

Валидация ВЭЖХ методики количественного определения лекарственного препарата «Риномакс».

Миркасимова Г.А., Мавлянова М.Б.

Ташкентский фармацевтический институт, г. Ташкент,
Узбекистан

Аналитические методы, используемые при оценке чистоты оборудования должны быть специфичными для обнаружения остатков после технологического процесса и валидированы перед проведением стадии очистки. Должны быть определены специфичность, чувствительность, предел обнаружения и линейность. В связи с этим в виду того, что нам необходимо было проведение очистки оборудования лекарственного препарата «Риномакс» нами была провалидирована ВЭЖХ методика, которая применяется в контроле качества готового продукта. Для этого были исследованы такие параметры как специфичность, правильность, линейность, сходимость и диапазон применения.

Материалы и методы: Методика определения специфичности. Около 307,5 мг (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл подвижной фазы и обрабатывают с помощью ультразвука в течение 10 мин, доводят объем раствора подвижной фазы до метки и перемешивают и фильтруют (испытуемый раствор 1 для определения кофеина, фенилэфрина гидрохлорида, хлорфенирамина малеата). 5 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают (испытуемый раствор 2 для определения парацетамола). Вводят трижды по 20 мкл смешанного стандартного раствора, 20 мкл стандартного раствора для определения хлорфенирамина малеата и по 20 мкл испытуемых растворов 1 и 2 в хроматограф, регистрируют хроматограммы и измеряют отклики основных пиков. Время удерживания основного пика парацетамола, кофеина, фенилэфрина гидрохлорида, хлорфенирамина малеата на хроматограмме испытуемого раствора препарата должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме стандартного раствора каждого из активных веществ. Относительная систематическая ошибка должна быть не более 2,0%. Определение подлинности выполняет один химик, согласно прилагаемой методике. Допускается совмещать определение подлинности методом ВЭЖХ с количественным определением. Для раствора испытуемого образца (ИО) парацетамола, кофеина, фенилэфрина гидрохлорида, хлорфенирамина малеата и раствора стандартного образца (СО) записывают по три хроматограммы, определяют времена удерживания основного пика парацетамола, кофеина, фенилэфрина гидрохлорида, хлорфенирамина малеата. Для раствора ИО парацетамола, кофеина, фенилэфрина гидрохлорида, хлорфенирамина малеата и для раствора СО вычисляют

среднее значение времени удерживания, соответственно $t_{cp\ ИО}$ и $t_{cp\ СО}$, мин, и относительную систематическую ошибку (δ , %) действительного значения (модельного препарата) от истинного значения (стандартного образца) рассчитывают по формуле:

$$\delta = \frac{t_{cp\ СО} - t_{cp\ ИО}}{t_{cp\ СО}} \cdot 100\% , (1)$$

Методика определения правильности. Испытание правильности методики будет определяться на модельных растворах, которые будут приготовлены следующим образом. Модельный раствор №1 с содержанием парацетамола 0,4 мг/мл, кофеина 0,24 мг/мл, фенилэфрина гидрохлорида 0,08 мг/мл, хлорфенирамина малеата 0,016 мг/мл (80% высвобождения) ЛП «Риномакс». Около 246,0 мг (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл подвижной фазы и обрабатывают с помощью ультразвука в течение 10 мин, доводят объем раствора подвижной фазы до метки и перемешивают и фильтруют. 5 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают. Модельный раствор №2 с содержанием парацетамола 0,45 мг/мл, кофеина 0,27 мг/мл, фенилэфрина гидрохлорида 0,09 мг/мл, хлорфенирамина малеата 0,018 мг/мл (90% высвобождения) ЛП «Риномакс». Около 276,7 мг (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл подвижной фазы и обрабатывают с помощью ультразвука в течение 10 мин, доводят объем раствора подвижной фазы до метки и перемешивают и фильтруют. 5 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают. Модельный раствор №3 (исходный раствор, показанный в п.7.4.2) с содержанием парацетамола 0,50 мг/мл, кофеина 0,30 мг/мл, фенилэфрина гидрохлорида 0,10 мг/мл, хлорфенирамина малеата 0,020 мг/мл (100% высвобождения) ЛП «Риномакс». Модельный раствор №4 с содержанием парацетамола 0,55 мг/мл, кофеина 0,33 мг/мл, фенилэфрина гидрохлорида 0,11 мг/мл, хлорфенирамина малеата 0,022 мг/мл (110% высвобождения) ЛП «Риномакс». Около 338,2 мг (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл подвижной фазы и обрабатывают с помощью ультразвука в течение 10 мин, доводят объем раствора подвижной фазы до метки и перемешивают и фильтруют. 5 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают. Модельный раствор №5 с содержанием парацетамола 0,60 мг/мл, кофеина 0,36 мг/мл, фенилэфрина гидрохлорида 0,12 мг/мл, хлорфенирамина малеата 0,024 мг/мл (120%

высвобождения) ЛП «Риномакс». Около 369,0 мг (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл подвижной фазы и обрабатывают с помощью ультразвука в течение 10 мин, доводят объем раствора подвижной фазы до метки и перемешивают и фильтруют. 5 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают. Для каждой концентрации будут приготовлены по три образца в каждой из сред растворения. Будет вычислено содержание действующих веществ, приготовленных модельных растворов. Правильность методики характеризуется близостью полученных средних результатов испытаний к принятому эталонному значению определяемой величины. Среднее значение степени извлечения (recovery) должны быть от 98,0% до 102,0%.

Результаты и их обсуждения. Специфичность. Определение подлинности выполняет один химик, согласно прилагаемой методике. Допускается совмещать определение подлинности методом ВЭЖХ с количественным определением. Для раствора испытуемого образца (ИО) парацетамола, кофеина, фенилэфрина гидрохлорида, хлорфенирамина малеата и раствора стандартного образца (СО) записывают по три хроматограммы, определяют времена удерживания основного пика парацетамола, кофеина, фенилэфрина гидрохлорида, хлорфенирамина малеата. Для раствора ИО парацетамола, кофеина, фенилэфрина гидрохлорида, хлорфенирамина малеата и для раствора СО вычисляют среднее значение времени удерживания, соответственно $t_{cp\ ИО}$ и $t_{cp\ СО}$, мин, и относительную систематическую ошибку (δ , %) действительного значения (модельного препарата) от истинного значения (стандартного образца) рассчитывают по формуле:

$$\delta = \frac{t_{cp\ СО} - t_{cp\ ИО}}{t_{cp\ СО}} \cdot 100\% , (1)$$

Рисунок 1

Наименование активного вещества	Результаты определения				Отклонения, %	
	1	2	3	Среднее значени е	$t_{cp\ СО} - t_{cp\ ИО}$	$\delta, \%$
	t_1	t_2	t_3	t_{cp}		
Парацетамол СО	1,302	1,302	1,301	1,302	-	-
Парацетамол ИО	1,302	1,302	1,302	1,302	0,00	0,000
Кофеин СО	2,831	2,830	2,829	2,830	-	-
Кофеин ИО	2,828	2,828	2,826	2,827	0,003	0,106
Фенилэфрина гидрохлорид СО	0,866	0,866	0,865	0,866	-	-
Фенилэфрина гидрохлорид ИО	0,867	0,866	0,865	0,866	0,000	0,000
Хлорфенирамин малеата СО	4,388	4,388	4,386	4,387	-	-
Хлорфенирамин малеата ИО	4,381	4,379	4,378	4,379	0,008	0,182

Правильность. С помощью метода ВЭЖХ, один химик выполняет испытания согласно методике. Для модельных образцов и раствора стандартного образца (три повторения) определяет степень извлечение (Recovery) по следующей формуле (2):

$$\text{Recovery} = 100 - \frac{(m_{\text{теор}} - m_{\text{обн}})}{m_{\text{теор}}} \cdot 100\% \quad (2)$$

где: $m_{\text{теор}}$ – теоретическое количество заявленного действующего вещества;

$M_{\text{обн}}$ – обнаруженное количество действующего вещества;

Рисунок 2

Наименование действующего вещества	№ п/п	Введенное количество [мг] и [%] заявленного теоретического]		Обнаруженное количество, мг	Степень извлечения (Recovery), %
		мг	%		
Парацетамол	1	400,00	80%	398,45	99,61
	2	400,00	80%	397,38	99,35
	3	400,00	80%	397,16	99,29
	4	500,00	100%	498,12	99,62
	5	500,00	100%	501,12	100,22
	6	500,00	100%	501,39	100,28
	7	600,00	120%	601,65	100,28
	8	600,00	120%	602,12	100,35
	9	600,00	120%	604,43	100,74
Среднее значение степени извлечения [%]					99,97
95-% доверительный интервал					99,97±0,482
RSD [%]					0,482
Кофеин	1	24,00	80%	23,78	99,08
	2	24,00	80%	23,62	98,42
	3	24,00	80%	23,68	98,67
	4	30,00	100%	29,65	98,83
	5	30,00	100%	29,57	98,57
	6	30,00	100%	29,46	98,20
	7	36,00	120%	35,95	99,86
	8	36,00	120%	35,87	99,64
	9	36,00	120%	35,76	99,33
Среднее значение степени извлечения [%]					98,96
95-% доверительный интервал					98,96±0,533
RSD [%]					0,533

Рисунок 2 продолжение

Фенилэфрин гидрохлорид	1	8,00	80%	7,85	98,13
	2	8,00	80%	7,94	99,25
	3	8,00	80%	7,96	99,50
	4	10,00	100%	9,85	98,50
	5	10,00	100%	9,86	98,60
	6	10,00	100%	9,92	99,20
	7	12,00	120%	12,19	101,58
	8	12,00	120%	12,13	101,08
	9	12,00	120%	12,22	101,83
Среднее значение степени извлечение [%]					99,74
95-% доверительный интервал					99,74±1,32
RSD [%]					1,32

Хлорфенирамин малеат	1	1,600	80%	1,575	98,44
	2	1,600	80%	1,583	98,94
	3	1,600	80%	1,579	98,69
	4	2,000	100%	1,986	99,30
	5	2,000	100%	1,982	99,10
	6	2,000	100%	1,979	98,95
	7	2,400	120%	2,383	99,29
	8	2,400	120%	2,373	98,88
	9	2,400	120%	2,368	98,67
Среднее значение степени извлечение [%]					98,92
95-% доверительный интервал					98,92±0,0,270
RSD [%]					0,27

Выводы

Специфичность методики проведена по определению подлинности таблеток «Риномакс», исходного раствора (в трёх повторях), по сравнению с раствором стандартного образца парацетамола, кофеина, фенилэфрина гидрохлорида, хлорфенирамина малеата, отклонение испытуемых образцов от полученных результатов стандартного образца составило для парацетамола - 0,000%, кофеина - 0,106%, фенилэфрина гидрохлорида – 0,000%, хлорфенирамина малеата – 0,182%, что меньше 2,0% (ошибки определения).

Правильность. В диапазоне парацетамола 0,4 мг/мл (80%), 0,5 мг/мл (100%), 0,6 мг/мл (120%), кофеина 0,24 мг/мл (80%), 0,30 мг/мл (100%), 0,36 мг/мл (120%), фенилэфрина гидрохлорида 0,08 мг/мл (80%), 0,10 мг/мл (100%), 0,12 мг/мл (120%), хлорфенирамина малеата 0,016 мг/мл (80%), 0,020 мг/мл (100%), 0,024 мг/мл (120%), правильность методики определения раствора ЛП «Риномакс», таблетки, методом ВЭЖХ подтверждена

соответствующими испытаниями модельных растворов, на основании рассчитанных результатов (Recovery),%. Полученные результаты находятся в допустимых пределах 98,0-102,0%.

Литература

1. Георгиевский В.П. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств. Харьков, 2011 г.
2. Cleaning Validation Guidelines. Health Canada. HPFB Inspectorate. January, 2008.
3. Note for guidance on variation of analytical procedures: methodology (CPMP/ICH/281/095). ICH Q2A, March 1995.
4. Text on Validation of Analytical Procedure. ICH Q2B, May 1997.