

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ НІФЕДИПІНУ В ТАБЛЕТКАХ МЕТОДОМ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Метою даного дослідження була валідація методики кількісного визначення ніфедипіну в таблетках методом рідинної хроматографії. Хроматографічний аналіз ніфедипіну проводили на рідинному хроматографі Agilent 1290 Infinity II LC System. Виконано валідацію методики кількісного визначення ніфедипіну в таблетках методом високоефективної рідинної хроматографії. Встановлено, що методика відповідає вимогам Державної Фармакопеї України за основними валідаційними характеристиками, такими, як специфічність, правильність, лінійність, робастність. Отримані під час дослідження результати свідчать про те, що розроблений ВЕРХ-метод є швидким, економічним, простим, точним і підходить для визначення ніфедипіну в лікарських засобах.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ніфедипін, кількісний аналіз, валідація, хроматографія, валідаційні характеристики.

ВСТУП. Валідація аналітичних методик відіграє важливу роль у системі забезпечення якості фармацевтичної продукції та є обов'язковою вимогою належної виробничої практики (GMP) для всіх методик, які використовують для контролю за якістю лікарських засобів на всіх етапах їх виробництва. Відповідно до вимог Державної Фармакопеї України (ДФУ) [1], всі методики контролю за якістю лікарських засобів повинні бути валідованими. Мета валідації – експериментально довести, що методика придатна для виконання поставлених завдань. Окрім цього, валідація дає змогу: знизити кількість помилок у майбутньому при використанні методики, оскільки забезпечує розуміння її суті та дотримання головних параметрів; виявити й усунути недоліки методики ще на ранніх стадіях; оптимізувати та виділити робочі параметри; опрацювати або підтвердити рівняння, яке використовують для визначення результату, залучати інші лабораторії, що посилює впевненість у методиці. За останні десятиріччя розроблено спектрофотометричні методики визначення амлодипіну, ніфедипіну, верапамілу в субстанціях та лікарських формах, а також проведено валідацію та верифікацію спектрофотометричних методик згідно з вимогами ДФУ або інших

фармакопей. Поряд із тим, невивченою проблемою є розробка хроматографічних методів аналізу антигіпертензивних лікарських засобів при стандартизації даної фармакологічної групи препаратів [2].

Метою даної роботи була валідація методики кількісного визначення ніфедипіну в таблетках методом рідинної хроматографії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єкт дослідження – Фенігідин-Здоров'я, таблетки, що містять 10 мг ніфедипіну.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за таких умов:

- колонка Ascentis Express C18 розміром 4,6×150 мм, з розміром часток 5 мкм;
- рухома фаза: метанол Р – 0,1 % розчин трифтороцтової кислоти Р (55:45);
- швидкість рухомої фази: 1,5 мл/хв;
- температура колонки: 35 °С;
- детектування за довжини хвилі: 235 нм;
- об'єм проби, що вводиться: 5 мкл.

Приготування випробовуваного розчину
Випробовуваний розчин. До 200,0 мг порошку розтертих таблеток додають 10,0 мл суміші метанолу Р – води Р (50:50), витримують на УЗ-бані протягом 10 хв та доводять тим самим

розчинником до об'єму 20,0 мл. Фільтрують крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм, відкидаючи перші 5,0 мл фільтрату. 2,0 мл отриманого фільтрату доводять тим же розчинником до 20,0 мл.

Приготування розчину порівняння

Розчин порівняння. 20,0 мг (точна наважка) фармакопейного стандартного зразка (ФСЗ) ніфедипіну розчиняють у суміші метанолу Р – води Р (50:50) і доводять тим самим розчинником до об'єму 20,0 мл. 2,0 мл отриманого розчину доводять тим же розчинником до 20,0 мл.

Результати аналізу вважають вірогідними, якщо виконуються вимоги тесту "Перевірка придатності хроматографічної системи". Хроматографічну систему вважають придатною, якщо виконуються такі умови:

а) ефективність хроматографічної колонки, обчислена за піком ніфедипіну, – не менше 4000 теоретичних тарілок;

б) відносне стандартне відхилення, розраховане для площі піка ніфедипіну, – не більше 1,0 %;

в) коефіцієнт симетрії, обчислений за піком ніфедипіну, – не більше 1,5.

Відповідно до вимог ДФУ, методики кількісного визначення лікарських засобів, які включено в методики контролю за якістю, повинні бути валідованими. Валідацію методики кількісного визначення ніфедипіну в таблетках проводили за типовими характеристиками, такими, як специфічність, правильність, лінійність, робастність [3–6].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для розробки методу аналізу ми отримали і проаналізували хроматограми стандартного розчину ніфедипіну (рис. 1) і випробовуваного розчину ніфедипіну (рис. 2), а також залежність піків від часу утримання.

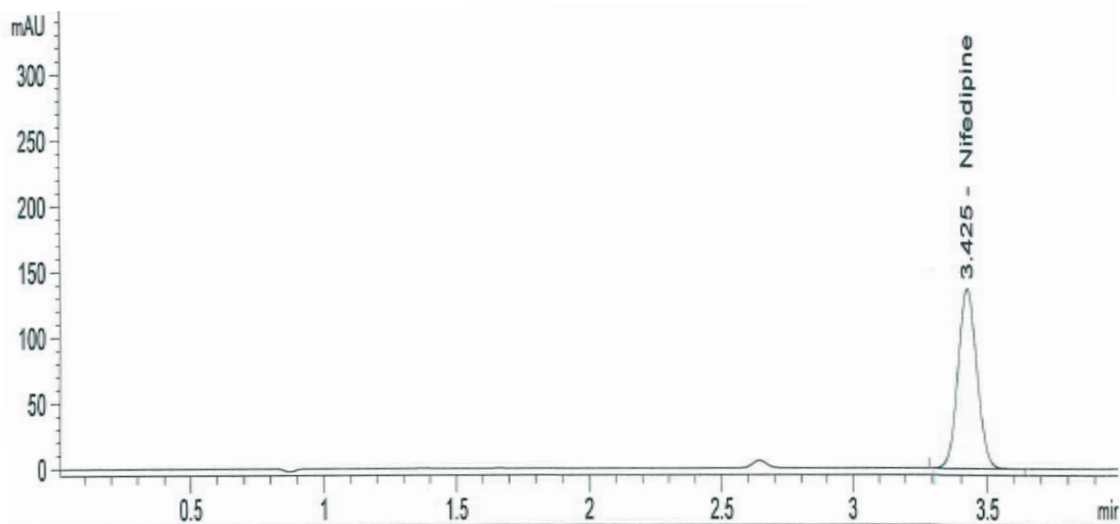


Рис. 1. ВЕРХ-хроматограми стандартного розчину ніфедипіну за умов кількісного визначення ніфедипіну в таблетках.

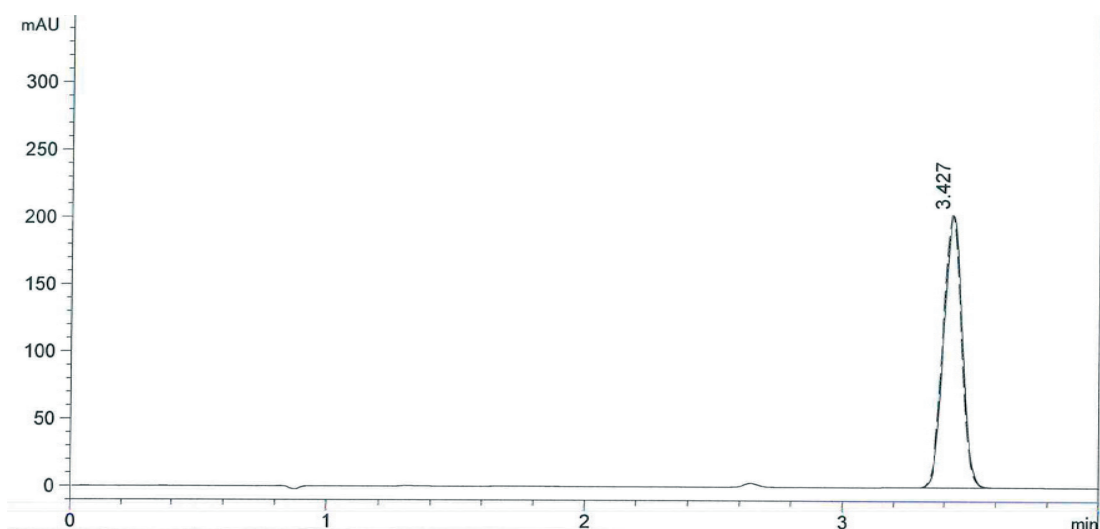


Рис. 2. ВЕРХ-хроматограми випробовуваного розчину ніфедипіну за умов кількісного визначення ніфедипіну в таблетках.

Вміст ніфедипіну (X) в одній таблетці, в міліграмах, розраховували за формулою:

$$X = \frac{S_i \cdot m_o \cdot b \cdot P}{S_o \cdot m_i \cdot 100},$$

де S_i – середнє значення площ піків ніфедипіну, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_o – середнє значення площ піків ніфедипіну, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_o – маса наважки ФСЗ ніфедипіну, мг;

m_i – маса наважки порошку розтертих таблеток, мг;

P – вміст основної речовини у ФСЗ ніфедипіну, %;

b – середня маса таблеток, мг.

Специфічність методики доводили шляхом порівняння хроматограм стандартного, досліджуваного та холостого розчинів. Час утримання ніфедипіну на хроматограмі досліджуваного розчину відповідає часу утримання відповідних піків з хроматограми розчину порівняння. На хроматограмі холостого розчину не виявлено піків, вищих за шум базової лінії, час утримання яких збігався б з часом утримання аналізованих речовин.

Для перевірки правильності та прецизійності методики готували 3 окремі суміші з точно відомим вмістом субстанції, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 80, 100, 120 від номінальної). Для кожної модельної суміші було проведено 3 паралельні аналізи. Відповідно до ДФУ, розраховували такі критерії: систематичну похибку $\delta\%$ (для правильності) та відносний довірчий інтервал ΔZ (для прецизійності). Результати дослідів та проведених розрахунків наведено в таблиці 1.

Експериментальні результати прецизійності характеризувалися припустимим розкиданням відносно середнього i , відповідно, низьким стандартним відхиленням S_z % (S_z % = 0,79 < 3,2) на всьому діапазоні концентрацій, що свідчить про якість роботи аналітика та методики, яку застосовували.

Оцінку лінійності проводили на всьому діапазоні застосування методу з використанням стандартного методу. Залежність площі піка від концентрації досліджували з використанням модельних розчинів зразків. Отримані результати було статистично оброблено методом найменших квадратів відповідно до вимог ДФУ. Для кожного з випробовуваних розчинів розраховували середнє значення площі піка. Отримані результати було оброблено за допомогою методу найменших квадратів для рівняння $y = m \cdot x + b$, та метрологічні характеристики представлено на рисунку 3.

Вимоги до параметрів лінійної залежності в нашому випадку виконуються в усьому діапазоні застосування методики (80–120 %).

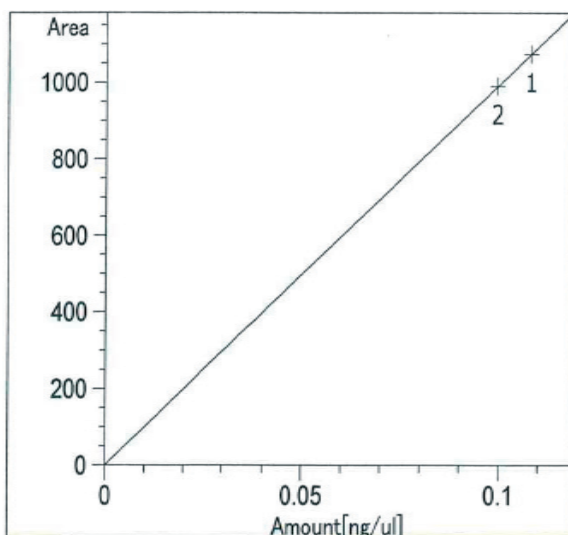
Робастність – стійкість методики до незначних змін умов експерименту – перевіряли на досліджуваному розчині. Умови хроматографування змінювались у межах ± 10 % від вказаних у методиці. Результати досліджень наведено в таблиці 2.

Найбільше на результати впливають зміни швидкості потоку рухомої фази, але вони не значні. Зміни температури колонки за умов хроматографування практично не впливають на результати аналізу.

Для підтвердження стабільності розчинів модельний розчин препарату, що відповідає номінальній концентрації, приготований при визна-

Таблиця 1 – Результати дослідження правильності та прецизійності методики кількісного визначення ніфедипіну ВЕРХ-методом

Вміст у модельній суміші, % до номінального	Знайдено вміст до номінального, %	Знайдено вміст до введеного, %
80	79,95	99,94
80	80,10	100,13
80	81,22	101,52
100	100,85	100,85
100	101,40	101,40
100	99,20	99,20
120	120,37	100,31
120	119,46	99,55
120	120,26	100,21
Середнє значення Z		100,35
Відносне стандартне відхилення S_z %		0,79
Відносний довірчий інтервал ΔZ		1,45
Критичне значення для результатів збіжності		ΔZ % $\leq 3,2$
Систематична похибка δ %		0,35
Критерій невизначеності систематичної похибки		<0,49
Загальний висновок про методику		коректна



Nifedipine at exp. RT: 3.425
 DAD1 A, Sig=230,4 Ref=off
 Correlation: 1.00000
 Residual Std. Dev.: 0.32620
 Formula: $y = mx + b$
 m: 9957.69116
 b: 1.88499e-2
 x: Amount
 y: Area

Рис. 3. Графік залежності площі піка від концентрації за умов ВЕРХ-визначення ніфедипіну в таблетках і метрологічні характеристики лінійності.

ченні лінійності, хроматографували через 24 год. Одержані результати наведено в таблиці 3.

Знайдене значення (знайдено/введено) ніфедипіну на хроматограмах модельних роз-

чинів, проаналізованих через 24 год після приготування, відрізняється від 100 % менше ніж на 1,6 %, що підтверджує робастність даної методики.

Таблиця 2 – Результати дослідження робастності методики кількісного визначення ніфедипіну ВЕРХ-методом

Умови проведення аналізу	Час утримання, хв
Стандартні умови	3,425
Швидкість потоку 1,65 мл/хв (+10 %)	3,612
Швидкість потоку 1,35 мл/хв (-10 %)	3,687
Температура колонки 38 °С	3,597
Температура колонки 31 °С	3,589

Таблиця 3 – Підтвердження стабільності модельних розчинів ніфедипіну

Випробовуваний розчин	Вміст ніфедипіну, %	Різниця вмісту ніфедипіну, %
Свіжоприготований	100,0	0,7
Через 24 год	100,7	
Вимоги: ≤1,6 %		витримуються

ВИСНОВКИ. 1. Проведено валідацію методики кількісного визначення ніфедипіну відповідно до вимог ДФУ.

2. Встановлено, що методика відповідає вимогам ДФУ за специфічністю, правильністю,

прецизійністю та робастністю в діапазоні 80–120 % від номінального вмісту.

3. Розроблений ВЕРХ-метод є простим, швидким, економічним і підходить для визначення ніфедипіну в лікарських засобах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство "Український науковий фармацевтичний центр якості лікарських засобів". – 2-ге вид. – Харків : Державне підприємство "Український науковий фармацевтичний центр якості лікарських засобів", 2014. – Т. 2. – 724 с.

2. Logoyda L. Development and validation of new methods of analysis for the determination of different natural and synthetic original active pharmaceutical ingredients in medicines / L. Logoyda // Duphat. – 2015. – 48 p.

3. Гризодуб А. И. Стандартные процедуры вали-

дации методик контроля качества лекарственных средств / А. И. Гризодуб // Фармаком. – 2006. – № 1–2. – С. 35–44.

4. Logoyda L. Validation of chromatographic methods of analysis for the determination of active pharmaceutical ingredients in different medicines / L. Logoyda // Pharma School association for pharmaceutical development and

scientific research 2016. – P. 34.

5. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and methodology.

6. ICH, Q3B validation of analytical procedures: Methodology, international conference on harmonization, Nov, 1996.

Л. С. Логойда

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИФЕДИПИНА В ТАБЛЕТКАХ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Резюме

Целью данного исследования была валидация методики количественного определения нифедипина в таблетках методом жидкостной хроматографии. Хроматографический анализ нифедипина проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity II LC System. Выполнено валидацию методики количественного определения нифедипина в таблетках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено, что методика соответствует требованиям Государственной Фармакопеи Украины по основным валидационным характеристикам, таким, как специфичность, правильность, линейность, робасность. Полученные во время исследования результаты свидетельствуют о том, что разработанный ВЭЖХ-метод является быстрым, экономичным, простым, точным и подходит для определения нифедипина в лекарственных средствах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нифедипин, количественный анализ, валидация, хроматография, валидационные характеристики.

L. S. Lohoyda

I. HORBACHEVSKY TERNOPIIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

VALIDATION OF ASSAY METHOD OF NIFEDIPINE IN TABLETS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY

Summary

The aim of this study was the validation of methods of quantitative determination of nifedipine in tablets by liquid chromatography. The chromatographic analysis was performed on nifedipine liquid chromatograph Agilent 1290 Infinity II LC System. A validation of methods of quantitative determination of nifedipine by high performance liquid chromatography tablets was performed. It was established that the method proves the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine for the main validation parameters: specificity, accuracy, linearity, robasnist. The results obtained in this study clearly indicate that the developed HPLC method is fast, economical, simple, accurate and suitable for determination of nifedipine in medicines.

KEY WORDS: nifedipine, quantitative analysis, validation, chromatography, validation parameters.

Отримано 24.10.16

Адреса для листування: Л. С. Логойда, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: logoyda@tdmu.edu.ua.