

A.I. Abu Shark

Using of preliminary planning in the process of optimization for the directed synthesis of biologically active substances in a range of 2-hydroxy-4-oxo-4H-pyrido [1,2 a] pyrimidine-3-carboxylic acid derivatives

National pharmaceutical university, Kharkov

Introduction. Research on searching for new biologically active compounds is an integral part of modern pharmaceutical chemistry. Taking into account the current requirements an increasingly important place is occupied by software products that can help to save costs necessary during research.

Purpose. To plan synthesis of a range of esters of 2-hydroxy-4-oxo-4H-pyrido [1,2 a] - pyrimidine-3-carboxylic acid and its amides and make prediction about their possible pharmacological activity.

Materials and methods. Ethyl esters and amides of 2-hydroxy-4-oxo-4H-pyrido [1,2 a] pyrimidine-3-carboxylic acid which can be synthesized of available reagents by the developed method.

Results. The synthesis has been planned and computer prediction of possible pharmacological activity of esters and amides of 2-hydroxy-4-oxo-4H-pyrido [1,2 a]-pyrimidine-3-carboxylic acid has been made. It has been found that predictable pharmacological activity to a large degree depends on the nature of substituents in the amide function and slightly on the location of the substituent in the pyridine ring.

Conclusion. Analyzed substances are likely to have spasmolytic, membrane integrity agonistic, antitumor and hepatoprotective activity types. The conducted studies allow carrying out the directed synthesis and optimizing pharmacological screening of the compounds.

Key words: esters, amides, 2-hydroxy-4-oxo-4H-pyrido [1,2 a]-pyrimidine-3-carboxylic acid, pharmacological screening, synthesis and optimization.

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2013

Н.Ю. Бевз, О.В. Криванич, П.О. Безуглий

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФЕНІЛЕФРИНУ ГІДРОХЛОРИДУ В ОЧНИХ КРАПЛЯХ

Національний фармацевтичний університет, Харків

Вступ. З огляду на актуальність забезпечення контролю якості на всіх стадіях життєвого циклу обігу лікарських засобів виконана робота є спробою розробки та валідації простої у виконанні, швидкої і точної, високочутливої, відтворюваної методики ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин та інших компонентів лікарських засобів з розчином фенілефрину гідрохлориду у формі очних крапель.

Мета. Розробка стандартизованої процедури валідації спектрофотометричної методики ідентифікації та кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду в очних краплях, розрахунок критеріїв прийнятності валідаційних характеристик.

Матеріали та методи. Аналітичні дослідження проводили методом абсорбційної спектрофотометрії на спектрофотометрі Evolution 60S v4.003, використовували ваги лабораторні «AXIS» ANG 200 (Польща) і мірний посуд класу А на базі кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету.

Результати. Результати валідаційних характеристик запропонованої методики підтверджують її специфічність, лінійність, правильність, діапазон застосування та внутрішньолабораторну прецизійність.

Висновок. Встановлено, що методика може бути коректно відтворена та є придатною для використання у фармацевтичному аналізі.

Ключові слова: валідація; фенілефрину гідрохлорид; абсорбційна спектрофо-тометрія.

ВСТУП

Створення, впровадження та підтримання ефективної системи управління якістю, яка відповідає вимогам належної виробничої практики та забезпечує поставку продукції, яка задовольняє потреби споживачів, фахівців у сфері охорони здоров'я та регуляторних органів, - є важливою парадигмою у сфері державного управління та регулювання обігу лікарських засобів [1]. Однією з вимог сучасної системи якості у фармацевтиці є розробка та валідація методик аналітичного контролю, що відповідають критеріям прийнятності на всіх стадіях життєвого циклу лікарського засобу [2].

У відповідності до вимог ДФУ, гармонізованої з Європейською Фармакопеєю, всі аналітичні методики і випробування, що проводяться з метою розробки і реєстрації лікарських засобів; методики контролю якості діючих і допоміжних речовин, проміжних продуктів і готових лікарських засобів підлягають валідації [3,4,5].

Тому актуальною є розробка простих у виконанні, швидких і точних, високочутливих, відтворюваних методик ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин та інших компонентів лікарських засобів і проведення верифікації з одночасною валідацією запропонованих методик.

Метою дослідження є розробка стандартизованої процедури валідації спектрофотометричної методики кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду в очних краплях, розрахунок критеріїв прийнятності валідаційних характеристик.

Аналіз останніх досліджень і публікацій

Фенілефрину гідрохлорид належить до групи симпатоміметиків, чинить пряму стимулюючу дію переважно на постсинаптичні альфа-1-адренорецептори, причому вплив на бета-рецептори серця майже не виражений.

Фенілефрин застосовується в офтальмології для лікування іриту, іридоцикліту, для максимально швидкого і вираженого розширення зіниці під час офтальмоскопії та інших діагностичних процедурах; передопераційному розширенні зіниці (10 % р-н) в офтальмохірургії, глаукомо-циклітичному кризі, комплексній терапії спазму акомодатії, прогресуючій короткозорості, синдромі «червоного ока». Впливає на циліарний м'яз, тому мідріаз не супроводжується циклоплегією. Фенілефрин частково відповідальний за зниження внутрішньоочного тиску після інсталяції препарату у високих концентраціях (2,5% - 10,0%) [6,7].

Аналіз даних аналітичної нормативної документації показав різноманітність методів як якісного, так і кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду [8, 9, 10].

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом дослідження було обрано препарат виробництва ТОВ «Дослідний завод «ГНЦЛС»» мезатон краплі очні 2,5% по 5 мл у флаконі серій 31110, 31011,

20611, 1 мл розчину яких містить стерильний розчин фенілефрину гідрохлориду 25,0 мг у воді очищений. Стандартний зразок субстанції фенілефрину гідрохлориду (Unichem laboratories Ltd, Індія) серії PPPPH/1104 від 01.10.10.

Аналітичні дослідження проводили методом абсорбційної спектро-фотометрії на спектрофотометрі Evolution 60S v4.003. У ході проведення дослідження використовували ваги лабораторні електронні AXIS model ANG200, мірний посуд класу А (першого класу). Реактиви та титровані розчини, які використовували при випробуваннях, відповідали вимогам ДФУ.

Приготування розчинів і діапазон визначення методики

Кількісне визначення фенілефрину гідрохлориду в очних краплях ми проводили методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області (2.2.25) на спектрофотометрі за довжини хвилі 273 нм методом стандарту.

Методика приготування випробовуваного розчину фенілефрину гідрохлориду у лікарській формі очних крапель. Точно виміряний об'єм препарату, еквівалентний 25 мг фенілефрину, вміщують в мірну колбу ємністю 500 мл, додають 200 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої, доводять тим же розчинником до 500 мл та перемішують.

Готують розчин порівняння ФСЗ фенілефрину гідрохлориду у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої з концентрацією 50 мкг/мл фенілефрину гідрохлориду.

Компенсаційний розчин: 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Приготування розчину плацебо: в мірну колбу на 10 мл вміщують декаметоксин, поліетиленоксид 400, трилону Б у відповідній кількості і доводять водою очищеною до мітки.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження проводили на трьох серіях очних крапель. Встановлено, що в УФ-спектрі розчинів фенілефрину, приготованих з очних крапель, в 0,1М розчині кислоти хлористоводневої спостерігається максимум за довжини хвилі 273 нм. У той же час записаний нами УФ-спектр розчину стандартного зразка фенілефрину гідрохлорид в аналогічній концентрації повністю відповідає характеру спектру фенілефрину гідрохлориду. Розчин плацебо практично не впливає на поглинання в максимумі аналізованих розчинів (рис. 1).

Визначення впливу допоміжних компонентів очних крапель на оптичну густину проводили, вимірюючи оптичну густину розчину плацебо (A_{blank}), паралельно вимірювали оптичну густину (A_{st}) розчину порівняння. Було знайдено: $A_{blank} = 0,003$; $A_{st} = 0,428$. Вклад плацебо у сумарне поглинання препарату дорівнює $\delta_{exc}^{blank} = 0,70\%$. Фонове поглинання є незначущим і методика характеризується допустимою специфічністю.

Вміст фенілефрину гідрохлориду в очних краплях визначали у 1 мл у міліграмах. Результати кількісного спектрофотометричного визначення фенілефрину гідрохлориду в очних краплях наведені в таблиці 1.

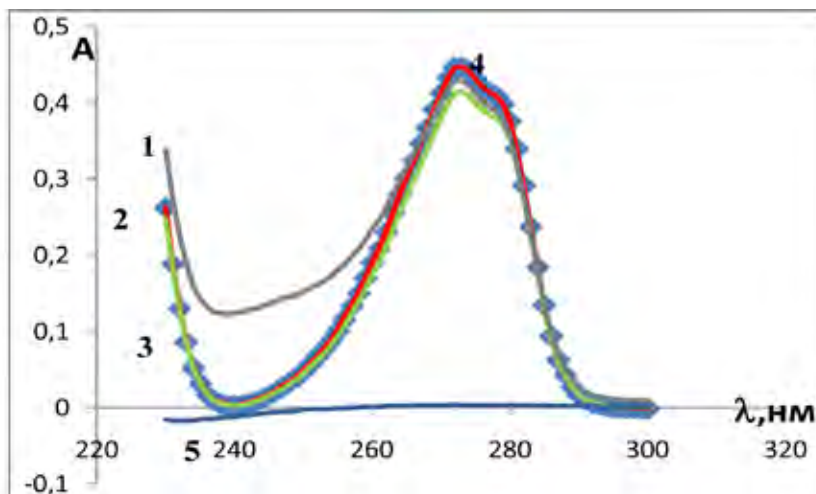


Рис. 1. УФ-спектри поглинання фенілефрину гідрохлориду
Примітка: 1 – розчин стандартного зразку; 2-4 – очні краплі мезатону 2,5%: 2. - серія 31011; 3 – серія 20611; 4 –серія 31110; 5 – розчин плацебо.

Таблиця 1

Результати кількісного спектрофотометричного визначення фенілефрину гідрохлориду в очних краплях

№ п/п	Об'єм лікарської форми, мл	A	A _o	Знайдено фенілефрину гідрохлориду, мг
1	1,0	0,450	0,428	26,25
2		0,447		26,08
3		0,415		24,22

Метрологічні характеристики середнього результату спектрофотометричного кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду в краплях підтвердили, що очні краплі за кількісним вмістом фенілефрину гідрохлориду відповідають вимогам ДФУ.

Для розробленої методики нами вивчено деякі валідаційні характеристики. Визначення робастності проводили на стадії розробки методики, зокрема встановили стабільність розчинів у часі (табл. 2).

Таблиця 2

Стабільність розчинів у часі

	Термін дослідження стабільності, t, хв.					Середнє
	0	15	30	45	60	
A st	0,428	0,428	0,427	0,428	0,427	0,427

Виявлено що оптична густина розчину залишається стабільною протягом години для очних крапель.

Висновок про правильність методики можна зробити після того, як встановлені специфічність, точність і лінійність.

Згідно з вимогам ДФУ [3] вміст фенілефрину гідрохлориду у краплях має бути від 90,0% до 110,0%. Виходячи з цього, можна визначити максимально припустиму невизначеність (Δ_{As}), яка дорівнює $\Delta_{As} = 3,2\%$.

Лінійність методики визначення фенілефрину гідрохлориду в краплях визначали в межах 80-120% від номінальної концентрації фенілефрину гідрохлориду. Було приготовано 9 модельних розчинів фенілефрину гідрохлориду з точними наважками таких концентрацій: 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%. Розчини готували за наведеною методикою. Лінійність розраховували за допомогою регресійного аналізу. Отримані величини, стандартні відхилення, залишкове стандартне відхилення для очних крапель наведені на рис 2 та в таблиці 3.

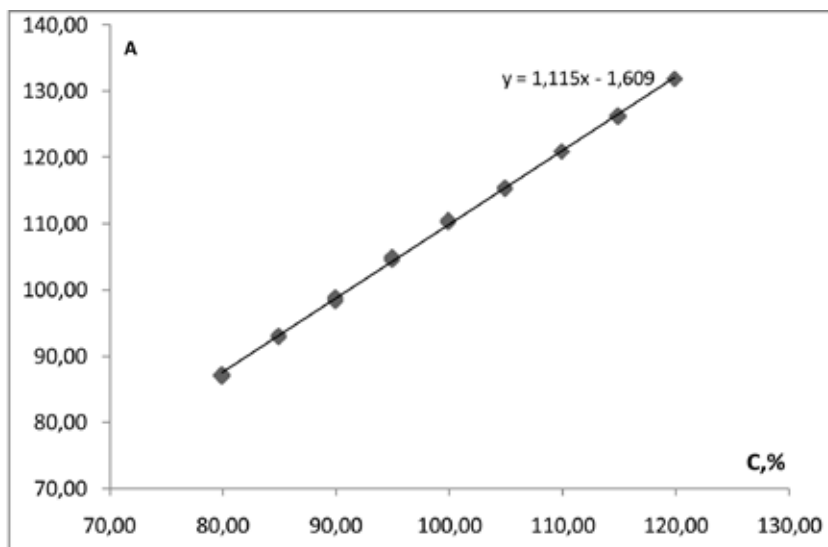


Рис. 2. Графік лінійної залежності у нормалізованих координатах

Як видно з таблиці 3 та рис.2. в нашому випадку виконуються вимоги ДФУ до параметрів лінійної залежності, тобто для очних крапель лінійність методики підтверджується у всьому діапазоні концентрацій 80-120 %.

Для оцінки збіжності, що характеризує точність методики для очних крапель, із трьох наважок готували три розчини, з якими проводили по три паралельні виміри (всього 9). Розроблена методика дозволяє одержувати результати зі збіжністю, достатньою для надійного визначення досліджуваних речовин.

Метрологічні характеристики лінійної залежності для очних крапель

Найменування величини	Значення	Критичні значення (критерії прийнятності)	Висновок (відповідає або не відповідає)
b	0,9995		-
s_b	0,0168		-
a	1,1191	max=5,1	відповідає
s_a	1,6968		-
s_r	13,1559		-
r	0,9965	min=0,99236	відповідає

З таблиці 4 видно, що методика аналізу очних крапель характеризується достатньою збіжністю і правильністю у всьому діапазоні концентрацій

Таблиця 4

Результати аналізу розчинів очних крапель та їх статистична обробка

Валідаційна характеристика	Спектрофотометричний метод
Середнє, \bar{z} %	100,01
Відносне стандартне відхилення, s_z %	0,1020
Відносний довірчий інтервал $\Delta\% = t(95\%,8) \cdot s_z = 1,8595 \cdot s_z =$	0,1896
Систематична похибка $\delta = \bar{z} - 100 $	0,01

Повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально припустиму невизначеність результатів (Δ_{AS}),

Прогноз невизначеності пробопідготовки розраховували за формулою:

$$\Delta_P = \sqrt{\sum_i \Delta_{v,i}^2} = \sqrt{0,4^2 + 0,6^2 + 0,6^2 + 0,0^2} = 0,7262 \geq 1,024\%$$

Прогноз повної невизначеності аналізу:

$$\Delta_A = \sqrt{\Delta_P^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{0,7262^2 + 0,3^2} = 0,84395 \leq \max \Delta_A = 3,2\%$$

Таким чином, прогнозована повна невизначеність результатів для методики кількісного визначення не перевищує критичного значення $\Delta_{AS}=3,2\%$, тобто методика буде давати коректні результати і в інших лабораторіях.

Таким чином, валідація підтвердила коректність методик кількісного визначення. Розглянута схема валідації може бути застосована без серйозних змін і для хроматографічних методик кількісного визначення.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

- Розроблена та стандартизована методика кількісного визначення

фенілефрину гідрохлориду в очних краплях з використанням методів абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області.

- За результатами валідації методики кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду в складі крапель обґрунтовано та експериментально доведено, що дані аналітичні методики можуть бути коректно відтворені, дають достовірні результати та придатні для забезпечення належної виробничої практики (GMP) та належної лабораторної практики (GLP) при аналізі розчину фенілефрину гідрохлориду в формі очних крапель. Це особливо важливо для фармацевтичного аналізу, коли ефективність препарату і безпека кожної партії базується виключно на контролі якості.

Література

1. Багирова В.Л., Гризодуб А.И., Чибіляев Т.Х. и др. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. Под ред. Н.В. Юргеля. М.: Фарм. пром. 2007.
2. McPolin Oona. Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis. United Kingdom: Mourn Training Service. 2009.
3. Державна Фармакопея України: стандарт / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Доповнення 2. Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 2008.
4. Кейтлин И. М., Мазулин А.В. Валидация аналитических методик. Сообщение 1. Запорож. мед. журн. 2008, 6: 48-50.
5. European Pharmacopoeia. 6th ed. Council of Europe. Strasbourg. 2007, 2.
6. Державний формуляр лікарських засобів: офіц. держ. Керівництво. Ред. В.Є. Бліхар та ін. Центр. формуляр. Комітет. Держ. експертний центр. К. 2010, 3. 2011.
7. Машковский М. Д. Лекарственные средства: пособие для врачей. 15-е изд., перераб., испр. и доп. М.: Новая Волна. 2008.
8. Clarke's analysis of drugs and poisons : in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Consulting editors, A.C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop; executive development editor, Jo Watts. London; Chicago: Pharmaceutical Press. 2011, 2.
9. R. M. Licea, C.M. G.Peca, M.B. Garcha, Yenilen Troche Concepciyn. Validation of an analytical method for quality control and stability study of 10 % Phenylephrine eye drops. Rev Cubana Farm. 2010, 44 (4): 494-502.
10. Savic I., Nikolic G., Bankovic V. Development and validation of spectrophotometric method for phenylephrine hydrochloride estimation in nasal drops formulations. Maced. J. Chem. Chem. Eng. 2008, 27 (2): 149-156.

Н.Ю. Бевз, А.В. Криванич, П.А. Безуглый

Валидация методики количественного определения фенилэфрина гидрохлорида в глазных каплях

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Введение. Учитывая актуальность обеспечения контроля качества на всех этапах жизненного цикла лекарственных средств данная работа является попыткой разработки и валидации простой в использовании, быстрой и точной, высокочувствительной, воспроизводимой методики идентификации и количественного определения действующих веществ и других компонентов лекарственных средств, содержащих раствор фенилэфрина гидрохлорида в форме глазных капель.

Цель. Разработка стандартизированной процедуры валидации спектрофотометрической методики количественного определения фенилэфрина гидрохлорида в глазных каплях, расчет критериев приемлемости валидационных характеристик.

Материалы и методы. Аналитические исследования проводили методом абсорбционной спектрофотометрии на спектрофотометре Evolution 60S v4.003, использовали весы лабораторные «AXIS» ANG 200 (Польша) и мерную посуду класса А на базе кафедры фармацевтической химии Национального фармацевтического университета.

Результаты. Результаты валидационных характеристик предложенной методики подтверждают её специфичность, линейность, правильность, диапазон применения и внутрилабораторную прецизионность.

Заключение. Установлено, что методика может быть корректно воспроизведена и является пригодной для использования в фармацевтическом анализе.

Ключевые слова: валидация; абсорбционная спектрофотометрия; фенилэфрина гидрохлорид; глазные капли.

N.Yu. Bevz, A.V. Kryvanych, P.O. Bezuglyi

Validation method for quantifying phenylephrine hydrochloride in eye drops

National pharmaceutical university, Kharkov

Introduction. Given the importance of quality control at all stages of the life cycle of medical drugs, the work done is an attempt to develop and validate simple in execution, fast and accurate, highly sensitive and reproducible method for identification and quantification of the active substances and other constituents of medicinal products with a solution of phenylephrine hydrochloride presented as eye drops.

Purpose. Development of a standardized procedure of validation of spectrophotometric methods of identification and quantitative determination of phenylephrine hydrochloride in eye drops, defining acceptance criteria of validation features.

Materials and methods. Analytical studies were carried out by absorption spectrophotometry employing Evolution 60S v4.003 spectrophotometer and volumetric ware of class A at the Department of Pharmaceutical Chemistry, National University of Pharmacy.

Results. The results of validation characteristics of the proposed method confirm its specificity, linearity, accuracy, range of application and intermediate precision.

Conclusion. It was found that the method can be properly reproduced and is suitable for use in pharmaceutical analysis.

Key words: validation, absorption spectrophotometry, phenylephrine hydrochloride, eye drops.

© С.Б. Білоус, 2013

С.Б. Білоус

ПЕРСПЕКТИВИ РОЗРОБКИ М'ЯКИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ДЛЯ ЗОВНІШНЬОГО ЗАСТОСУВАННЯ З НАНОЧАСТИНКАМИ СРІБЛА

Львівський національний медичний університет імені Д.Галицького

Вступ. На даний час оптимістичні прогнози зі створення ефективних антимікробних засобів пов'язують з наноструктурованими матеріалами, зокрема з наночастинками срібла.