

Гончикова Ю.А. ¹, Чмелевская Н.В. ², Илпарionoва Е.А. ¹**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛАМИВУДИНА МЕТОДОМ
УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ**¹ ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России
(664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1, Россия)² ГБУЗ Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы
(664081, г. Иркутск, ул. 1-я Красноказачья, 131, Россия)

ВИЧ-инфекция представляет угрозу для личной, общественной и государственной безопасности, а также для существования человечества в целом.

Изучаемый нами антиретровирусный препарат – ламивудин, направлен на замедление репродукции вируса и на уменьшение его количества в организме человека. Современные методы оценки качества исследуемого препарата имеют ряд недостатков. Цель исследования состояла в разработке методики количественного определения ламивудина УФ-спектрофотометрическим методом с использованием оптического образца сравнения.

Были изучены спектральные характеристики ламивудина при различных значениях pH и определена его аналитическая длина волны (279 нм). В качестве растворителя была выбрана 0,1 М кислота хлористоводородная, в растворе которой достигается максимальная стабильность ламивудина. Образцом сравнения стал 4,4'-диоксифталофенон, потому что аналитическая длина волны ламивудина входит в оптимальный для него интервал (268–282 нм). В формулу расчёта результатов нужно было ввести коэффициент пересчёта, который позволил учесть природу изучаемого вещества, а также различия в значениях удельных показателей поглощения ламивудина и 4,4'-диоксифталофенона. Рассчитанный коэффициент пересчёта составил 0,1985. Предложенные новые условия УФ-спектрофотометрического определения ламивудина были использованы для количественного определения ламивудина в субстанции и таблетках данного препарата. Ошибка определения ламивудина в субстанции не превышает 0,85 %, в таблетках – 1,6 %.

Была проведена валидационная оценка разработанной методики УФ-спектрофотометрического определения ламивудина с использованием стандартного образца 4,4'-диоксифталофенона по критериям: специфичность, правильность, прецизионность, линейность результатов, аналитическая область методики. Полученные результаты подтвердили, что разработанная методика соответствует требованиям нормативных документов и пригодна для анализа.

Ключевые слова: ламивудин, спектрофотометрия, оптический образец сравнения, коэффициент пересчёта, 4,4'-диоксифталофенон

QUANTITATION OF LAMIVUDINE BY UV SPECTROPHOTOMETRYGonchikova Y.A. ¹, Chmelevskaya N.V. ², Ilarionova E.A. ¹¹ Irkutsk State Medical University (664003, Irkutsk, ul. Krasnogo Vosstaniya, 1, Russian Federation)² Irkutsk Regional Agency of Forensic Medical Examination
(664082, Irkutsk, ul. 1-ya Krasnokazachya, 131, Russian Federation)

HIV infection poses a threat to the existence of humankind as a whole. Currently, lamivudine is widely used in antiretroviral therapy regimens. Modern methods of assessing quality, both in substance and in tablets, are characterized by a number of shortcomings: high cost of equipment, expensive GSO production of the United States. The development of new methods for the analysis of lamivudine, as well as the improvement of existing methods, is an urgent problem. The purpose of this study is to develop a new technique for the quantitative determination of lamivudine by UV spectrophotometric method using a standard sample.

The absorption spectrum of lamivudine solutions was studied at different pH values (1.1–14.1) in the wavelength range 200–400 nm. The optimal solvent for the spectrophotometric determination of the test substance was 0.1M HCl (pH 1.1). At pH 1.1, two absorption bands with absorption maxima at wavelengths of 212 ± 1 nm and 279 ± 1 nm are observed in the absorption spectrum of the lamivudine solution.

A substance of organic nature, 4,4'-dihydroxyphthalophenone, was chosen as the standard sample for the determination of lamivudine. The maximum absorption of lamivudine (279 nm) is included in the optimal range for 4,4'-dihydroxyphthalophenone (268–282 nm). The conversion ratio of lamivudine for 4,4'-dihydroxyphthalophenone is 0.1985. The error in determining lamivudine in the substance does not exceed 0.85 %, in tablets – 1.6 %.

The validation assessment confirmed the compliance of the developed methodology with normative documents and its suitability for analysis.

Key words: lamivudine, spectrophotometric determination, optical reference sample, conversion factor, phenolphthalein

ВВЕДЕНИЕ

ВИЧ-инфекция представляет угрозу для личной, общественной и государственной безопасности, а также для существования человечества в целом. Антиретровирусные препараты направлены на замедление репродукции вируса, на уменьшение его количества в организме. В настоящее время в схемах антиретровирусной терапии широко применяется ламивудин

[3, 5, 6]. Современные методы оценки качества, как в субстанции, так и в таблетках, характеризуются рядом недостатков: высокая стоимость оборудования, дорогостоящие государственные стандартные образцы производства США [7]. Разработка новых методик анализа ламивудина, а также совершенствование существующих методов является актуальной проблемой. Использование усовершенствованного варианта

УФ-спектрофотометрического определения с использованием оптических образцов сравнения позволит выполнять количественное определение препарата в субстанции и лекарственных формах одним и тем же методом; это повысит воспроизводимость результатов определения, а также уменьшит трудоёмкость, стоимость, и погрешность анализа [2, 4].

Целью настоящего исследования является разработка новой методики количественного определения ламивудина УФ-спектрофотометрическим методом с использованием оптического образца сравнения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали фармацевтическую субстанцию и таблетки ламивудина по 0,15 г, отвечающие требованиям нормативного документа (ФСП 000468-291212), 4,4'-диоксифталофенон квалификации «х.ч.», 0,1 М раствор натрия гидроксида (NaOH), приготовленный из фиксанала, 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной (HCl), приготовленный из фиксанала, воду очищенную. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-2000 в кюветах 1 см на фоне растворителя. Величину pH контролировали с помощью универсального ионометра ИТ-1101.

При статистической обработке результатов анализа использовали методы Стьюдента и Фишера [1] Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез $p = 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр поглощения растворов ламивудина изучали при различных значениях pH (1.1–14.1) в диапазоне длин волн 200–400 нм (рис. 1).

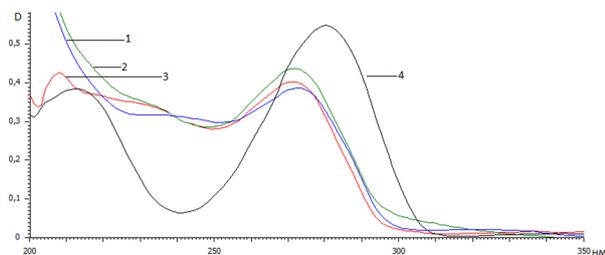


Рис. 1. УФ-спектры поглощения 0,001%-го раствора ламивудина при различных значениях pH: 1 – pH 14.1; 2 – pH 4.96; 3 – pH 3.8; 4 – pH 1.1.

При детальном рассмотрении рисунка 1 видно, что при pH 1.1 в спектре поглощения раствора ламивудина наблюдается две полосы поглощения с максимумами поглощения при длинах волн 212 ± 1 нм и 279 ± 1 нм. При переходе к pH 3.8–14.1 в спектрах поглощения ламивудина происходит гипсохромный сдвиг максимумов поглощения. При pH 3.8 спектр ламивудина характеризуется наличием трёх максимумов поглощения при длинах волн 202 ± 1 , 237 ± 1 и 272 нм, а при pH 4.7 наблюдается два максимума поглощения, которым соответствуют длины волн 232 нм и 271 нм. При pH 14.1 спектр поглощения ламивудина имеет две полосы поглощения при длинах волн 206 ± 1 и 271 ± 1 нм. Изменения в спектрах поглощения ламивудина при различных значениях pH объясняются образованием

ионизированных и неионизированных форм ламивудина, которые имеют различное электронное строение.

Ламивудин хорошо растворяется в 0,1 М HCl, а также установлено, что раствор ламивудина при pH 1.1 отличается наибольшей устойчивостью. В связи с этим, оптимальным растворителем для спектрофотометрического определения исследуемого вещества нами был выбран 0,1 М раствор HCl (pH 1.1).

В качестве стандартного образца для определения ламивудина выбрали вещество органической природы – 4,4'-диоксифталофенон. 4,4'-диоксифталофенон выпускают серийно промышленностью квалификации «х.ч.», на него имеется ГОСТ (5850-72) регламентирующий его качество, данное вещество доступно для аналитических лабораторий, имеет низкую стоимость, содержание в нём основного вещества определено химическим методом и составляет не менее 99,9 %.

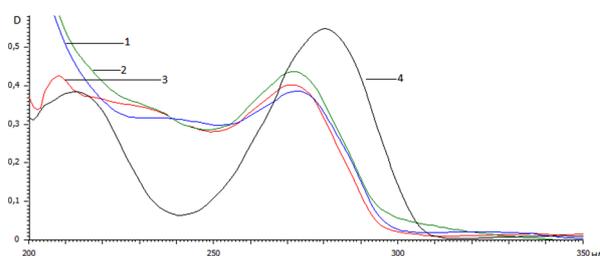


Рис. 2. Спектры поглощения 4,4'-диоксифталофенона и ламивудина в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты. 1 – 4,4'-диоксифталофенон, 2 – ламивудин.

Максимум поглощения ламивудина (279 нм) входит в интервал, оптимальный для 4,4'-диоксифталофенона (268–282 нм) (рис. 2), следовательно, 4,4'-диоксифталофенон может быть предложен в качестве стандартного образца сравнения для УФ-спектрофотометрического определения ламивудина. Также нужно отметить, что у 4,4'-диоксифталофенона и ламивудина практически совпадают максимумы поглощения. Таким образом, можно предположить, что погрешность анализа ламивудина при отмеченных выше оптимальных условиях не будет превышать допустимую. Однако в формулу расчета результатов нужно ввести коэффициент пересчёта, который позволит учесть природу вещества и различия в значениях удельных показателей поглощения ламивудина и 4,4'-диоксифталофенона. Коэффициент пересчёта – это отношение удельного показателя поглощения стандартного образца и удельного показателя поглощения лекарственного вещества [4]. Результаты определения коэффициента пересчёта приведены в таблице 1.

Таблица 1
Результаты определения коэффициента пересчёта ламивудина по 4,4'-диоксифталофенону

Метрологические характеристики (n = 10, P = 95 %)						
K	S ²	S	S _{x̄}	ΔX	E %	S _r
0,1985	0,000017	0,0041	0,0013	0,003	1,5	0,0067

Предложенные новые условия УФ-спектрофотометрического определения ламивудина были использованы для количественного определения субстанции и таблеток данного препарата. Резуль-

таты количественного определения ламивудина в субстанции и таблетках приведены в таблице 2.

Таблица 2
Результаты спектрофотометрического определения ламивудина

Метрологические характеристики (n = 10, P = 95 %)						
\bar{X}	S ²	S	S \bar{x}	ΔX	E %	S _r
Субстанция ламивудина						
99,70	1,4119	1,1882	0,3758	0,849	0,85	0,012
Таблетки ламивудина по 0,15 г						
0,148	0,00000424	0,0021	0,00065	0,00145	0,99	0,014
0,148	0,000012	0,0035	0,001	0,00236	1,6	0,024

Из таблицы 2 видно, что УФ-спектрофотометрическое определение ламивудина в субстанции и таблетках по стандартному образцу 4,4'-диоксифталофенону соответствует нормативным требованиям. Относительная ошибка определения не превышает 0,85 % для субстанции и 1,6 % – для таблеток. Методика УФ-спектрофотометрического определения с использованием стандартного образца отличается хорошей воспроизводимостью (S_r не превышает 0,024).

Валидационную оценку разработанной методики УФ-спектрофотометрического определения ламивудина с использованием стандартного образца 4,4'-диоксифталофенона проводили по критериям: специфичность, правильность, прецизионность, линейность результатов, аналитическая область методики. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3
Результаты валидационной оценки методики спектрофотометрического определения ламивудина

Параметры	Критерии валидности	Результаты испытания
Специфичность		Специфична
Сходимость	RSD < 2 % t _{табл} ≥ t _{выч}	RSD = 1,2 % t _{выч} = 0,78 (t _{табл} = 2,26), n = 10
Воспроизводимость	RSD < 3 % t _{табл} ≥ t _{выч}	RSD = 2,4 % t _{выч} = 0,93 (t _{табл} = 2,36) n = 9
Линейность результатов	r ≥ 0,999	r = 0,9994; y = 1,854·x – 0,0076
Аналитическая область методики	интервал концентраций	0,0025–0,018 мг/мл

Сведения об авторах
Information about the authors

Гончикова Юлия Анатольевна – аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; тел. (3952) 24-34-47; e-mail: Gonchikova1984@mail.ru)

Gonchikova Yulia Anatolyevna – Postgraduate at the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of Irkutsk State Medical University (664003, Irkutsk, ul. Krasnogo Vosstaniya, 1; tel. (3952) 24-34-47; e-mail: Gonchikova1984@mail.ru)

Чмелевская Наталья Владимировна – кандидат фармацевтических наук, заведующая судебно-химическим отделением ГБУЗ Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы (664081, г. Иркутск, ул. 1-я Красноказахья, 131; тел. (3952) 22-93-90)

Chmelevskaya Natalia Vladimirovna – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Head of the Forensic Chemistry Department of Irkutsk Regional Agency of Forensic Medical Examination (664081, Irkutsk, ul. 1-ya Krasnokazachya, 131; tel. (3952) 22-93-90)

Илларионова Елена Анатольевна – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, Иркутский государственный медицинский университет (e-mail: lilelena24@rambler.ru)

Illarionova Elena Anatolyevna – Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of Irkutsk State Medical University (e-mail: lilelena24@rambler.ru)

Полученные результаты (табл. 3), подтверждают соответствие разработанной методики нормативным документам и её пригодность для анализа.

ВЫВОД

Данная методика УФ-спектрофотометрического определения ламивудина по стандартному образцу 4,4'-диоксифталофенону отличается высокой воспроизводимостью, экспрессностью, отсутствием токсичных реактивов.

ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES

1. Государственная Фармакопея; 13-е изд. – 2015. – Т. 1. – 1470 с.

State Pharmacopoeia. (2015) [*Gosudarstvennaja Farmakopeya*]. Moskva, (1), 1470 p.

2. Илларионов А.И., Илларионова Е.А., Сыроватский И.П. Оптические образцы сравнения в спектрофотометрическом анализе органических соединений. Иркутск, 2008. – 151 с.

Illarionov AI, Illarionova EA, Syrovatsky IP. (2008). Optical comparison samples in spectrophotometric analysis of organic compounds [*Opticheskie obratzsy sravneniya v spektrofotometricheskom analize organicheskikh soedineniy*]. Irkutsk, 151 p.

3. Регистр лекарственных средств России; 19-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: РЛС-МЕДИА, 2010. – 1368 с.

Register of medicines of Russia. (2010). [*Registr lekarstvennyh sredstv Rossii*]. Moskva, 1368 p.

4. Теплых А.Н., Илларионова Е.А. Количественное определение метронидазола спектрофотометрическим методом // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2009. – Т. 88, № 5. – С. 48–50.

Teplykh AN, Illarionova EA. (2009). Quantitative determination of metronidazole by spectrophotometric method [Kolichestvennoe opredelenie metronidazola spektrofotometricheskim metodom]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*, 11 (5), 48-50.

5. Arts EJ, Hazuda DJ. (2012). HIV-1 antiretroviral drug therapy. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2(4), 161.

6. De Clercq E. (2009). Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 33 (4), 307-320.

7. Shalini S, Shanooja VP, Jameel SA, Harilal KK, Rajak H, Ravichandran V. (2009). Application of UV-spectrophotometric methods for estimation of lamivudine in tablets. *Digest J. Nanomater. Biostructur. (DJNB)*, 4(2), 357-360.