

Н. Д. Бунятян<sup>1, 3</sup>, Н. А. Оборотова<sup>1, 2</sup>, Л. Л. Николаева<sup>1, 2</sup>,  
Е. В. Игнатьева<sup>2</sup>, И. В. Ярцева<sup>2</sup>, А. В. Ланцова<sup>2</sup>, А. Б. Прокофьев<sup>1, 3</sup>

## ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРМУСТИНА В ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Россия, 119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2; e-mail: ndbun@mail.ru

<sup>2</sup> ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина” Минздрава РФ, Россия, 115478, Москва, Каширское ш., 24.

<sup>3</sup> ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Минздрава РФ, Россия, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.

Для липосомальной лекарственной формы ормустина, обладающей противоопухолевой активностью, подобрана методика количественного анализа действующего вещества. С целью обеспечения достоверности и точности результатов проведена валидация данной методики спектрофотометрического анализа ормустина по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, сходимость и промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность. Показано, что полученные статистические характеристики удовлетворяют критериям приемлемости валидационных параметров, представленным в отечественной нормативной документации. Определение ормустина проводили при  $(396 \pm 2)$  нм, так как вблизи данной области спектра не поглощают вспомогательные компоненты лекарственной формы. Коэффициент корреляции при определении линейности составил более 0,997, при оценке правильности относительная погрешность среднего результата не превышает 1 %, а доверительный интервал включает 100 %, коэффициент вариации при определении сходимости и промежуточной прецизионности составил меньше 1 %. Установлено, что изученная методика может применяться в диапазоне 80 – 120 % от номинального значения содержания ормустина в липосомальной лекарственной форме.

**Ключевые слова:** ормустин; липосомальная лекарственная форма; спектрофотометрия; валидация.

Зарубежные препараты класса нитрозомочевины: Кармустин (ООО “Бристол-Майерс Сквибб”, Франция, США), Ломустин (ООО “Бристол-Майерс Сквибб” С.р.л., Италия; Медак Гмбх, Германия), Мюстофоран (Лаборатория Сервьё, Франция) нашли широкое применение в комбинированной терапии солидных опухолей и гемобластозов [1], некоторые из них входят в Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. В 2013 г. затраты на противоопухолевые препараты в России составили более 40 млрд. руб. [2] По данным EvaluatePharma, более 75 % рынка онкологических препаратов приходится на топ-10 мировых фармпроизводителей [3], поэтому для снижения затрат на здравоохранение в России постоянно ведется поиск новых активных соединений и их внедрение в клиническую практику.

Разработка инновационных оригинальных лекарственных средств, а также препаратов-аналогов, находящихся под патентной защитой, в сфере фармацевтической промышленности является одним из основных реализуемых мероприятий в рамках ФЦП “Развитие фармацевтической и медицинской промышленности на период до 2020 года и дальнейшую перспективу” (“ФАРМА-2020”).

Таким соединением является ормустин, оригинальная российская субстанция из класса нитрозомочевин, синтезированная в ИОС УрО РАН в виде смеси 2 изо-

меров по положению нитрозогруппы (рис. 1). На основе данного соединения в рамках программы “ФАРМА-2020” была разработана инъекционная лекарственная форма. Доклиническое изучение инъекционной формы ормустина [4] показало её эффективность при терапии лейкозов и солидных опухолей, при лечении меланомы В16, доказано, что по своей активности она не уступает мюстофорану [5]. Как и все препараты данного класса, ормустин быстро гидролизует-ся в организме и обладает низкой селективностью. Для увеличения специфической активности, пролонгирования противоопухолевого действия, расширения терапевтического диапазона доз и предотвращения быстрой деградации препарата в биологических субстратах организма [6] в лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина” Минздрава России была разработана липосомальная лекарственная форма ормустина (ЛЛФорм) [7]. Разработанная лекарственная форма может служить в качестве замены зарубежных препаратов класса нитрозомочевин для существующих режимов химиотерапии, в том числе при развитии резистентности к другим препаратам класса нитрозомочевин. С целью стандартизации ЛЛФорм по количественному содержанию ормустина предложена методика спектрофотометрического определения в видимой области спектра.

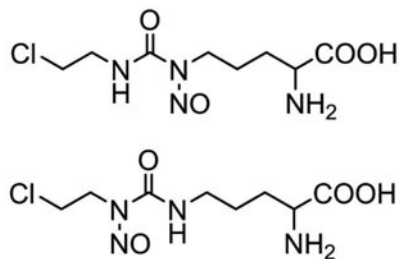


Рис. 1. Структурная формула ормустина.

Установление соответствия качества лекарственного препарата регламентируемым нормам предполагает применение различных аналитических методик. При разработке новых методик для получения достоверных и точных результатов необходимо своевременно выявить их недостатки с помощью валидации [8 – 10].

Данное исследование посвящено валидации спектрофотометрической методики количественного определения ормустина в составе ЛЛФорм.

### Экспериментальная часть

Для исследования использовали следующие материалы и оборудование: субстанция ормустина (ИОС УрО РАН, Россия); ЛЛФорм (ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина” Минздрава России, Россия); яичный лецитин (Lipoid, Германия), холестерин (SIGMA, Германия), PEG-2000 DSPE (Lipoid, Германия); спирт этиловый 95 % (ЗАО “Брынцалов-А” Ферейн, Россия); спектрофотометр Cary 100 (Agilent Technologies, США).

### Методика количественного определения

**Разведение свежеприготовленной липосомальной дисперсии:** мерной пипеткой переносят 2 мл дисперсии в мерную колбу на 25 мл, доводят объем колбы 95 % спиртом и перемешивают.

**Разведение лиофилизированной ЛЛФорм:** содержимое флакона растворяют в 2 мл воды для инъекции и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем колбы до метки 95 % спиртом и перемешивают.

Таблица 1  
Результаты определения линейности методики количественного определения ормустина

Концентрация ормустина		Среднее значение оптической плотности, нм	Регрессия
%	мг/мл		
80	8,0	0,200	0,200
90	9,0	0,228	0,228
100	10,0	0,250	0,250
110	11,0	0,270	0,275
120	12,0	0,302	0,299
Статистические характеристики			
Наклон прямой		0,0246	
Отрезок на оси ординат		0,004	
Коэффициент корреляции (R)		0,99706	

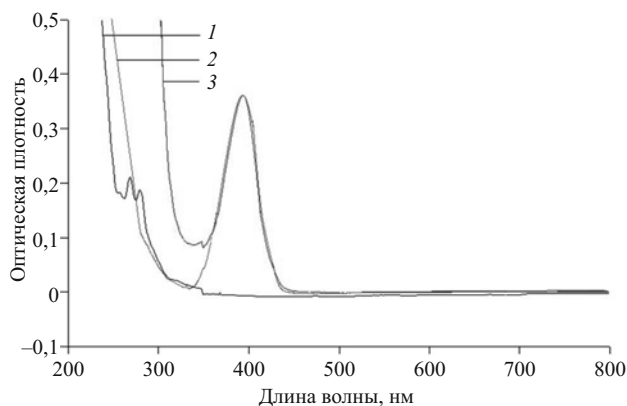


Рис. 2. Спектры поглощения “пустых” липосом (1), субстанции ормустина (2) и ЛЛФорм (3).

**Раствор стандартного образца:** около 25 мг (точная навеска) субстанции ормустина растворяют в воде для инъекций, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем колбы 95 % спиртом до метки, перемешивают.

Измерение оптической плотности приготовленных растворов проводят на спектрофотометре при длине волны  $(396 \pm 2)$  нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения 95 % спирт.

Содержание ормустина  $X$  (мг) во флаконе вычисляют по формуле:

$$X = (D_1 \cdot V_1 \cdot a_0) / (D_0 \cdot V_0),$$

где  $D_1$  — оптическая плотность испытуемого раствора;  $D_0$  — оптическая плотность раствора стандартного образца;  $V_1$  — величина разбавления испытуемого раствора;  $V_0$  — величина разбавления раствора стандартного образца;  $a_0$  — навеска стандартного образца, в миллиграммах.

Статистическую обработку проводили с использованием программ Excel, Origin 6.1 и согласно [11].

Таблица 2  
Результаты определения правильности методики количественного определения ормустина

Концентрация, %	№ пробы	Масса ормустина, мг		Отклик, %		
		навеска	найденное значение			
80	1	80,3	80,4	100,12		
	2	81,0	80,8	99,75		
	3	80,4	80,6	100,25		
100	1	100,7	100,3	99,6		
	2	100,7	100,6	99,9		
	3	100,1	99,9	99,8		
120	1	121,0	121,4	100,33		
	2	120,2	120,0	99,83		
	3	120,7	120,6	99,92		
Статистические характеристики						
$\bar{x}$	$S$	$S^2$	$S_{\bar{x}}, \%$	$\Delta \bar{x}$	$\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	$\varepsilon, \%$
99,94	0,241	0,058	0,241	0,19	99,94 $\pm$ 0,19	0,19

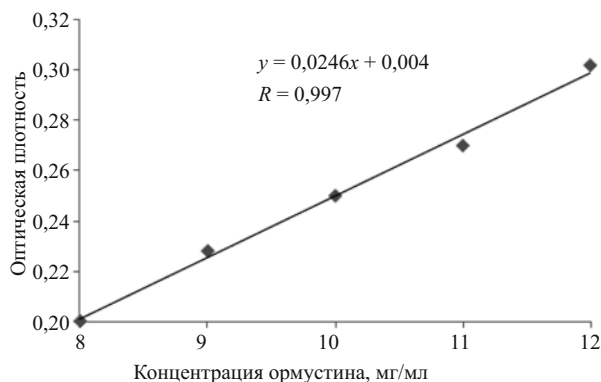


Рис. 3. Регрессивная прямая.

Для валидационной оценки методики использовали следующие критерии: при определении специфичности вспомогательные вещества не должны влиять на результаты анализа; при определении линейности коэффициент корреляции должен быть не ниже 0,995; при оценке правильности доверительный интервал должен включать 100 %; для доказательства прецизионности коэффициент вариации не должен превышать 1,5 %.

#### Результаты и их обсуждение

Субстанция ормустина имеет характерные электронные спектры поглощения: в области 200 – 800 нм наблюдаются максимумы поглощения при  $(228 \pm 2)$  нм и при  $(396 \pm 2)$  нм. Обе эти полосы можно использовать для количественного определения ормустина, но использование коротковолновой полосы сопряжено с большой возможностью случайных и систематических ошибок. Многие органические соединения и липидные компоненты ЛЛФорм поглощают в диапазоне 200 – 300 нм, поэтому определение содержания ормустина в составе ЛЛФорм проводили при  $(396 \pm 2)$  нм.

Согласно рекомендациям ИСН и [12], методика количественного определения ормустина в ЛЛФорм должна быть валидирована по 4 характеристикам: спе-

цифичность, линейность, правильность и прецизионность.

**Специфичность.** Для подтверждения специфичности аналитической методики сравнивали спектр вспомогательных веществ (“пустых” липосом), спектр стандартного раствора субстанции ормустина и спектр ЛЛФорм (рис. 2).

Как видно на рис. 2, кривая ЛЛФорм и кривая субстанции схожи, а вспомогательных компонентов (“пустые” липосомы) в области максимума  $(396 \pm 2)$  нм не поглощают. Так как липидные компоненты липосом не поглощают вблизи выбранного спектра ормустина в качестве раствора сравнения можно использовать 95 % этиловый спирт, в котором умеренно растворяются все составляющие липосом.

**Линейность** методики количественного определения ормустина доказывали в диапазоне концентрации действующего вещества в ЛЛФорм от 80 % (8 мг/мл) до 120 % (12 мг/мл) (табл. 1). Для этого изготавливали модельные разведения, представляющие собой смесь вспомогательных веществ с точными навесками субстанции ормустина.

Уравнение регрессии для данной зависимости имеет вид:  $y = 0,0246x + 0,004$ . О достаточно тесной линейной связи между концентрацией ормустина и оптической плотностью говорит близость коэффициента корреляции к 1 (по абсолютной величине). Дополнительным подтверждением линейности зависимости исследуемых величин является графическое изображение регрессионной прямой (рис. 3).

**Правильность** методики характеризует близость результатов анализов, полученных данным методом к истинному значению [10]. Для установления правильности аналитической методики определяли ошибку фактора отклика методом плацебо. Изготавливали спиртовые разведения моделей вспомогательных веществ с добавлением навески ормустина, соответствующей 80, 100 и 120 % концентрации действующего вещества. Для каждой концентрации проводили 3 определения. Оценивали результаты анализа сравнением полученного результата с ожидаемым значением величины.

На основании результатов, приведенных в табл. 2, спектрофотометрическую методику определения содержания ормустина в ЛЛФорм можно считать правильной, так как получаемые результаты близки к истинному значению и относительная погрешность среднего результата не превышает 1 %, а доверительный интервал включает 100 %.

**Прецизионность** методики характеризуется рассеянием результатов, полученных с её использованием, относительно значения среднего результата.

Для изучения сходимости сравнивали результаты, полученные в одинаковых условиях, а именно с использованием одного и того же спектрофотометра, одним и тем же исследователем, в короткий промежуток времени. Оценивая внутрिलाбораторную прецизионность методики позднее проводили такой же эксперимент с участием второго сотрудника (табл. 3).

Таблица 3

Результаты определения сходимости и промежуточной прецизионности ормустина

Серия	№ образца	Ормусти́н, мг/флакон	
		исследователь 1	исследователь 2
021114	1	18,06	18,14
	2	18,14	18,14
	3	17,98	18,06
	4	18,14	17,98
	5	18,06	18,14
	6	18,06	18,06
	7	17,98	18,06

Статистические характеристики

№	$\bar{x}$	S	S <sup>2</sup>	S <sub>x̄</sub> , %	Δx̄	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	ε, %	F <sub>практ.</sub>	t <sub>практ.</sub>
1	18,06	0,0653	0,0043	0,3617	0,15	18,06 ± 0,15	0,33	1,2	0,6
2	18,08	0,0605	0,0037	0,3344	0,14	18,08 ± 0,14	0,31		

Коэффициент вариации при определении сходимости и промежуточной прецизионности составил меньше 1 %, что свидетельствует о незначительном изменении вариационного ряда. При сравнении результатов определения содержания ормустина, полученных 2 исследователями, видно, что различия между средними значениями и стандартными отклонения результатов 1 и 2 исследователя незначительны ( $F(5 \%, 6; 6) = 4,28 > F_{\text{практ.}} = 1,2$ ) и носят случайный характер. Результаты теста Стьюдента для сравнения 2 независимых выборок ( $t(95 \%; 12) = 2,179 > t_{\text{практ.}} = 0,6$ ) указывают на отсутствие систематических ошибок в методике.

В соответствии с требованиями государственной фармакопеи проведена валидация методики количественного спектрофотометрического определения ормустина в ЛЛФорм. По результатам внутрилабораторного эксперимента установлено, что метрологические характеристики таких валидационных параметров методики, как специфичность, правильность, линейность и прецизионность, соответствуют валидационным критериям. Полученные данные показали, что методика спектрофотометрического определения пригодна для анализа содержания ормустина в ЛЛФорм.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Ланцова, Е. В. Санарова, Н. А. Оборотова, *Биофарм. ж.*, **6**(5), 38 – 51 (2014).
2. *Рынок онкологических препаратов: точки роста и перспективы развития*. <http://clinvest.ru/news/item/rynok-onkologicheskikh-preparatov-tochki-rosta-i-perspektivy-razvitiya>.
3. IMS Institute, *Innovation in cancer care and implications for health systems. Global oncology trend report* (2014).
4. Патент РФ 256729, *Бюл. изобрет.*, № 33 (2015).
5. Н. С. Сапрыкина, Л. М. Борисова, М. П. Киселева и др., *Рос. биотер. ж.*, **16**(4), 55 – 60 (2017).
6. А. В. Ланцова, А. П. Полозкова, Н. М. Перетолчина и др., *Рос. биотер. ж.*, **3**(4), 19 – 23 (2004).
7. L. L. Nikolaeva, A. V. Lantsova, E. V. Sanarova, et al., *Nanotechnol. in Russia*, **11**(5 – 6), 371 – 376 (2016).
8. С. И. Гусева, М. В. Карлина, О. Н. Пожарицкая и др., *Хим.-фарм. журн.*, **44**(1), 46 – 49 (2010); *Pharm. Chem. J.*, **44**(1), 43 – 46 (2010).
9. В. В. Береговых, *Валидация аналитических методик для производства лекарств*, Литтерра, Москва (2008).
10. М. С. Гойзман, Н. Л. Шимановский, Д. Л. Шоболов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **52**(6), 53 – 60 (2018); *Pharm. Chem. J.*, **52**(6), 562 – 568 (2018).
11. ОФС. 1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента. <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0013-15-statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-eksperimenta/>
12. ОФС. 1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/>

Поступила 15.02.18

## VALIDATION OF A PROCEDURE FOR THE ASSAY OF ORMUSTINE IN A LIPOSOMAL DRUG DOSAGE FORM

N. D. Bunyatyan<sup>1</sup>, N. A. Oborotova<sup>1,2</sup>, L. L. Nikolaeva<sup>1,2</sup>, E. V. Ignat'eva<sup>2</sup>, I. V. Yartseva<sup>2</sup>, A. V. Lantsova<sup>2</sup>, and A. B. Prokof'ev<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation (N.N. Blokhin NMRCO), Moscow, 115478 Russia

<sup>3</sup> Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow 127051 Russia

A procedure was developed for the spectrophotometric assay of the active ingredient in a liposomal formulation of ormustine drug having antitumor activity. A validation procedure was carried out to provide valid and accurate assay of ormustine in liposomal dosage form according to the following parameters: specificity, linearity, accuracy, and precision. The obtained statistical characteristics satisfied the criteria for validation parameters adopted in Russian pharmacopoeial normative documentation. The determination of ormustine was carried out at  $396 \pm 2$  nm wavelength, since the auxiliary components of the dosage form do not absorb near this spectral region. The correlation coefficient for determining the linearity was greater than 0,997; in estimating the correctness, the relative error of the average result did not exceed 1 % and the confidence interval includes 100 %; in determining the convergence and intermediate precision, the coefficient of variation was less than 1 %. It is established that the proposed procedure can be used in a range of 80 – 120 % of nominal ormustine concentration of in the liposomal drug dosage form.

**Keywords:** ormustine; liposomal drug dosage form; spectrophotometry; validation.