

Разработка и валидация методики количественного определения 4-аминобутановой кислоты в таблетках алендроната натрия методом мицеллярной тонкослойной хроматографии

А.Ю. Ренкевич¹, А.Ю. Куликов²

¹ Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина
пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022

² Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств,
ул. Астрономическая, 33, Харьков, Украина, 61085; kulikov@phukr.kharkov.ua

Поступила: 28 августа 2013 г. / Подписано к печати: 16 декабря 2013 г.

Разработана методика количественного определения примеси 4-аминобутановой кислоты в таблетках «Алендронат натрия» методом мицеллярной тонкослойной хроматографии. Мицеллярная подвижная фаза (0.005 моль/л водный раствор Бридж-35, доведенный до pH 2.0 HCl) позволяет отделить 4-аминобутановую кислоту как от основного действующего вещества, так и от вспомогательных веществ таблетки, и провести количественную оценку содержания примеси за 20 минут. Для разработанной методики была проведена процедура валидации: диапазон линейности составил 0.012-0.028 мг/мл; предел детектирования 0.002 мг/мл (0.1 мкг/пятно); предел количественного определения 0.006 мг/мл (0.3 мкг/пятно); относительное стандартное отклонение, полученное при исследовании точности, сходимости и воспроизводимости, не превышает 5%.

A.Yu. RENKEVICH, A.Yu. KULIKOV. DEVELOPMENT AND VALIDATION 4-AMINO BUTYRIC ACID ASSAY IN ALENDRONATE SODIUM TABLETS USING MICELLAR THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY - The assay method for the determination of 4-aminobutyric acid as impurity in Alendronate sodium tablets by using micellar thin-layer chromatography was developed. Micellar mobile phase (0.005 mol/l Brij-35 aqueous solution adjusted to pH 2.0 HCl) allow to separate 4-aminobutyric acid both active component and pharmaceutical excipients, and to assay this impurity during 20 min. For the development method the validation procedure was done: linearity was 0.012-0.028 mg/ml; limit of detection was 0.002 mg/ml (0.1 mcg/spot); limit of quantitation was 0.006 mg/ml (0.3 mcg/spot); relative standard deviations that were obtained during precision, accuracy and reproducibility investigations not exceed 5%.

Ключевые слова: 4-аминобутановая кислота, мицеллярная тонкослойная хроматография, Бридж-35, количественное определение, валидация.

Keywords: 4-aminobutyric acid, micellar thin-layer chromatography, Brij-35, assay, validation

Контроль качества готовых лекарственных средств, разработка и валидация таких методик, методик контроля качества лекарственных средств в критических точках производства – все это части системы обеспечения качества, которая должна гарантировать, что лекарственные препараты разработаны и валидированы с учетом требований надлежащей производственной практики (GMP) [1]. Методики контроля качества лекарственных средств и субстанций должны быть точными и экспрессными, и поэтому разработка экспрессных методик контроля качества особенно готовых лекарственных средств есть одно из главных направлений фармацевтического анализа. К сожалению, в фармакопее Европы [2] не описаны методики контроля качества готовых лекарственных средств, а приводятся только монографии по

контролю качества субстанций. В фармакопее Украины [3], гармонизированной в основной части с фармакопеей Европы, в последних дополнениях, в национальной части, приводятся монографии по контролю качества самых распространенных лекарственных средств, к которым, таблетки алендроната натрия не относятся.

Отечественные производители готовых лекарственных средств зачастую в их контроле используют методики, которые описаны для субстанций. Однако они не всегда являются экспрессными, и не всегда возможно методику контроля качества субстанции адекватно перенести на готовое лекарственное средство.

Алендронат натрия – натриевая соль (4-амино-1-гидроксипутилен)-дифосфоновой кислоты (рис.1); относится к группе бифосфона-

тов. Обладает способностью связывать содержащийся в костях гидроксиапатит и ингибировать активность остеокластов, способствующих резорбции костной ткани.

Применяют для лечения остеопороза [4].

Фармакопея Америки [5] для контроля качества таблеток алендроната натрия (количественное определение) использует методику ВЭЖХ, в которой количественное определение действующего вещества проводится после его дериватизации с 9-флуоренилметилхлорформиадом; при этом не контролируется содержание примесей. Фармакопея Европы для определения примесей (4-аминобутановая кислота, рис. 1) в субстанции алендроната натрия использует метод нормально-фазовой ТСХ в системе 1-бутанол:вода:уксусная кислота (6:2:2 об) и нормирует ее содержание не более 0.5%.

В предыдущей работе нами была показана возможность использования мицеллярной тон-

кослойной хроматографии для определения 4-аминобутановой кислоты как примеси в субстанции алендроната натрия [6]. Подвижная фаза на основе поверхностно-активных веществ (оптимальный состав 0.02М ЦПХ, 0.05 М Бридж-35, 5% (об) этанол, pH=2 (HCl)) позволяет отделить от алендроната натрия и количественно определить примесь 4-аминобутановой кислоты за 35 минут; определение методом ТСХ с водно-органической подвижной фазой (методика фармакопеи Европы) до 70 мин с учетом времени хроматографирования и предварительного насыщения хроматографической камеры.

Целью данной работы является разработка и валидация методики определения 4-аминобутановой кислоты в таблетках «Алендронат натрия» методом мицеллярной тонкослойной хроматографии.

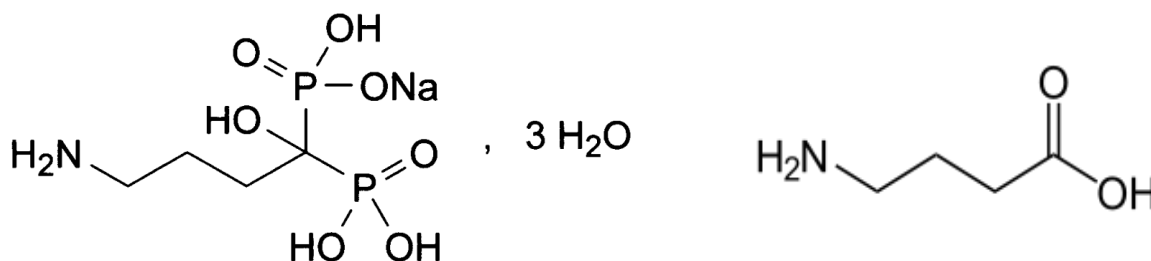


Рис. 1 Алендронат натрия и 4-аминобутановая кислота

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и растворы. В работе использовалась 4-аминобутановая кислота (Fluka, чистота 99%), алендронат натрия («Стома», Харьков, чистота 85%), неионогенное поверхностно-активное вещество Бридж-35 (Acros, чистота 99%), 1-бутанол (Ангарский завод химреактивов, ч), ледяная уксусная кислота (Макрохим, чда), этанол 96% (АЛЛХИМ, Харьков, фарм), метанол (АЛЛХИМ, Харьков, хч), 1-пропанол (АЛЛХИМ, Харьков, хч), нингидрин (Ангарский завод химреактивов, ч), лактоза («Стома», Харьков, чистота 99%), цетилпиридиния хлорид (ЦПХ, Acros, чистота 98%). Вспомогательные вещества, используемые при производстве таблеток (крахмал, стеарат магния, поливинилпирролидон, удовлетворяющие требованиям действующих фармакопей), были любезно представлены АО «Стома», Харьков.

Таблетки «Алендронат натрия» производства АО «Стома», Харьков.

Раствор нингидрина для проявления хроматограмм готовили следующим образом: 0,2 г нингидрина помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл 1-бутанола, прибавляли 10 мл ледяной уксусной кислоты, доводили объем раствора бутанолом до метки и перемешивали.

Раствор хранили в темном месте и использовали в течение 1 мес.

Оборудование. Система для полуавтоматического нанесения проб Linomat 5 (CAMAG, Швейцария) использовалась для нанесения проб (50 мкл в полосу длиной 4 мм) на хроматографическую пластинку. Нанесение проводили высушивая пробу в токе теплого воздуха.

Разделение проводили на пластинках для тонкослойной хроматографии Sorbfil-ПТСХ-АФ-А (толщина слоя 0.2 мм) размером 10x15 см на алюминиевой основе. Хроматографирование проводили в стеклянной прямоугольной камере без предварительного насыщения камеры подвижной фазой.

Дериватизацию (проявление) проводили с использованием CAMAG TLC Sprayer (CAMAG, Швейцария), который позволял получать мелкодисперсную струю реагента-проявителя.

Полученную ТСХ-хроматограмму фиксировали [6] путем сканирования с оптическим разрешением 900 dpi в True Color режиме (16.7 млн. цветов) с использованием RGB-модели цветопередачи в 96-битном режиме (32 бита на один канал) на сканере HP ScanJet 4050G Photo (сканирование проводилось в программной оболочке HP Photosmart Essential), сохраняли в виде несжатых

файлов с расширением bmp и обрабатывали с использованием программы «ТСХ менеджер 4.0.2.3D» (разработка Плахотный И.Н., www.garryc.chat.ru) и подхода, описанного в работе [7].

Приготовление растворов.

Стандартный раствор 4-аминобутановой кислоты с концентрацией 1 мг/мл готовили растворением точной навески 4-аминобутановой кислоты в 96% этаноле. Срок годности раствора при его хранении в темном прохладном месте 14 сут. Рабочие растворы 4-аминобутановой кислоты готовили разбавлением стандартного раствора 96% этанолом до получения необходимой концентрации. Растворы использовали свежеприготовленными.

Стандартный раствор алендроната натрия с концентрацией 2 мг/мл готовили растворением точной навески стандартного образца алендроната натрия в дистиллированной воде. Срок годности раствора при его хранении в темном прохладном месте 3 сут.

Стандартный раствор лактозы с концентрацией 15 мг/мл готовили растворением навески лактозы в дистиллированной воде. Срок годности раствора при его хранении в темном прохладном месте 7 сут.

Стандартный раствор крахмала с концентрацией 6 мг/мл готовили растворением навески крахмала в дистиллированной воде. Срок годности раствора при его хранении в темном прохладном месте 7 сут.

Модельную смесь препарата готовили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 20 мг стандартного образца алендроната натрия, аликвоту стандартного образца 4-аминобутановой кислоты, эквивалентную 0.2 мг 4-аминобутановой кислоты, 120 мг лактозы, 60 мг крахмала, 3 мг стеарата магния и 6 мг поливинилпирролидона, прибавляли растворитель (дистиллированная вода, 50 % этанол, 96 % этанол, метанол), перемешивали в течение 15 мин, доводили объем раствора соответствующим растворителем до метки и перемешивали. Раствор центрифугировали в течение 5 мин при скорости вращения 7000 об/мин и использовали надосадочную жидкость.

Раствор использовали свежеприготовленным.

Испытуемый раствор препарата готовили следующим образом: точную навеску порошка предварительно растертых 20 таблеток, эквивалентную 20 мг алендроната натрия, помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли растворитель (дистиллированная вода, 50 % этанол, 96 % этанол, метанол), перемешивали в течение 15 мин, доводили объем раствора растворителем до метки и перемешивали.

Раствор центрифугировали на центрифуге в течение 5 мин при скорости вращения 7000 об/мин и использовали надосадочную жидкость.

Раствор использовали свежеприготовленным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор и оптимизация состава подвижной фазы, условий хроматографирования и пробоподготовки.

Подход к разработке методик контроля качества готовых лекарственных средств, который часто применяют отечественные производители лекарств – перенос методик контроля качества субстанций на лекарственные средства – для таблеток алендроната натрия оказался неприемлемым. Причем как и в нормально-фазовой ТСХ (1-бутанол : вода : уксусная кислота (6:2:2 об)), так и в мицеллярной ТСХ с ранее предложенной подвижной фазой (0.02М ЦПХ, 0.05 М Бридж-35, 5% (об) этанол, рН=2 (НСI)).

На рис. 2 приведены хроматограммы, полученные для таблеток алендроната натрия, полученных в вышеуказанных условиях. Как можно видеть из представленных хроматограмм, примесь 4-аминобутановой кислоты плохо отделяется от алендроната натрия и форма хроматографического пятна далека от идеальной.

Было выдвинуто предположение, что на удерживание и форму хроматографического пятна в обоих случаях хроматографирования могут оказывать не столько взаимодействия между аналитом, подвижной и стационарной фазами, сколько вспомогательные компоненты, которые входят в состав таблетки. В качестве вспомогательных веществ при производстве таблеток используют лактозы моногидрат, целлюлозу мелкокристаллическую, кроскармелозу натрия, повидон (поливинилпирролидон) и стеарат магния. Целлюлоза и стеарат магния нерастворимы ни в воде, ни в спиртах, и поэтому были исключены нами из рассмотрения.

Для проверки влияния остальных вспомогательных веществ нами были приготовлены модельные смеси, содержащие алендронат натрия, 4-аминобутановую кислоту и одно из оставшихся вспомогательных веществ (лактоза, кроскармелоза, повидон). В ходе исследования было установлено, что в обоих режимах хроматографирования присутствие лактозы негативно сказывается на хроматографическое поведение алендроната натрия и 4-аминобутановой кислоты: лактоза движется по слою сорбента и препятствует высвобождению 4-аминобутановой кислоты.

Следовательно, необходимо выбрать растворитель для приготовления пробы, в котором растворимость лактозы минимальна, и скорректировать состав подвижной фазы для лучшего разделения веществ и получения приемлемой формы хроматографического пятна.

Согласно монографии «Лактозы моногидрат» фармакопеи Европы [2], лактоза практически нерастворима в 96 % этаноле и метаноле, в то время как алендронат натрия, и 4-аминобутановая кислота в этаноле достаточно хорошо растворимы. Это и определило выбор растворителя для приготовления стандартных и испытуемых растворов.

Кроме того, использование спиртов ускоряет процесс нанесения веществ на пластинку (быстро испаряется в токе воздуха), и пятна в точке нанесения получают компактными.

В дальнейшем при хроматографировании это уменьшает размывание хроматографических зон.

Таблица 1. Состав некоторых подвижных фаз, время хроматографирования и форма полученного хроматографического пятна

Состав подвижной фазы	R_f 4-аминобутановой кислоты	Время хроматографирования, мин	Форма хроматографических пятен
0.02М ЦПХ, 0.05М Бридж-35, 5% (об) этанол, pH 2.0 (HCl) [6]	0.84	30	Правильная; (алендронат натрия имеет размытую хроматографическую зону)
0.05М Бридж-35, 5% (об) этанол, pH 2.0 (HCl)	0.80	30	Правильная
0.02М Бридж-35, pH 2.0 (HCl)	0.75	20	Правильная
0.007М Бридж-35, pH 2.0 (HCl)	0.82	25	Правильная
0.005М Бридж-35, pH 2.0 (HCl)	0.73	20	Правильная
5% (об) этанол, pH 2.0 (HCl)	0.76	25	Размытые хроматографические зоны веществ
1-бутанол : уксусная кислота : вода (6:2:2) [2]	0.38	90	Правильная

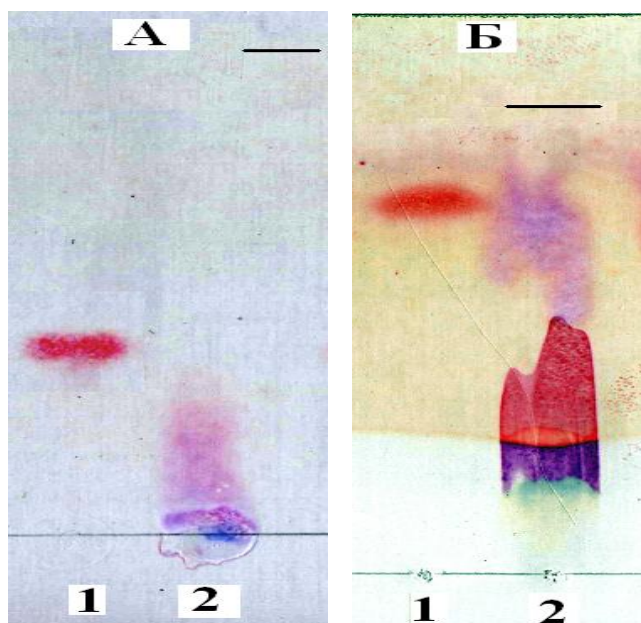


Рис. 2. Хроматограмма определения 4-аминобутановой кислоты в таблетках «Алендроната натрия» с использованием: А) подвижной фазы 1-бутанол : уксусная кислота : вода (6:2:2) [2] и (Б) 0.02 М ЦПХ, 0.05 М Бридж 35, 5.0% (об) этанол, pH=2 (HCl) [6]. 1 – 4-аминобутановая кислота; 2 – таблетки «Алендронат натрия» с добавкой 4-аминобутановой кислоты

В ходе исследования влияния ПАВ (цетилпиридиния хлорид, Бридж-35), органического модификатора (метанол, этанол, пропанол) и pH подвижной фазы на хроматографическое поведение алендроната натрия и 4-аминобутановой кислоты было изучено около 40 составов подвижных фаз. В таблице 1 приведен состав некоторых подвиж-

ных фаз, время хроматографирования и форма полученного хроматографического пятна.

Как можно увидеть из таблицы 1, добавки ЦПХ и этанола не оказывают значительного влияния на время хроматографирования и форму хроматографического пятна, а наилучшее разделение достигается с использованием мицеллярной подвижной фазы на основа неионогенного ПАВ Бридж-35.

Оптимальный состав подвижной фазы с точки зрения величины R_f 4-аминобутановой кислоты, формы хроматографических пятен и времени хроматографирования является водный раствор Бридж-35 с молярной концентрацией 0.005 моль/л, доведенный до pH 2.0 хлористоводородной кислотой. Такой состав подвижной фазы использовался в дальнейших исследованиях и при валидации методики количественного определения 4-аминобутановой кислоты в таблетках «Алендронат натрия».

Валидация методики количественного определения 4-аминобутановой кислоты в таблетках «Алендронат натрия». Валидацию методики проводили в соответствии с требованиями [8] и подходами, описанными в [9-15]. Согласно [8, 10] для методики количественного определения примесей при валидации проводят исследования по следующим показателям: точность, воспроизводимость, специфичность (селективность), предел количественного определения (в некоторых случаях дополнительно определяют предел детектирования), линейность и диапазон применения.

Селективность ТСХ методики определения 4-аминобутановой кислоты была доказана при проведении исследований о влиянии вспомогательных компонентов на разделение и форму пятна, и при выборе оптимального состава мицеллярной подвижной фазы. Было показано, что в выбран-

ных хроматографических условиях на определение 4-аминобутановой кислоты в таблетках «Алендронат натрия» не оказывают существенного влияния вспомогательные компоненты препарата; методика селективна.

Предварительный эксперимент по определению линейной зависимости аналитического сигнала (окраска пятна) от концентрации определяемого компонента показал, что при количестве 4-аминобутановой кислоты свыше 5 мкг/пятно наблюдается отклонение от линейной зависимости. Кроме того, при нанесении алендроната натрия свыше 150 мкг/пятно наблюдалось изменение параметра удерживания 4-аминобутановой кислоты – R_f уменьшалось по сравнению с R_f 4-аминобутановой кислоты в стандартном образце примерно на 0.1-0.2 единицы. Исходя из вышесказанного было выбрано оптимальное нанесение 100 мкг/пятно алендроната натрия и, соответственно, 1 мкг/пятно 4-аминобутановой кислоты.

Для проверки линейности методики и определения предела детектирования и предела количественного определения были проанализированы пять растворов с различной концентрацией 4-аминобутановой кислоты в диапазоне от 0.012 мг/мл (0.6 мкг/пятно) до 0.028 мг/мл (1.4 мкг/пятно) (пять параллельных определений), что составляет 60%-140% от номинального (1 мкг/пятно) содержания 4-аминобутановой кислоты. По результатам хроматографирования были рассчитаны параметры уравнения

$$I = A + B \cdot C$$

где C – концентрация 4-аминобутановой кислоты в растворе стандартного образца, мг/мл; I – средняя интегральная интенсивность окраски хроматографической зоны 4-аминобутановой кислоты.

Средняя интегральная интенсивность окраски хроматографической зоны представляет собой функцию интенсивности R , G , и B цветовых координат пикселей зоны, окрашенной аналитом (“объем пятна”) [6, 7]. Было получено следующее уравнение:

$$I = -(2.1 \pm 1.3) \cdot 10^3 + (17.3 \pm 0.6) \cdot 10^4 \cdot C;$$

коэффициент корреляции (R) составил 0.9976.

Из полученных данных рассчитаны предел детектирования (0.002 мг/мл или 0.1 мкг/пятно) и предел количественного определения (0.006 мг/мл или 0.3 мкг/пятно). Пределы вычисляли согласно 3.3 s/m и 10 s/m критериям, где s – стандартное отклонение средней интегральной интенсивности окраски хроматографической зоны образца, m – угол наклона градуировочной прямой.

Известно [16], что коэффициент корреляции не может служить мерой линейности, и в качестве критерия для ее оценки используют величину стандартного отклонения величины наклона (slope), полученной при расчете параметров уравнения линейной зависимости. Полученное

стандартное отклонение не должно превышать величину относительного стандартного отклонения, полученной при изучении точности или правильности методики. В данном случае рассчитанная величина относительного стандартного отклонения для наклона калибровочной прямой составляет 3.5%, а RSD при изучении правильности методики составляет, в среднем, 3.8%; следовательно, критерий линейности выполняется.

Для оценки правильности методики анализировали стандартные образцы 4-аминобутановой кислоты с известной концентрацией и сравнивали полученные данные после хроматографирования с истинным значением содержания определяемого вещества. В таблице 2 представлены данные девяти определений для трех различных концентраций 4-аминобутановой кислоты, охватывающий измеряемый диапазон концентраций.

Согласно [10], приемлемым критерием для точности и правильности методики определения примесей с использованием метода ТСХ является значение относительного стандартного отклонения от 5 % до 25 % в зависимости от концентрации определяемой примеси. Полученные нами данные о правильности методики близки к 5% пределу; методика характеризуется хорошей правильностью.

Сходимость и воспроизводимость методики определения примеси 4-аминобутановой кислоты проводили путем хроматографирования стандартных растворов 4-аминобутановой кислоты в течение 3-х дней. На каждую пластинку наносили растворы (3 концентрации) для построения градуировочного графика (одно нанесение каждой концентрации) и исследуемые растворы в трех параллельных нанесениях. По результатам хроматографирования было рассчитано содержание 4-аминобутановой кислоты. Результаты количественного определения и относительное стандартное отклонение (RSD) полученных результатов представлены в таблице 3. Критерием показателя воспроизводимости [8] является величина относительного стандартного отклонения, рассчитанного как 1.3- 1.7-RSD(сходимость). Так как допустимое отклонение для сходимости результатов определения составляет 5%, то максимально допустимое значение для показателя воспроизводимости будет 6.5%.

Таблица 2. Правильность результатов анализа (анализ образца известной концентрации)

Концентрация 4-аминобутановой кислоты в стандартном образце, мг/мл	Найдено, мг/мл	Правильность методики, $\Delta C/C \cdot 100$, %
0.0120	0.0115	4.2
0.0200	0.0193	3.5
0.0280	0.0292	4.3

Таблица 3. Результаты определения параметров сходимости и воспроизводимости методики ТСХ определения примеси 4-аминобутановой кислоты.

Стандартный раствор, мг/мл (номинальная концентрация, %)	Сходимость*		Воспроизводимость*, среднее значение (%); RSD (%)		
	Среднее значение (%); RSD (%)		день 1	день 2	день 3
0.0120 (100.0%)	98.1; 3.5		97.5; 4.4	100.8; 3.6	100.1; 2.8
0.0200 (100.0%)	101.5; 4.3		102.8; 3.5	99.4; 4.2	99.9; 3.9
0.0280 (100.0%)	99.8; 3.1		102.1; 4.7	99.5; 4.5	99.6; 3.8

Примечание. * - среднее значение из 3-х параллельных нанесений

Таблица 4. Робастность методики мицеллярной ТСХ.

Параметр	Средняя интегральная интенсивность окраски хромото- графической зоны (n=3)	RSD (%)	R _f
Стационарная фаза:			
Sorbfil-ПТСХ-АФ-А (серия 24.04.2008)	8294	0.96	0.75
Sorbfil-ПТСХ-АФ-А (серия 18.12.2008)	8788	1.22	0.72
Подвижная фаза:			
0.004 М Бридж-35, pH=2.0	8850	1.10	0.70
0.005 М Бридж-35, pH=2.0	8312	0.85	0.75
0.006 М Бридж-35, pH=2.0	8774	0.98	0.79
0.005 М Бридж-35, pH=1.8	8455	0.77	0.72
0.005 М Бридж-35, pH=2.2	8676	1.05	0.73
Насыщение камеры:			
насыщенная	8533	1.12	0.73
ненасыщенная	8787	0.94	0.75

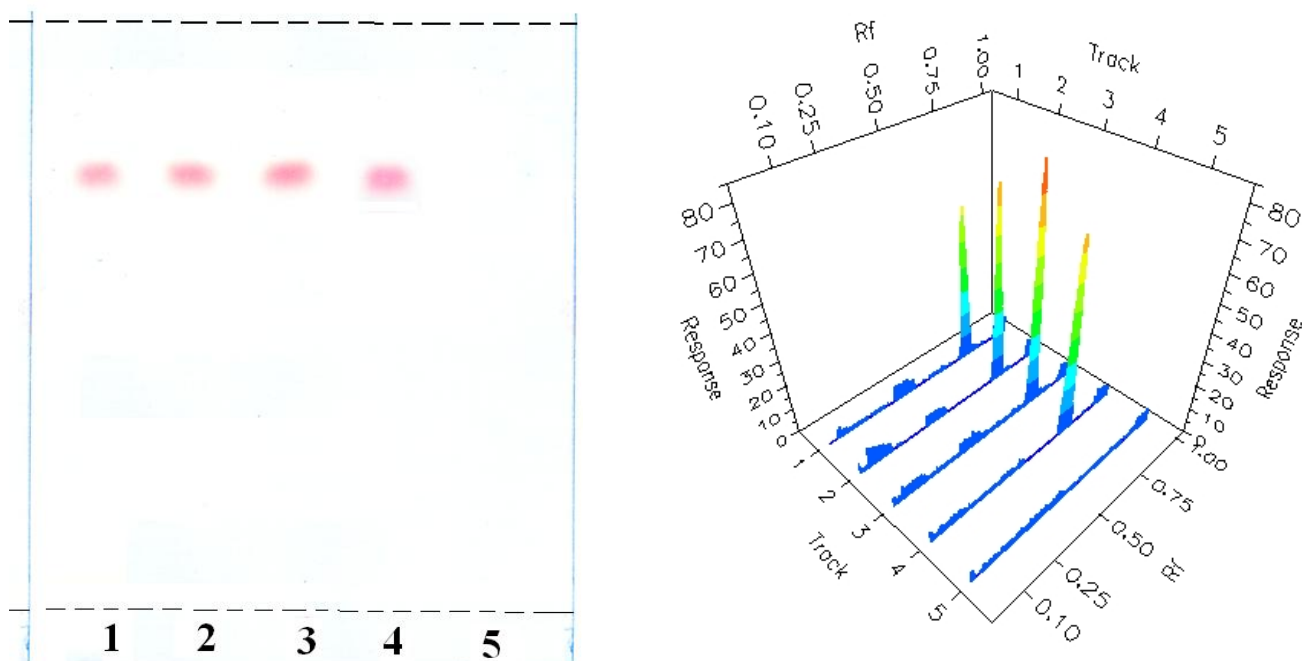


Рис. 3. ТСХ хроматограмма, полученная при определении содержания примеси 4-аминобутановой кислоты в таблетках «Алендронат натрия», и 3D-хроматограмма количественной оценки.

1 – стандартный раствор 4-аминобутановой кислоты (эквивалент 0.8% содержания примеси); 2 – стандартный раствор 4-аминобутановой кислоты (эквивалент 1.0% содержания примеси); 3 – стандартный раствор 4-аминобутановой кислоты (эквивалент 1.2% содержания примеси); 4 – модельный раствор таблеток «Алендронат натрия» с содержанием примеси 4-аминобутановой кислоты 1.0%; 5 – испытуемый раствор таблеток «Алендронат натрия»

Как можно увидеть из таблицы 3, полученные значения не превышают рассчитанный критерий, и, следовательно, методика характеризуется хорошей воспроизводимостью.

При изучении робастности методики определения примеси 4-аминобутановой кислоты методом мицеллярной ТСХ были проверены ряд параметров: различные серии пластинок для ТСХ, насыщенность и ненасыщенность хроматографической камеры, изменение в составе мицеллярной подвижной фазы. Как критические параметры оценивались изменение величины R_f и относительное стандартное отклонение площадей пятен. Результаты определений приведены в таблице 4.

Как можно увидеть из данных, представленных в таблице 4, небольшие изменения в составе подвижной фазы, насыщенность хроматографической камеры и различные серии пластинок, выбранных для проведения эксперимента, не оказывают значительное влияние на получаемые хроматографические данные. Однако, с целью повышения точности измерений и исключения случайных погрешностей при проведении эксперимента, предлагается на одну пластинку помимо испытуемых растворов дополнительно наносить 3 стандартных раствора для построения калибровочной кривой и использовать полученные данные для расчетов.

Анализ готовой лекарственной формы. Разработанная методика была использована для определения 4-аминобутановой кислоты в таблетках «Алендронат натрия» («Стома», Харьков). В ходе анализа готовой лекарственной формы примеси 4-аминобутановой кислоты в таблетках «Алендронат натрия» было введено известное количество примеси, эквивалентное 1% содержания 4-аминобутановой кислоты в препарате. На рис. 3 приведен рисунок ТСХ хроматограммы, полученный при определении содержания примеси 4-аминобутановой кислоты в таблетках «Алендронат натрия», и 3D-хроматограмма для расчета

количественного содержания определяемой примеси.

После проведения анализа в модельной смеси было обнаружено 4-аминобутановой кислоты в эквиваленте 0.98%, что говорит о том, что разработанная методика позволяет проводить определение с достаточной точностью. Исследования, проведенные на образцах таблеток «Алендронат натрия», приобретенных в аптеках г. Харькова, показали, что в исследуемых образцах примеси 4-аминобутановой кислоты обнаружено не было.

Разработанная методика может быть рекомендована для внесения в нормативную документацию по контролю качества готового лекарственного средства «Таблетки Алендронат натрия».

ВЫВОДЫ

В работе разработана методика количественного определения примеси 4-аминобутановой кислоты в готовой лекарственной форме «Таблетки Алендроната натрия» методом мицеллярной тонкослойной хроматографии. Использование мицеллярной подвижной фазы – водный раствор Бридж-35 с молярной концентрацией 0.005 моль/л, доведенный до pH 2.0 хлористоводородной кислотой и метанола как растворителя при пробоподготовке позволило за 20 минут отделить примесь 4-аминобутановой кислоты как от основного действующего вещества (алендронат натрия), так и от мешающих вспомогательных веществ. Сканирование полученной хроматограммы и использование специальной программы позволило количественно оценить содержание примеси в готовом лекарственном средстве.

Проведенные валидационные исследования показали, что методика характеризуется хорошей селективностью, сходимостью, воспроизводимостью и точностью, и может быть рекомендована фармацевтическим предприятиям для контроля качества таблеток «Алендроната натрия».

ЛИТЕРАТУРА

1. Аналитическая химия в создании стандартизации и контроля качества лекарственных средств: в 3-х томах на русском языке / Под ред. член-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского. – Харьков: Изд. «НТМТ», 2011 г., т. 1 – 464 стр., т. 2 – 474 стр., т. 3 – 520 стр.
2. European Pharmacopoeia 7th edn. Council of Europe: France, Strasbourg, 2010. P. 3310
3. Державна Фармакопея України. 1-е вид. Державне підприємство «науково-експертний фармакопейний центр». *Харків: РЕПІГ*, 2001. С 556
4. Rondeau J.-M., Bitsch F., Bourgien E., Geiser M., Hemmig R., Kroemer M., Lehmann S., Ramage P., Rieffel S., Strauss A., Green J.R., Jahnke W. Structural basis for the exceptional in vivo efficacy of bisphosphonate drugs. *Chem.Med.Chem.*, 2006, 1, 267–273.
5. United States Pharmacopoeia, 30th edn. The United States Pharmacopoeia Convention Inc, Rockville MD, 2009. P. 4250.
6. Ле Конг Х., Бойченко А.П., Дробот А.В., Логинова Л.П. Количественное определение примеси 4-аминобутановой кислоты в субстанции алендроната натрия методом мицеллярной тонкослойной хроматографии. *Методы и объекты химического анализа*. 2009, 4(2), 130–138.
7. Дробот А.В., Бойченко А.П., Логинова Л.П. О функциях зависимостей сигнал содержание при цифровой обработке тонкослойных хроматограмм. *Тез. док. науч. конф. «Каразинские*

чтения 2008». Харьков, 2008, С. 21-22.

8. *Validation of Analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. In: www.ich.org

9. Smrkea S., Vovk I. Comprehensive thin-layer chromatography mass spectrometry of flavanols from *Juniperus communis* L. and *Punica granatum* L. *J.Chromatogr.A*, 2013, 1289, 119–126

10. Renger B., Végh Z., Ferenczi-Fodor K. Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods. *J.Chromatogr.A.*, 2011, 1218(19), 2712–2721.

11. Ferenczi-Fodor K., Végh Z., Renger B. Impurity profiling of pharmaceuticals by thin-layer chromatography. *J.Chromatogr.A.*, 2011, 1218(19), 2722–2731.

12. Kaale E., Risha P., Layloff T. TLC for pharmaceutical analysis in resource limited countries. *J.Chromatogr.A.*, 2011, 1218(19), 2732–2736.

13. Coran S.A., Mulas S., Mulinacci N. Crucial aspects of high performance thin layer chromatog-

raphy quantitative validation. The case of determination of rosmarinic acid in different matrices. *J.Chromatogr.A.*, 2012, 1220, 156–161.

14. Shewiyo D.H., Kaale E., Risha P.G., Dejaegher B., De Beer J., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y. Accuracy profiles assessing the validity for routine use of high-performance thin-layer chromatographic assays for drug formulations. *J. Chromatogr.A.*, 2013, 1293, 159–169.

15. Shewiyo D.H., Kaale E., Risha P.G., Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y. HPTLC methods to assay active ingredients in pharmaceutical formulations: a review of the method development and validation steps. *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 2012, 66, 11-23.

16. Ermer J., Ploss H.J. Validation in pharmaceutical analysis: Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 2005, 37, 859-870