



УДК 615.11

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕКСОФЕНАДИНА В СУБСТАНЦИИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

DEVELOPMENT OF TECHNIQUE FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF FEXOFENADINE IN SUBSTANCE SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

З.Д. Хаджиева¹, В.А. Чумакова², Л.Б. Губанова¹
Z.D. Khadzhieva¹, V.A. Chumakova², L.V. Gubanova¹

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт
Россия, 357532, Ставропольский край, г. Пятигорск-32, пр. Калинина, 11
²Бюджетное учреждение Воронежской области «Воронежский центр контроля качества и
сертификации лекарственных средств»
Россия, 394051, г. Воронеж, ул. Писателя Маршак Д. 1

¹Pyatigorsk medical-pharmaceutical Institute
Russia, 357532, Stavropol territory, Pyatigorsk-32, prospect Kalinina, 11
²Budgetary institution of the Voronezh region
«The Voronezh center of quality control and certification of medicines»
Russia, 394051, Voronezh, St. Writer Marshak D. 1

E-mail: zara-farm@mail.ru, v.chumakva@yandex.ru

Ключевые слова: фексофенадин, аллергия, антигистаминные, спектрофотометрический метод.
Key words: Fexofenadine, Allergy, antihistamine, spectrophotometric method.

Аннотация. В настоящей статье разработана методика количественного определения фексофенадина в субстанции спектрофотометрическим методом, определена аналитическая длина волны, удельный показатель поглощения, а так же проведена валидационная оценка методики по показателям линейность, прецизионность и правильность.

Resume. In this article developed method for the quantitative determination of Fexofenadine in substance spectrophotometric method, the analytical wavelength, the specific absorption coefficient, as well as conducted the validation of the assessment methods in terms of linearity, precision and accuracy.

Введение

По данным всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) аллергическим заболеваниям подвержено от 30 до 60% населения мегаполисов. Рост числа аллергических заболеваний отмечается как среди взрослых, так и среди детей. Наиболее часто встречающимся видом аллергических реакций является респираторная аллергия в виде аллергического ринита, который встречается у 20-25% населения земного шара, и за последнюю четверть столетия количество больных увеличилось втрое [Новости медицины на EUROLAB, 2014].

Первые антигистаминные препараты появились еще в 40-х годах XX в. и произвели своеобразную революцию в лечении аллергических реакций различного происхождения. В дальнейшем рост числа аллергических заболеваний как результат глобальных экономических проблем обусловил повышение интереса к этой группе препаратов. В настоящее время антигистаминные препараты являются одними из наиболее продаваемых в мире.

Однако наряду с антиаллергическим действием антигистаминные препараты оказывают и ряд побочных эффектов, которые обусловлены тем, что они воздействуют на все типы H-рецепторов. Наибольшее клиническое значение имеет то, что антигистаминные препараты I поколения проникают через гематоэнцефалический барьер, что проявляется седативным эффектом, сонливостью, головокружением, нарушением координации движений и другими расстройствами психомоторной функции. Кроме того, эти средства обладают антихолинергической активностью, которая проявляется ощущением сухости во рту, дискомфортом в эпигастральной области, нарушением мочеиспускания, импотенцией.

Только с появлением антигистаминных препаратов II поколения существенно улучшилось качество жизни пациентов с аллергическими реакциями. Первые антигистаминные препараты II поколения были разработаны в 1981 г. Их антиаллергическая активность сопоставима с таковой препаратов I поколения, но они не проявляют седативного и некоторых других побочных эффектов. Первым таким препаратом стал терфенадин.



Со временем выяснилось, что терфенадин в комбинации с определенными препаратами и при определенных условиях способен вызывать полиморфную желудочковую тахикардию, фибрилляцию желудочков, что может привести к смерти пациента. В результате дальнейших исследований было установлено, что основное антигистаминное действие оказывает метаболит терфенадина — фексофенадин, который не проявляет кардиотоксического эффекта и не вызывает других побочных явлений. Поэтому при разработке антигистаминных препаратов III поколения основные усилия были направлены на выделение и изучение активных метаболитов антигистаминных препаратов II поколения.

В настоящее время к антигистаминным препаратам III поколения относят фексофенадин, норрастемизол, дескарбозтоксилоратадин. Все они являются фармакологически активными метаболитами антигистаминных препаратов II поколения. Фексофенадин практически не подвергается биотрансформации, что обеспечивает его безопасность. Препарат является одним из наиболее продаваемых в мире [Новое качество жизни с телфастом [электронный ресурс].- 2014].

В связи с этим особое значение приобретает контроль качества этого препарата. Сегодня широко применяется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) как для установления подлинности и чистоты препарата, так и для его количественного определения. Спектрофотометрический метод при анализе количественного содержания фексофенадина на сегодняшний день не получил широкого распространения, несмотря на более доступное приборное оснащение для лабораторий контроля качества лекарств.

Цель

Целью нашего исследования явилось разработка методики качественного и количественного определения фексофенадина гидрохлорида спектрофотометрическим методом.

Материалы и методы

В работе использованы мерную посуду класса А, весы аналитические Тип AR - 2140, спектрофотометр СФ 2000 (фотометрическая точность 0.005, фотометрическая воспроизводимость – 0.0005)

Объектом исследования была субстанция фексофенадина гидрохлорида, соответствующую требованиям НД 42-13016-04 (содержание активного вещества 99.2%), из которой готовили модельные растворы с 0.001%, 0.0015, 0.002%, 0.0025%, 0.003%, 0.0035%, 0.004%, 0.0045%, 0.005%, 0.0055% содержанием фексофенадина.

Методика количественного определения фексофенадина: точную навеску (около 0.1 г) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 5% раствора натрия гидроксида, растворяют при перемешивании и объем раствора в колбе доводят до метки этим же растворителем (раствор А). Аликвоту в количестве 2 мл переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора в колбе до метки этим же растворителем. Оптическую плотность полученного раствора измеряют при длине волны 228 нм. Раствор сравнения – 5% раствор натрия гидроксида.

Содержание фексофенадина гидрохлорида (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X_{\%} = \frac{A \times W_1 \times W_2}{A_{1\text{ см}}^{1\%} \times a \times V_a}$$

где $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения фексофенадина гидрохлорида (173/9);

A – оптическая плотность;

W_1 и W_2 – объемы мерных колб, использованных для разведения, мл;

a и V_a – навеска препарата (г) и аликвота (мл) соответственно.

Результаты и обсуждение

Из нормативной документации на фексофенадина гидрохлорид [Фексофенадина гидрохлорид. – НД 42-13016-04. - 16с.] известно, что он растворим в метаноле и 5% растворах щелочей. В качестве растворителя нами был выбран 5% раствор натрия гидроксида как менее токсичный по сравнению с метанолом.

Химическая структура препарата позволяет предположить, что максимум поглощения следует ожидать в УФ области спектра. Это предположение подтверждается также тем, что по известной ВЭЖХ методике детектирование ведут при длине волны 215 нм.

Для установления аналитической длины волны и выбора концентрации анализируемого раствора готовили растворы фексофенадина гидрохлорида по следующей методике. Точную навеску (около 0.1 г) препарата помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл 5% раствора натрия гидроксида, растворяли при перемешивании и объем раствора в колбе довели до метки этим же растворителем (раствор А). Далее в пять мерных колб вместимостью 100 мл переносили 1, 2, 3, 4, и 5 мл раствора А соответственно и довели объемы растворов в колбах до метки этим же растворителем. Спектры поглощения регистрировали в диапазоне длин волн от 200 до 380 нм. На

рисунке 1 представлены наиболее информативные участки полученных спектров в диапазоне длин волн от 200 до 240 нм.

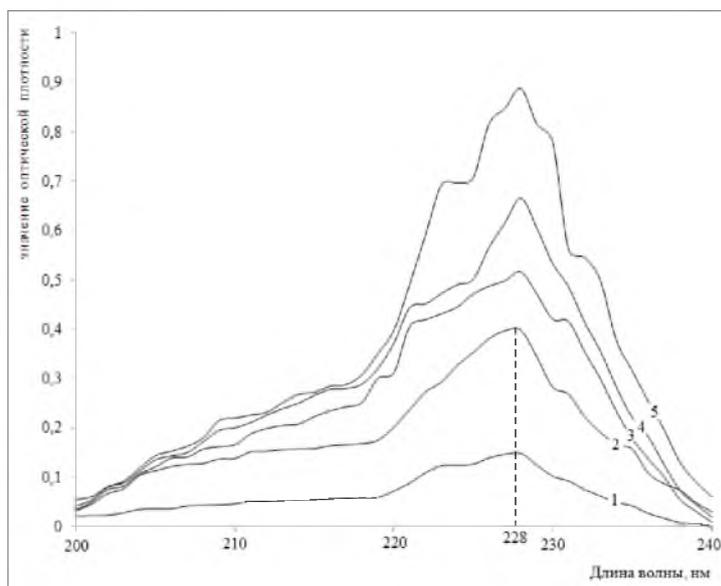


Рис. 1. Спектры поглощения растворов фексофенадина гидрохлорида: 1 – 0.001%; 2 – 0.002%; 3 – 0.003%; 4 – 0.004%; 5 – 0.005% в 5% растворе натрия гидроксида

Fig. 1. Ranges of absorption of solutions of a feksofenadin of a hydrochloride: 1 – 0.001%; 2 – 0.002%; 3 – 0.003%; 4 – 0.004%; 5 – 0.005% in 5% hydroxide sodium solution

Как следует из полученных данных, аналитическая длина волны составляет 228 нм. Наиболее приемлемой концентрацией фексофенадина гидрохлорида для получения результатов с наименьшей относительной погрешностью является концентрация – 0.002%, т.к. величина оптической плотности при использовании этой концентрации раствора препарата равна 0.397. Следовательно, идентифицировать препарат можно спектрофотометрическим методом, максимум поглощения 0.002% раствора фексофенадина в 5% растворе натрия гидроксида должен находиться при 228 нм.

Для разработки методики количественного определения предварительно провели исследования по установлению величины удельного показателя поглощения фексофенадина гидрохлорида в 5% растворе натрия гидроксида.

Для этого готовили десять экспериментальных растворов следующим образом. В десять мерных колб вместимостью 100 мл переносили соответственно 1; 1.5; 2; 2.5; 3; 3.5; 4; 4.5; 5 и 5.5 мл раствора А. Объемы растворов в колбах доводили до метки 5% раствором натрия гидроксида.

Оптическую плотность измеряли при длине волны 228 нм.

Величину удельного показателя поглощения рассчитывали по формуле:

$$A_{1\text{ см}}^{1\%} = \frac{A \times W_1 \times W_2}{a \times V_a \times 100},$$

где $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения фексофенадина гидрохлорида;

A – оптическая плотность;

W_1 и W_2 – объемы мерных колб, использованных для разведения, мл;

a и V_a – навеска препарата (г) и аликвота (мл) соответственно;

Полученные результаты представлены в табл. 1.

Как следует из представленных данных, величина удельного показателя поглощения фексофенадина гидрохлорида в 5% растворе натрия гидроксида составила 173.9.

Для целей фармацевтического анализа предлагаемая методика спектрофотометрического определения фексофенадина гидрохлорида подлежит валидационной оценке по показателям линейность, прецизионность и правильность [Государственная Фармакопея Российской Федерации, 2008].

Согласно ОФС «Валидация аналитических методик» [Валидация аналитических методик, 2009] методики количественного определения должны быть применимы в интервале от 80 до 120 % от номинального значения определяемой аналитической характеристики. Поэтому для установления линейной зависимости методики количественного определения содержания фексофенадина гидрохлорида в субстанции с использованием рассчитанного нами удельного показателя поглощения, готовили пять растворов со следующим содержанием фексофенадина, г/мл: 0.000016; 0.000018; 0.000020; 0.000022; 0.000024. По полученным данным строили график зависимости оптической плотности от концентрации аналита в растворе (рис. 2).

Таблица 1
Table. 1

Результаты определения удельного показателя поглощения фексофенадина гидрохлорида
Results of definition of a specific indicator of absorption of a feksofenadin of a hydrochloride

Концентрация раствора, %	Значение оптической плотности, А	Рассчитанное значение удельного показателя поглощения, $A_{1\text{ см}}^{1\%}$
0.0010	0.148	148.0
0.0015	0.259	172.7
0.0020	0.348	177.5
0.0025	0.463	185.2
0.0030	0.516	172.0
0.0035	0.592	169.1
0.0040	0.666	166.5
0.0045	0.774	172.0
0.0050	0.888	177.6
0.0055	0.976	198.5
		$\overline{A_{1\text{ см}}^{1\%}} = 173.9$

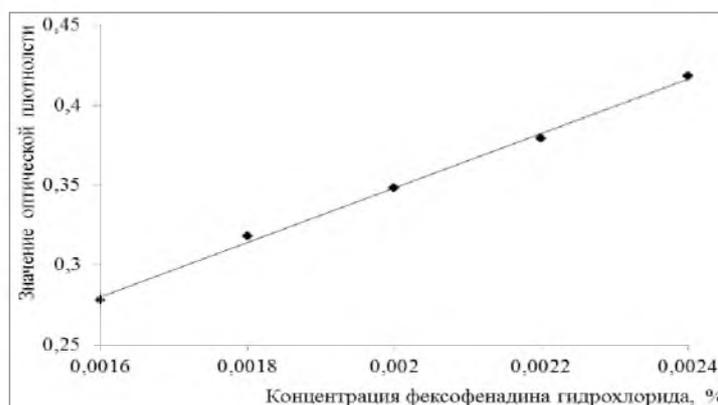


Рис. 2. Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации фексофенадина гидрохлорида

Fig. 2. Calibration schedule of dependence of optical density on concentration feksofenadina of a hydrochloride

Как следует из рисунка 2, почти все экспериментальные точки лежат на линии тренда. Наличие линейной зависимости между концентрацией (x) и значением оптической плотности (y) подтверждали расчетным путем. Для этого по экспериментальным данным оценивали достоверность линейной связи между x и y с использованием корреляционного анализа, а затем рассчитывали значения констант a и b зависимости (y=bx+a). В первом приближении судить о достоверности линейной связи между переменными x и y можно по величине коэффициента корреляции r, который вычисляли по уравнению:

$$r = \frac{m \sum_{i=1}^m x_i y_i - \sum_{i=1}^m x_i \sum_{i=1}^m y_i}{\sqrt{\left[m \sum_{i=1}^m x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^m x_i \right)^2 \right] \left[m \sum_{i=1}^m y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^m y_i \right)^2 \right]}}$$

исходя из экспериментальных данных. Чем ближе значение $|r|$ к единице, тем менее наблюдаемая линейная зависимость может рассматриваться как случайная. В аналитической химии в большинстве случаев используют линейные зависимости, отвечающие условию $|r| \geq 0.99$ [Статистическая обработка результатов химического эксперимента, 2009].



Коэффициенты a и b и метрологические характеристики зависимости рассчитывали с использованием регрессионного анализа методом наименьших квадратов по экспериментально измеренным значениям переменной y для заданных значений аргумента x (табл. 2).

Таблица 2
Table. 2

Промежуточные данные для вычисления коэффициента корреляции
Intermediate data for calculation of coefficient of correlation

x_i	y_i	$x_i \times y_i$	x_i^2	y_i^2
0.0016	0.278	0.0004448	0.00000256	0.077284
0.0018	0.318	0.0005724	0.00000324	0.101124
0.0020	0.348	0.000696	0.00000400	0.121104
0.0022	0.379	0.0008338	0.00000484	0.143641
0.0024	0.418	0.0010032	0.00000576	0.174724
$\Sigma = 0.01$	$\Sigma = 1.741$	$\Sigma = 0.00355$	$\Sigma = 0.0000204$	$\Sigma = 0.617877$

Рассчитанное значение коэффициента корреляции составило 0.996.
Коэффициенты a и b рассчитывали по следующим формулам

$$b = \frac{m \sum_{1}^{m} x_i y_i - \sum_{1}^{m} x_i \sum_{1}^{m} y_i}{m \sum_{1}^{m} x_i^2 - \left(\sum_{1}^{m} x_i \right)^2} \quad a = \frac{\sum_{1}^{m} y_i - b \sum_{1}^{m} x_i}{m}$$

где m – объем выборки.

Таким образом, уравнение линейной зависимости имеет вид:

$$y = 170x + 0.0082$$

Поскольку значение коэффициента корреляции в нашем случае максимально приближено к 1, то можно утверждать о наличии жесткой линейной зависимости оптической плотности от концентрации фексофенадина гидрохлорида.

Для целей фармацевтического анализа при определении прецизионности (воспроизводимости) методики достаточно установить ее повторяемость (сходимость). Для этого проводили шесть параллельных определений, вычисляли стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение. Результаты эксперимента представлены в таблице 3.

Таблица 3
Table. 3

Результаты определения воспроизводимости методики
Results of determination of reproducibility of a technique

$$\left(A_{1 \text{ см}}^{1\%} = 173.9 \right)$$

Масса навески, г	Значение оптической плотности, A ($\lambda = 228 \text{ нм}$)	Найдено фексофенадина гидрохлорида, %	Метрологические характеристики
0.1001	0.347	99.67	$\bar{X} = 100.125$ $SD = 2.2361$ $RSD = 2.2\%$
0.1008	0.350	99.83	
0.0998	0.348	100.23	
0.0976	0.346	101.98	
0.1001	0.352	101.06	
0.1017	0.350	98.98	

На основании полученных данных можно считать методику воспроизводимой на уровне ее сходимости, относительной стандартное отклонение ставило 2.2%.

Для оценки правильности методики готовили модельный раствор фексофенадина гидрохлорида, содержащий 0.0024% препарата, так как это содержание находится на верхнем пределе линейности методики. Чтобы получить смеси с тремя уровнями концентраций – 1:0.5; 1:1 и 1:2, полученное извлечение разводили 5% раствором натрия гидроксида.

На каждом уровне концентраций проводили определение содержания фексофенадина гидрохлорида, рассчитывали открываемость и оценивали правильность методики (табл. 4).

Из представленных результатов следует, что на всех трех уровнях концентраций анализируемого объекта получают сопоставимые результаты, а относительная погрешность определения правильности методики равна 2.32%.

Согласно проведенной валидационной оценке методика определения количественного содержания фексофенадина гидрохлорида в субстанции является линейной, воспроизводимой и правильной.



Таблица 4
Table. 4

Результаты оценки правильности методики определения количественного содержания фексофенадина гидрохлорида в субстанции
Results of an assessment of correctness of a technique of definition of the quantitative contents feksofenadina of a hydrochloride in substance

Разведение модельного раствора	Расчетное содержание фексофенадина гидрохлорида, %	Найденное содержание фексофенадина гидрохлорида, %	Открываемость, R,%	Метрологические характеристики
1: 0.5	0.001600	0.001640	102.79	$\bar{X} = 100,79\%$ $SD = 2,3365$ $RSD=2,32\%$
1: 0.5	0.001600	0.001670	104.57	
1: 0.5	0.001600	0.001570	98.13	
1: 1	0.001200	0.001170	97.78	
1: 1	0.001200	0.001189	101.32	
1: 1	0.001200	0.001198	99.98	
1: 2	0.000800	0.000825	103.15	
1: 2	0.000800	0.000794	99.25	
1: 2	0.000800	0.000801	100.18	

Выводы

1. Определена аналитическая длина волны для идентификации препарата спектрофотометрическим методом.
2. Разработана и валидирована методика спектрофотометрического определения количественного содержания фексофенадина гидрохлорида в субстанции.
3. Установлена специфичность методики, линейность подтверждена результатами корреляционного анализа, показано, что методика является воспроизводимой на уровне сходимости и правильной, исходя из рассчитанного показателя открываемости.
4. Несмотря на применение такого мощного средства анализа субстанции как высокоэффективная жидкостная хроматография, данная методика спектрофотометрического анализа не уступает методу ВЭЖХ и обладает основными преимуществами, такими как доступность оборудования, использование малотоксичных растворителей, высокая чувствительность, точность, простота и экспрессность.

Список литературы
References

Новости медицины на EUROLAB, 2014. – Режим доступа: <http://www.eurolab.ua/news/world-news/39501>.
 Novosti mediciny na EUROLAB, 2014, Rezhim dostupa: <http://www.eurolab.ua/news/world-news/39501> (in Russian).
 Новое качество жизни с телфастом [электронный ресурс].- 2014. – Режим доступа: <http://apteka.ua/article/32945>.
 Novee kachestvo zhizni s telfastom [jelektronnyj resurs], 2014, Rezhim dostupa: <http://apteka.ua/article/32945> (in Russian).
 Фексофенадина гидрохлорид. – НД 42-13016-04. - 16с.
 Feksofenadina gidrohlorid, ND 42-13016-04, pp. 16 (in Russian).
 Государственная Фармакопея Российской Федерации. - М.: НИЦСМП, 2008.-Вып. 1.-704с.
 Gosudarstvennaja Farmakopeja Rossijskoj Federacii, M.: NCJeSMP, 2008, Vyp. 1.-pp. 704 (in Russian).
 Валидация аналитических методик. – ОФС 42-0113-09, 2009. – 12с.
 Validacija analiticheskikh metodik, OFS 42-0113-09, 2009, pp 12 (in Russian).
 Статистическая обработка результатов химического эксперимента. – ОФС 42-0111-09, 2009. – 25с.
 Statisticheskaja obrabotka rezul'tatov himicheskogo jeksperimenta, OFS 42-0111-09, 2009, pp. 25 (in Russian).