,58	13,58

Примітка: * – середнє значення трьох вимірів

Отримавши значення основних критеріїв лінійної залежності, порівняли їх з максимально припустимими. Результати наведено у табл. 3.

Стабільність. Згідно з вимогами ДФУ [2], випробування проводили протягом години, вимірюючи оптичну густину кожні 10 хвилин (7 вимірювань). За даний період часу оптична густина значно не змінювалася та становила для розчину мазі 0,796 ($\Delta t=0,23 \%$ $\leq 1,024 \%$ $= \max \delta$) (табл. 4) [11].

Межа виявлення та межа кількісного визначення. Значення параметрів LOD та LOQ проводили за відомим співвідношенням ($LOD=3.3 \cdot S_a/b$; $LOQ=10 \cdot S_a/b$), використовуючи дані табл. 1 [2, 11, 12].

$LOD=3.3 \cdot 3,77=12,44 \%$ ($3,3 \cdot 3,77=12,44$) від номінальної концентрації преднізолону в мазі.

$LOQ=10 \cdot 3,77=37,76 \%$ від номінальної концентрації преднізолону в мазі.

Прогноз невизначеності пробопідготовки. Розрахунок проводили відповідно до вимог ДФУ [2] (табл. 5).

Таблиця 3

Метрологічні характеристики методики кількісного спектрофотометричного визначення преднізолону в гідрофільній мазі за методом стандарту

Величини	Значення для 1 лаб.	Значення для 2 лаб.	Критерії (для допусків $\pm 10 \%$)	Висновок
b	1,0249	1,0406	–	–
S_b	0,0384	0,0300	–	–
a	-1,45	-3,13	1) статистично допустиме значення: $a \leq S_a \times 1,86$ 2) практично допустиме значення: $a \leq 5,12$	Відповідає Відповідає
S_a	3,87	3,02	–	-
RSD_0	1,49	1,16	$\leq 1,8070$	Відповідає
r	0,9998	0,9999	$\geq 0,9924$	Відповідає
Середнє, Z %	101,01	100,86	–	–
Відносне стандартне відхилення, $S_z \%$	1,48	1,27	–	–
Відносний довірчий інтервал $\Delta a_s \% = t(95\%, 8) \cdot S_z =$ $= 1,8595 \cdot S_z =$	2,74	2,36	$\Delta a_s \% = 10,00 \times 0,32 = 3,20$	Відповідає
Систематична похибка δ	1,01	0,86	$\delta \leq 1,0240$	Відповідає

Таблиця 4

Результати дослідження стабільності методики спектрофотометричного кількісного визначення преднізолону в мазі з гідрофільною основою

Оптична густина A* в різний час							Середня оптична густина	RSD ₀ , %	Δt	maxδ
0 хв	10 хв	20 хв	30 хв	40 хв	50 хв	60 хв				
0,7957	0,7960	0,7963	0,7954	0,7965	0,7972	0,7980	0,7965	0,0925	0,22	1,024
0,7952	0,7959	0,7965	0,7959	0,7963	0,7972	0,7982				
0,7953	0,7961	0,7970	0,7958	0,7968	0,7971	0,7984				

Примітка: * – середнє значення трьох вимірів

Таблиця 5

Розрахунок невизначеності пробопідготовки для кількісного визначення преднізолону в мазі

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність
Розчин порівняння		
1. Взяття наважки ФСЗ преднізолону	m ₀	0,2 мг/25 мг x 100 % = 0,8 %
2. Доведення до об'єму в мірній колбі 50,0 мл	50	0,17 %
3. Взяття аліквоти піпеткою 2,0 мл	2	0,5 %
4. Доведення до об'єму в мірній колбі 50,0 мл	50	0,17 %
Випробовуваний розчин		
5. Взяття наважки мазі	m	0,2 мг/5000 мг x 100 % = 0,004 %
6. Доведення до об'єму в мірній колбі 50,0 мл	50	0,17 %
7. Взяття аліквоти піпеткою 2,0 мл	2	0,5 %
8. Доведення до об'єму в мірній колбі 50,0 мл	50	0,17 %

$$A_{SP}^2 = A_{Dil}^2 + A_{Handle}^2$$

де Δ_{Dil} – невизначеність розведення; Δ_{handle} – невизначеність опрацювання проби (вилучення, фільтрація).

$$A_{Dil} = \sqrt{0,8^2 + 0,17^2 + 0,5^2 + 0,17^2 + 0,004^2 + 0,17^2 + 0,5^2 + 0,17^2} = 1,12 \%$$

$$A_{SP} = \sqrt{1,12^2 + 0,78^2} = 1,36 \%$$

Отримані дані свідчать, що пробопідготовка не має суттєвого внеску в абсолютну невизначеність методики. З табл. 5 видно, що найбільшу похибку в ході цього процесу вносять операції 1, 3, 7, тобто взяття наважки стандарту та взяття аліквоти 2,0 мл, а також етап вилучення, що є характерним розподілом в кількісному аналізі [11].

Повна невизначеність методики:

$$A_{As} = \sqrt{A_{SP}^2 + A_{FAO}^2} = \sqrt{1,36^2 + 0,70^2} = 1,53 \%$$

При розрахунку повної невизначеності значення невизначеності кінцевої аналітичної операції становить 0,70 %, що є відомим значенням для спектрофотометрії [11]. Повна прогнозована невизначеність методики не перевищує критичного значення (3,20 %), тобто методика може бути відтворювана і в інших лабораторіях.

7. Висновки

Розроблено спосіб екстрагування преднізолону з мазі з гідрофільною основою для подальшого його спектрофотометричного визначення, а саме: підбрано фільтр (“Синя стрічка”), визначено необхідні умови вилучення. Встановлено, що процедуру вилучення преднізолону з основи потрібно повторювати тричі – тоді концентрація його є максимально наближеною до номінальної (99,62 % від номінальної в нашому випадку).

Розроблено методику кількісного спектрофотометричного визначення преднізолону в мазах з гідрофільною основою за методом стандарту, заснованої на визначенні оптичної густини випробованого розчину преднізолону з концентрацією 2×10^{-5} г/мл та розчину стандарту за довжини хвилі 244 нм.

Для даної методики визначення лінійності, правильності, збіжності, стабільності тощо та отримано коректні результати в діапазоні 80–120 % (відповідає 4–6 мг преднізолону в 1 г мазі).

Методика рекомендується для кількісного визначення преднізолону в мазах з гідрофільною основою в умовах вітчизняних лабораторій контролю якості лікарських засобів.

Література

1. Харкевич, Д. А. Фармакологія [Текст] / Д. А. Харкевич. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 736 с.
2. Державна Фармакопея України. Т. 1 [Текст]. – Х.: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – 1130 с.
3. European Pharmacopoeia [Text]. – 8.4-th ed. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2015.

4. Ievtifieieva, O. A. The assessment of the method for quantitative determination of prednisolone in the ointment by the reaction with phenylhydrazine [Text] / O. A. Ievtifieieva, K. I. Proskurina, O. M. Ganieva, V. T. Kirdan // News of pharmacy. – 2015. – Vol. 1. – P. 30–33.
5. Steroid Analysis [Text] / H. L. J. Makin, D. B. Gower (Eds.). – New York: Springer, 2010. – 1213 p. doi: 10.1007/978-1-4020-9775-1
6. British Pharmacopoeia. Vol. 1 [Text]. – London: The British Pharmacopoeia Secretariat, 2009. – 10952 p.
7. United States Pharmacopoeia 33 [Text]. – Rockville: United States Pharmacopoeial Convention Inc, 2010.
8. Тарханова, О. О. Спектрофотометричне визначення адреналіну гідротартрату та норадреналіну гідротартрату [Текст] / О. О. Тарханова, М. Л. Задорожний, С. О. Васюк // Фармацевтичний журнал. – 2009. – № 10. – С. 84–89.
9. Kashyap, R. Development and validation of UV spectroscopy method for the estimation of prednisolone in bulk and dosage form [Text] / R. Kashyap, E. V. S. Subrahmanyam, A. R. Sharbaraya // Journal of chemical and pharmaceutical research. – 2012. – Vol. 4, Issue 2. – P. 1090–1096.
10. Dibbern, H.-V. UV and IR Spectra of Pharmaceutical substances and IR Spectra of Pharmaceutical and Cosmetic Excipients [Текст] / H.-V. Dibbern, R. M. Muller, E. Wirbitzki. – Editio Cantor Verlag, 2002. – 1764 p.
11. Аналитическое обеспечение создания, стандартизации и контроля качества лекарственных средств. Т. 3 [Текст] / ред. В. П. Георгиевский. – X.: НТМТ, 2011. – 520 с.
12. Validation of analytical procedures: text and methodology: Q2 (R1) [Text]. – International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. – Geneva, 2005. – 12 p.

Дата надходження рукопису 19.05.2017

Ганєва Олена Василівна, аспірант, викладач, Миколаївський базовий медичний коледж, вул. Космонавтів, 79/1, м. Миколаїв, Україна, 54028

Проскуріна Ксенія Ігорівна, кандидат фармацевтичних наук, доцент, кафедра аналітичної хімії, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, Україна, 61002
E-mail: ksenapharm@yahoo.com

Євтіфєєва Ольга Анатоліївна, доктор фармацевтичних наук, професор, кафедра фармацевтичної хімії, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, Україна, 61002
E-mail: jevt.23@gmail.com

Петухова Ірина Юрїївна, кандидат хімічних наук, доцент, кафедра аналітичної хімії, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, Україна, 61002

Кизим Олена Георгіївна, кандидат хімічних наук, доцент, кафедра аналітичної хімії, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, Україна, 61002