

УДК: 615.07:615.453.42:543.062

К. Н. ТОРАЕВ, Л. В. ЕВСЕЕВА, С. Н. ГУВАРЬ

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

РАЗРАБОТКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕНФОТИАМИНА В КОМБИНИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ С МЕТФОРМИНА ГИДРОХЛОРИДОМ

Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения активного фармацевтического ингредиента (АФИ) бенфотиамина в комбинированной готовой лекарственной форме (ГЛФ) с метформина гидрохлоридом. Валидационные характеристики методики: специфичность, линейность, правильность, прецизионность в диапазоне концентраций бенфотиамина от 6,0 мкг/мл до 15,0 мкг/мл отвечают критериям приемлемости для тестов «Однородность дозированных единиц», «Количественное определение» и «Растворение».

Ключевые слова: бенфотиамин, метформина гидрохлорид, количественное определение, спектрофотометрический метод, валидация, критерии приемлемости.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ

Одна из серьезных проблем, с которыми на сегодняшний день сталкиваются производители твердых лекарственных форм, — это достижение однородности смеси при перемешивании компонентов. Особенно это касается компонентов, содержание которых значительно ниже, чем масса ГЛФ. Возможная вариабельность распределения действующего вещества в ГЛФ является критическим фактором для качества препарата [6, 7]. В связи с этим, аналитическая нормативная документация на ГЛФ в виде таблеток или капсул должна содержать тест «Однородность дозированных единиц» (ОДЕ). Определение осуществляется согласно требованиям общей статьи Государственной фармакопеи Украины (ГФУ) 2.9.40 [5].

Для определения ОДЕ используется метод прямого определения и расчетно-весовой метод. Для действующих веществ, содержание которых в ГЛФ составляет менее 25 мг, тест ОДЕ выполняется методом прямого определения. Для исследуемой новой ГЛФ капсулы метформина гидрохлорида (400 мг) и бенфотиамина (20 мг), тест ОДЕ для АФИ бенфотиамин должен выполняться методом прямого определения. В связи с тем, что проведение такого анализа требует значительных трудозатрат, целесообразна раз-

работка спектрофотометрической методики по собственному поглощению.

АНАЛИЗ ПОСЛЕДНИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПУБЛИКАЦИЙ

В практике анализа готовых лекарственных форм одной из проблем является определение АФИ в многокомпонентных препаратах. Количественное определение индивидуального компонента в сложных системах спектрофотометрическим одноволновым методом возможно при условии специфического интенсивного поглощения компонента и отсутствия наложения спектров других компонентов. В других случаях используют многоволновую спектрофотометрию.

Исходя из анализа литературных данных и собственных исследований определено, что исследуемые активные компоненты ГЛФ имеют интенсивное собственное светопоглощение в УФ области спектра. Для бенфотиамина характерно наличие максимума в области длин волн от 260 до 280 нм, где поглощение метформина гидрохлорида практически отсутствует. Эта область длин волн может быть использована для спектрофотометрического определения бенфотиамина в двухкомпонентных смесях с метформина гидрохлоридом [8, 9].

© Коллектив авторов, 2015

ВЫДЕЛЕНИЕ НЕРЕШЕННЫХ РАНЕЕ ЧАСТЕЙ ОБЩЕЙ ПРОБЛЕМЫ

Разработка спектрофотометрической методики количественного определения бенфотиамина в присутствии метформина гидрохлорида требует проведения исследований, доказывающих специфичность выбранной аналитической длины волны и отсутствие влияния второго компонента на результат определения бенфотиамина.

Соотношение компонентов в ГЛФ (метформина гидрохлорида 400 мг, бенфотиамина 20 мг), в таком же соотношении переходящее в аналит, позволяет говорить о наличии макро- и микрокомпонентов системы, что дополнительно усложняет решаемую задачу.

ФОРМУЛИРОВАНИЕ ЦЕЛЕЙ СТАТЬИ

Целью нашего исследования является разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения бенфотиамина в двухкомпонентной ГЛФ. Для подтверждения того, что аналитическая методика может быть использована для количественного определения бенфотиамина в ГЛФ (капсулы, метформина гидрохлорид 400 мг и бенфотиамин 20 мг) необходим расчет параметров линейности, правильности и прецизионности (сходимости) в рабочем диапазоне методики и сравнение этих параметров с критериями приемлемости, согласно ГФУ [4].

ИЗЛОЖЕНИЕ ОСНОВНОГО МАТЕРИАЛА ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и реактивы:

- АФИ бенфотиамин, производитель Yonezawa Hamari Chemicals, Япония;

- АФИ метформина гидрохлорид, производитель Aarti Drugs Limited, Индия;
- капсулы, содержащие 20 мг бенфотиамина и 400 мг метформина гидрохлорида, разработанные в условиях технологической научно-исследовательской лаборатории НФаУ;
- мерная посуда класса А.

Растворители, используемые в работе, соответствовали требованиям ГФУ раздел 4.2.1. «Реактивы» [3].

Инструменты: двухлучевой UV-VIS-спектрофотометр SPECORD 200; аналитические весы Mettler Toledo AB 204; ультразвуковая баня.

Бенфотиамин (Benfotiamine) или S-бензоилтиамин-O-монофосфат (молекулярная формула $C_{19}H_{23}N_4O_6PS$, структурная формула приведена на рис. 1 [10]) имеет характерный спектр поглощения в УФ области (рис. 2).

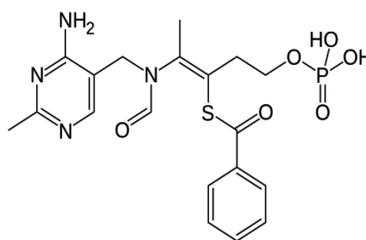


Рис. 1. Структурная формула бенфотиамина

Второй компонент ГЛФ — метформина гидрохлорид (Metformin hydrochloride) или 1,1-диметил-бигуанид гидрохлорид (молекулярная формула $C_4H_{11}N_5 \times HCl$ [11, 12], структурная формула приведена на рис. 3) имеет также характерный спектр поглощения в УФ области (рис. 4).

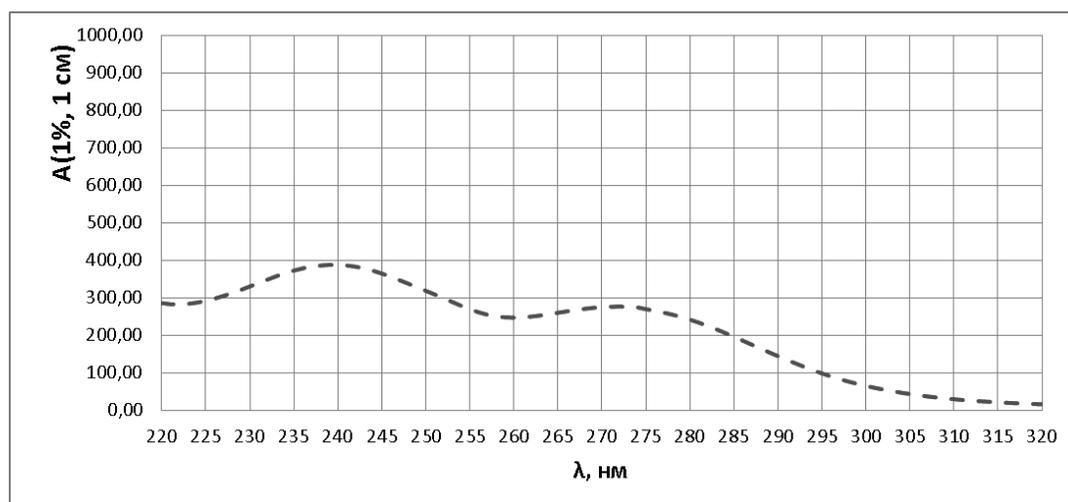


Рис. 2. Изменение удельного коэффициента собственного поглощения раствора бенфотиамина в буферном растворе pH=6,8 в области длин волн от 220 до 320 нм

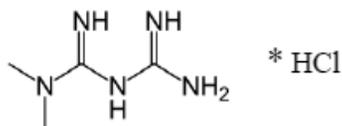


Рис. 3. Структурная формула метформина гидрохлорида

При наложении спектров поглощения компонентов ГЛФ видно, что существует область длин волн, где наблюдается максимум поглощения бенфотиамина и практически отсутствует поглощение метформина гидрохлорида (рис. 5). Кривые поглощения приведены в координатах удельного поглощения для удобства интерпретации результатов.

Из рис. 5 видно, что в области второго максимума бенфотиамина (от 268 до 272 нм) поглощение метформина гидрохлорида близко к нулю.

Исследования влияния pH на спектры компонентов показали, что УФ спектр метформина гидрохлорида в кислой среде (pH=1,2) имеет гипсохромный сдвиг (рис. 6).

Поскольку содержание метформина гидрохлорида (второго компонента ГЛФ) в 20 раз больше, чем содержание бенфотиамина, снижение остаточного поглощения метформина в области длин волн (270 ± 2) нм актуально для разрабатываемой методики.

Спектр бенфотиамина в кислой среде меняется незначительно: в области длин волн от 260 до 270 нм наблюдается сглаживание максимума и образование плеча (рис. 7).

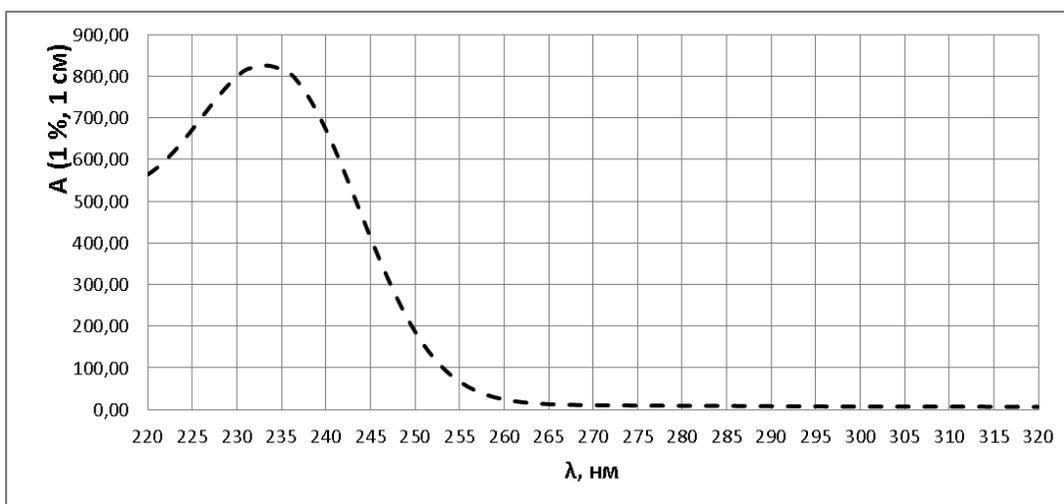


Рис. 4. Изменение удельного коэффициента собственного поглощения раствора метформина гидрохлорида в буферном растворе pH=6,8 в области длин волн от 220 до 320 нм

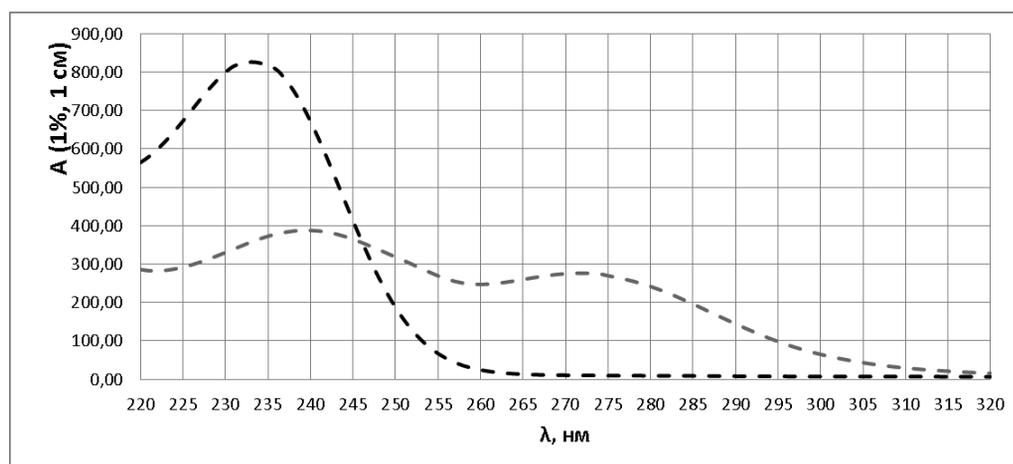


Рис. 5. Сравнение удельных коэффициентов собственного поглощения растворов метформина гидрохлорида и бенфотиамина в буферном растворе pH=6,8

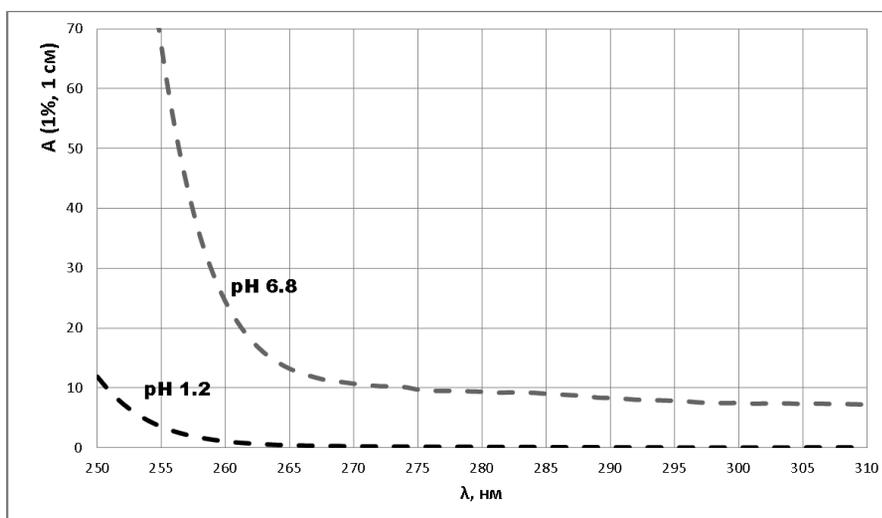


Рис. 6. Изменение удельного коэффициента собственного поглощения раствора метформина гидрохлорида в буферном растворе pH=6,8 и в 0,1 M растворе HCl pH=1,2 в области длин волн от 250 до 310 нм

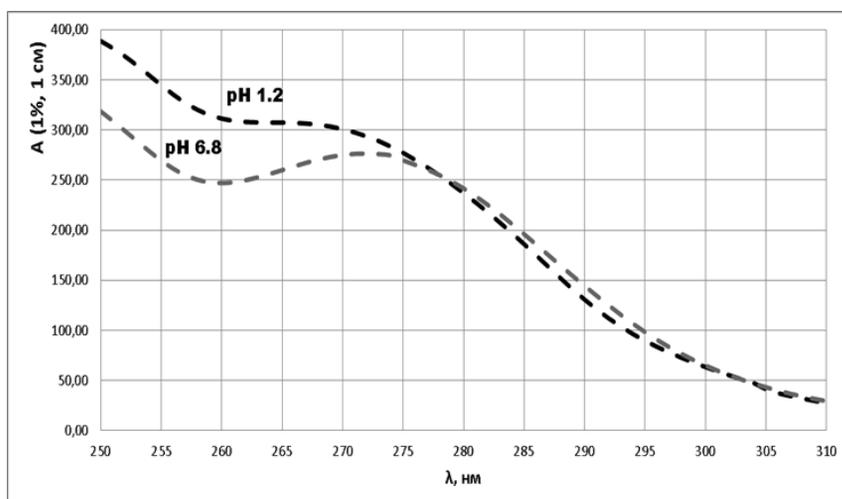


Рис. 7. Изменение удельного коэффициента собственного поглощения раствора бенфотиамин в буферном растворе pH=6,8 и в 0,1 M растворе HCl pH=1,2 в области длин волн от 250 до 310 нм

Проведенные исследования дают основание использовать кислую среду (0,1 M раствор HCl) и длину волны $\lambda = 270$ нм для количественного определения бенфотиамин в двухкомпонентной системе с метформин гидрохлоридом.

Двадцатикратное превышение концентрации макрокомпонента – метформин гидрохлорида в анализе, даже в условиях использования аналитической длины волны, где удельный показатель макрокомпонента близок к нулю, возможно будет иметь значимое влияние на результаты определения. На основании определенных в ходе исследований значений удельных показателей поглощения бенфотиамин и метформин

гидрохлорида расчет возможной ошибки показал незначущее влияние аналитического сигнала метформин гидрохлорида на поглощение бенфотиамин, однако эти данные не могут быть корректными из-за очень слабого аналитического сигнала метформин гидрохлорида в области $\lambda = 270$ нм: $A_{Met} = 0,003$ по сравнению с бенфотиамин $A_{Benf} = 0,300$.

Нами проведены исследования валидационных параметров спектрофотометрической методики количественного определения бенфотиамин методом стандарта по собственному поглощению при длине волны 270 нм в 0,1 M растворе HCl на модельных растворах без мет-

форма гидрохлорида (табл. 1) и в присутствии метформина гидрохлорида в соотношении концентраций, аналогичных соотношению концентраций АФИ в ГЛФ (табл. 2). Исследования линейности методики проведены одновременно с определением параметров прецизионности и правильности на 9-ти модельных растворах. Рабочая область концентраций бенфотиамина: 10 мкг/мл \pm 50 %, концентрация метформина во всех модельных растворах 200 мкг/мл.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили в соответствии с рекомендациями ГФУ «Статистический анализ

результатов химического эксперимента» N [3] и рекомендаций стандартизированных процедур [1]. Оценку полученных метрологических характеристик проводили в соответствии с критериями приемлемости валидационных характеристик для теста «Однородность дозированных единиц» (ОДЕ), «Количественное определение» (КО) и теста «Растворение» [5].

Рассчитанные параметры спектрофотометрической методики количественного определения бенфотиамина в присутствии метформина гидрохлорида соответствуют критериям приемлемости.

Таблица 1

**СООТВЕТСТВИЕ РАССЧИТАННЫХ ВАЛИДАЦИОННЫХ ПАРАМЕТРОВ
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
БЕНФОТИАМИНА ($C_{\text{БЕНФ.}}=10 \text{ МКГ/МЛ} \pm 50 \%$, СРЕДА — 0,1 М РАСТВОР НСЛ, $\lambda = 270 \text{ нм}$)**

Параметр	Критерии приемлемости для теста				Расчетное значение	Вывод
	КО $B = \pm 10\%$	ОДЕ	Растворение (Q= 75 %)			
Линейность						
a	$\leq 5,1$	$\leq 3,1$	$\leq 1,92$		1,0673	Соответствует
S_0	$\leq 1,69$	$\leq 1,58$	$\leq 1,58$		1,02	Соответствует
r	$\geq 0,99236$	$\geq 0,99865$	$\geq 0,99710$		$R^2=0,9989$ $r=0,99945$	Соответствует
Правильность:						
Критерий практической незначимости						
max σ	$\leq 1,02$	$\leq 0,96$	$\leq 0,96$	0,16		Соответствует
Критерий статистической незначимости						
max σ	$\leq \Delta z/\sqrt{n}=0,65$			0,16		Соответствует
Прецизионность (сходимость):						
Δz	$\leq 3,2$	$\leq 3,0$	$\leq 3,0$	1,94		Соответствует

Таблица 2

**СООТВЕТСТВИЕ РАССЧИТАННЫХ ВАЛИДАЦИОННЫХ ПАРАМЕТРОВ
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
БЕНФОТИАМИНА ($C_{\text{БЕНФ.}}=10 \text{ МКГ/МЛ} \pm 50 \%$, СРЕДА — 0,1 М РАСТВОР НСЛ,
 $\lambda = 270 \text{ нм}$) В ПРИСУТСТВИИ МЕТФОРМИНА ГИДРОХЛОРИДА (200 МКГ/МЛ).**

Параметр	Критерии приемлемости для теста				Расчетное значение	Вывод
	КО $B = \pm 10\%$	ОДЕ	Растворение (Q= 75%)			
Линейность						
a	$\leq 5,1$	$\leq 3,1$	$\leq 1,92$		0,4702	Соответствует
S_0	$\leq 1,69$	$\leq 1,58$	$\leq 1,58$		1,01	Соответствует
r	$\geq 0,99236$	$\geq 0,99865$	$\geq 0,99710$		$R^2=0,9988$ $r=0,99940$	Соответствует
Правильность:						
Критерий практической незначимости						
max σ	$\leq 1,02$	$\leq 0,96$	$\leq 0,96$	0,30		Соответствует
Критерий статистической незначимости						
max σ	$\leq \Delta z/\sqrt{n}=0,64$			0,30		Соответствует
Прецизионность (сходимость):						
Δz	$\leq 3,2$	$\leq 3,0$	$\leq 3,0$	1,92	1,92	Соответствует

**СРАВНЕНИЕ СРЕДНИХ РЕЗУЛЬТАТОВ ДВУХ ВЫБОРОК МЕТОДИКИ
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕНФОТИАМИНА**

Кол-во выборок	$n_1 = n_2$	$v_{\text{обм.}}$	$(s_1)^2$	$(s_2)^2$	S_p	$(X_1)_{\text{cp}}$	$(X_2)_{\text{cp}}$	$t_{\text{расч.}}$	$t(95\%, v=16)$
2	9	16	1,05	0,95	0,4714	99,40	99,18	0,4667	1,7459

Сопоставление двух выборок результатов проводили согласно ГФУ «Сравнение средних результатов двух выборок» (ГФУ 1.1., с. 195) [4], определяя, являются ли значащими различия между средними значениями. Сравнение проводили по расчетному значению критерия Стьюдента, используя разность между средними и рассчитанную дисперсию этой разности (табл. 3). Предварительное определение расхождения между дисперсиями двух выборок (по критерию Фишера) показало, что оно не значаще.

Влияние метформина гидрохлорида на количественное определение бенфотиамина в условиях разработанной методики не обнаружено.

**ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ
ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

1. Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения бенфотиамина в двухкомпонентной лекарственной форме капсулы метформина гидрохлорида (400 мг) с бенфотиаминном (20 мг), которая может быть использована для тестов «Однородность дозированных единиц», «Количественное определение» и «Растворение».

2. Проведенные валидационные исследования подтверждают специфичность, линейность, прецизионность (сходимость) и правильность методики в рабочем диапазоне концентраций бенфотиамина от 0,006 мг/мл до 0,015 мг/мл в 0.1 М растворе HCl ($\lambda = 270$ нм) в присутствии макрокомпонента метформина гидрохлорида.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ
ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ**

1. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.2:2011. – Лікарські засоби. Управління ризиками для якості (ICH Q9) / М. Ляпунов, О. Безугла, О. Соловйов та ін. – Київ, МОЗ України, 2011. – 30 с.
2. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.3:2011. – Лікарські засоби. Фармацевтична система якості

- (ICH Q10) / М. Ляпунов, О. Безугла, О. Соловйов та ін. – Київ, МОЗ України, 2011. – 30 с.
3. Державна Фармакопея України / Держ. п-во “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-е вид. – Х. : РІРЕГ, 2001. – 556 с.
4. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., Доповнення 1. – Х.: РІРЕГ, 2004. – 520 с.
5. Державна Фармакопея України / Держ. п-во “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-е вид., Доповнення 2. – Х.: 2008. – 620 с.
6. Державна Фармакопея України / Держ. п-во “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”. – 1-е вид., Доповнення 3. – Х., 2009. – 280 с.
7. Гризодуб А. И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ / А. И. Гризодуб // Фармаком. – 2002. – № 3.
8. Подгайний Д. Г. Спектрофотометричне визначення діакамфу та метформіну в антидіабетичному засобі / Д. Г. Подгайний, С. І. Мерзлікін, М. Є. Блажеєвський // Фармаком. – 2009. – № 2. – С. 98–104.
9. Тораев К. Н. Стандартизація вимог до кількісного визначення бенфотиаміну в субстанції і готової лікарської форми / К. Н. Тораев, Л. В. Евсеєва, С. М. Губарь // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2015. – №2. – С.14-19.
10. Benfotiamine. Monograph // Alternative Medicine. Review.– 2006.-V.11, № 3.- p.238-242.
11. European Pharmacopoeia. – 8.4th ed. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2015.
12. British Pharmacopoeia Volume III. Formulated Preparations: Specific Monographs. – British Pharmacopoeia Commission, 2014.

УДК: 615.07:615.453.42:543.062

К. Н. Тораєв, Л.В. Євсєєва, С.М. Губарь

**РОЗРОБКА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ БЕНФОТІАМІНУ
В КОМБІНОВАНІЙ ЛІКАРСЬКІЙ ФОРМІ З МЕТФОРМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ**

Розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення активного фармацевтичного інгредієнту (АФІ) бенфотіаміна в комбінованій готовій лікарській формі (ГЛФ) з метформіну гідрохлориду. Валідаційні характеристики методики: специфічність, лінійність, правильність, прецизійність у діапазоні концентрацій бенфотіаміна від 6,0 до 15,0 мкг/мл відповідають критеріям прийнятності для тестів «Однорідність дозованих одиниць», «Кількісне визначення» і «Розчинення».

Ключові слова: бенфотіамін, метформіну гідрохлорид, кількісне визначення, спектрофотометричний метод, валідація, критерії прийнятності.

UDC: 615.07:615.453.42:54.062

K. N. Toraev, L. V. Ievsieieva, S. M. Gubar

**DEVELOPMENT SPECTROPHOTOMETRIC METOD FOR DETERMINING BENFOTIAMINE
IN FIXED-DOSE COMBINATION WITH METFORMIN HYDROCHLORIDE**

A spectrophotometric method for assay active pharmaceutical ingredient benfotiamine in fixed-dose combination with metformin hydrochloride was developed. The validation characteristics: specificity, linearity, accuracy, precision in the concentration range from 6,0 to 15,0 µg/ml is conformed to the acceptable criteria for tests "Uniformity of dosage units", "Assay" and "Dissolution".

Key words: benfotiamine, metformin hydrochloride, assay, spectrophotometric method, validation, acceptable criteria.

Адреса для листування:

61168, м. Харьков, ул. Блюхера, 4.

Государственная научно-исследовательская
лаборатория по контролю качества
лекарственных средств НФаУю

Тел.: 099 240 83 32

Надійшла до редакції:

29.10.2015 р.