

Validation of Assay for Seneciphyline and Related Impurities in Platyphylline Hydrotartrate Substance and «Platyphylline-Zdorovie» Injectable Preparation by Using RP HPTLC Method

O.V. Kolisnyk^{1,2*}, O.A. Zinchenko³, V.P. Georgiyevskiy^{1,3}

¹ National Technical University «Kharkiv Polytechnic Institute», Frunze str., 21, Kharkiv, Ukraine, 61002

² Pharmaceutical company «Zdorovie» Ltd, Shevchenko str., 22, Kharkiv, Ukraine, 61013;

*e-mail: chemiker2010@yandex.ua

³ Ukrainian research center pharmaceutical grade quality of medicines, Astronomichna str., 33, Kharkiv, Ukraine, 61085

Received: October 08, 2015; Accepted: October 23, 2015

The article shows the results of determination of validation parameters of assay for seneciphyline and related impurities in platyphylline hydrotartrate substance and “Platyphylline-Zdorovie” injectable preparation by reversed-phase high-performance thin-layer chromatography method. The instrumental tools for drawing samples onto chromatographic plate and chromatodensimetry for quantitative processing of the results were used in the work. Range of assay linearity was 0.05–0.45 µg/spot, which is 25–225% relatively to the maximum permissible impurity content 0.2 µg/spot (1.0%); detection limit 0.02 µg/spot; quantitation limit 0.05 µg/spot; relative standard deviation obtained in the study of accuracy, precision and repeatability does not exceed 8%. Obtained results of the validation studies indicate compliance with the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine. Thus, the assay can be recommended to pharmaceutical companies for quality control of platyphylline hydrotartrate substance and injectable preparation on its base.

Keywords: platyphylline hydrotartrate, seneciphyline, reversed-phase high-performance thin layer chromatography, related impurities, assay, validation

Валідація методики кількісного визначення сенецифіліну та супровідних домішок в субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційному препараті «Платифілін-Здоров'я» методом ОФ ВЕТШХ

О.В. Колісник^{1,2*}, О.А. Зінченко³, В.П. Георгієвський^{1,3}

¹ Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», вул. Фрунзе, 21, Харків, 61002

² ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», вул. Шевченка, 22, Харків, 61013;

*e-mail: chemiker2010@yandex.ua

³ Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів, вул. Астрономічна, 33, Харків, 61085

Надійшла: 08 октября 2015 г; Прийнята до друку: 23 октября 2015 г

У статті приведено результати визначення валідаційних характеристик методики кількісного визначення сенецифіліну, супровідних домішок у субстанції платифіліну гідротартрату та в ін'єкційному препараті «Платифілін-Здоров'я» методом обернено-фазової високоефективної тонкошарової хроматографії. В роботі використано інструментальні засоби нанесення проб на хроматографічну пластинку та хроматоденситометрію для кількісної обробки результатів аналізу. Діапазон застосування методики склав 0.05–0.45 мкг/пляма, що становить 25–225% по відношенню до гранично допустимого вмісту домішки 0.2 мкг/пляма (1.0%); межа виявлення 0.02 мкг/пляма; межа кількісного визначення 0.05 мкг/пляма; відносне стандартне відхилення, отримане при дослідженні правильності, прецизійності (збіжності) та відтворюваності не перевищує 8%. Отримані результати валідаційних досліджень свідчать про відповідність методики вимогам Державної Фармакопеї України. Таким чином, методика може бути рекомендована фармацевтичним підприємствам для контролю якості субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційного препарату на її основі.

Ключові слова: платифіліну гідротартрат, сенецифілін, обернено-фазова високоефективна тонкошарова хроматографія, супровідні домішки, кількісне визначення, валідація

У відповідності до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) [1], гармонізованої з Європейською Фармакопеєю (ЄФ) [2], будь-яка аналітична методика, що передбачується для внесення в нормативний документ або за допомогою якої вирішуються певні офіційні задачі, повинна бути валідована. В протилежному разі неможна бути впевненим в коректності отриманих результатів [3]. Проведення валідації регулює технічна Настанова (ЄФ) [4]. Однак дана Настанова викладає лише загальні принципи валідації методик. Враховуючи специфіку валідації методик кількісного визначення домішок з використанням методу ВЕТШХ, необхідним є використання критеріїв прийнятності та процедур, що не суперечать вимогам ДФУ-ЄФ. Такі процедури та підходи викладені як у ДФУ [1], так і в Настанові [5] та роботах [6, 7].

Методики контролю якості лікарських засобів повинні бути точними, експресними та відтворюваними, і тому розробка таких методик контролю якості є одним з головних напрямків розвитку фармацевтичного аналізу.

У попередній роботі нами була розроблена методика визначення сенецифіліну та інших супровідних домішок в субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційному препараті «Платифілін-Здоров'я» з використанням методу обернено-фазової високоефективної тонкошарової хроматографії [8]. В зазначених лікарських засобах контроль вмісту домішок поєднує ознаки граничного та кількісного випробувань. У випадку контролю готового продукту в відділі контролю якості підприємств та контролюючих лабораторій на відповідність аналітичної частини реєстраційного дос'є користуються граничним випробуванням, оскільки досліджується лише питання про неперевищення вмісту домішок межі нормативної документації (НД). Водночас, методика визначення домішок, що описана в НД, також використовується для вивчення стабільності та контролю виробництва лікарського засобу. При цьому важливим є не тільки відповідність вмісту домішок вимогам НД, але і сам вміст домішок – тобто ми маємо справу з кількісним випробуванням. Слід зазначити, що критерії валідації для цих видів випробувань є різними, але у випадку кількісних включають повний набір валідаційних характеристик (за винятком межі виявлення, яка використовується у разі близьких значень межі кількісного визначення і нормованої межі вмісту домішки, що визначається) [1].

Метою даної роботи було дослідження валідаційних характеристик кількісного визначення сенецифіліну та супровідних домішок в субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційному препараті «Платифілін-Здоров'я» методом ОФ ВЕТШХ.

Обладнання та реактиви: при проведенні валідаційних випробувань використовували наступне аналітичне обладнання виробництва

фірми CAMAG, Швейцарія: система для напівавтоматичного нанесення проб Linomat 5; мікрошприц місткістю 100 мкл; сканер моделі TLC Scanner 3. Управління даним обладнанням здійснюється за допомогою програмного забезпечення WinCats.

Хроматографування проводили в скляній прямокутній камері з плоским дном для пластин розміром 20x10 см виробництва CAMAG, Швейцарія.

Дериватизацію (проявлення) проводили з використанням йодної камери та CAMAG TLC Sprayer (CAMAG, Швейцарія), який дозволяє отримувати тонкодисперсний струмінь реагенту-проявника.

Наважки субстанції платифіліну гідротартрату та сенецифіліну зважували на вагах моделі AUW220D з невизначеністю зважування 33 мкг.

Для випробувань використовували мірний посуд класу А (першого класу) фірми Simax, Чехія, що відповідає вимогам ДФУ [1].

При вивченні валідаційних характеристик застосовували хроматографічні пластинки для ВЕТШХ наступних марок «Nano-Silica gel RP-18W» розміром 20x20 см (фірма Fluka, Німеччина) та «RP-18 W/UV₂₅₄» розміром 20x20 см (фірма MACHEREY-NAGEL, Німеччина). Пластини цих марок є аналогічними за своїм характеристиками (містять однаковий флуоресцентний індикатор та привитий до поверхні органічний модифікатор, кількість якого в обох випадках у перерахунку на вуглець складає 14%; товщина шару сорбенту – 0.15 мм; середній розмір пор 6 нм; мають приблизно однаковий розподіл частинок сорбенту за розмірами 2–10 мкм; алюмінієва основа). В якості стандартного зразка (СЗ) використовували сенецифілін виробництва Sigma-Aldrich (Німеччина), серії BCBP2495V із заявленим вмістом основної речовини 99.5% (GC).

Реактиви: метанол (Sigma-Aldrich, чистота 99.9%), розчин аміаку 25% (Sigma-Aldrich), кислота фосфорна 85% (Sigma-Aldrich), етанол 96% (АПЛХІМ Харків, фарм), йод (Sigma-Aldrich, чистота 99%), кислота хлористоводнева 37% (RCI Labscan, Pharma).

Приготування випробуваного розчину 1. Близько 50 мг (точна наважка) досліджуваного зразка субстанції платифіліну гідротартрату поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють в 15 мл дистильованої води та доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки.

Приготування випробуваного розчину 2. Під час дослідження препарату «Платифілін-Здоров'я» 2 мг/мл в якості випробуваного розчину використовують вилучений вміст мінімум п'яти ампул.

Приготування розчину порівняння платифіліну гідротартрату. 1 мл випробуваного розчину 1

(при дослідженні субстанції) або 2 (при дослідженні препарату) поміщають в мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм дистильованою водою до позначки та перемішують.

Приготування розчину порівняння сенецифіліну А. 5 мг (точна наважка) стандартного зразка сенецифіліну поміщають в мірну колбу місткістю 10 мл, розчиняють в 5 мл 0.01 М розчину хлористоводневої кислоти та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником.

Приготування розчину порівняння сенецифіліну В. 2 мл розчину порівняння сенецифіліну А поміщають в мірну колбу місткістю 50 мл, доводять об'єм дистильованою водою до позначки та перемішують.

Приготування розчину фосфорної кислоти. В мірну колбу місткістю 50 мл поміщали 30 мл 96% етанолу та додавали 10 мл 85% фосфорної кислоти, перемішували, охолоджували до кімнатної температури та доводили 96% етанолом до позначки.

На лінію старту, що знаходиться на відстані 10 мм від краю хроматографічної пластинки «Nano-Silica gel RP-18W» виробництва фірми Fluka розміром 20x10 см, за допомогою автоматичного аплікатору в тоці повітря наносять в точку випробування розчин, розчин порівняння платифіліну гідротартрату та розчин порівняння сенецифіліну В у відповідності до табл. 1.

Таблиця 1. Порядок та об'єми розчинів, що наносяться на хроматографічну пластинку при кількісному визначенні сенецифіліну та супровідних домішок.

№ треку	Розчин	Об'єм нанесення, мкл	Кількість, мікрограм нанесеної речовини
1	Випробуваний розчин	10.0	20 мкг
2	Розчин порівняння платифіліну гідротартрату (критерій придатності хроматографічної системи)	2.5	0.05 мкг
3	Розчин порівняння сенецифіліну В (критерій придатності хроматографічної системи)	2.5	0.05 мкг
4	Випробуваний розчин	10.0	20 мкг
5	Розчин порівняння платифіліну гідротартрату	5.0	0.10 мкг
6	Розчин порівняння сенецифіліну В	5.0	0.10 мкг
7	Випробуваний розчин	10.0	20 мкг
8	Розчин порівняння платифіліну гідротартрату	10.0	0.20 мкг
9	Розчин порівняння сенецифіліну В	10.0	0.20 мкг
10	Випробуваний розчин плюс розчин порівняння сенецифіліну В (критерій придатності хроматографічної системи)	10.0 + 10.0	20 + 0.20 мкг
11	Розчин порівняння платифіліну гідротартрату	15.0	0.30 мкг
12	Розчин порівняння сенецифіліну В	15.0	0.30 мкг

Пластинку поміщають в камеру з сумішшю розчинників метанол – аміаку розчин 25% (95:5) та хроматографують висхідним способом. Коли фронт розчинників пройде 5 см від лінії старту, пластинку виймають з камери, сушать в тоці теплого повітря до повного видалення слідів розчинників (близько 20 хв.), поміщають в камеру з парами йоду та витримують протягом 1 години. Після цього пластинку витримують 5 хв. на повітрі та сканують кожен трек в наступних умовах: розмір зони сканування – 8 мм × 0.4 мм; швидкість сканування – 20 мм/с; довжина хвилі реєстрації – 540 нм.

Після цього пластинку рясно обприскують розчином фосфорної кислоти, сушать 5 хв. на повітрі та нагрівають протягом 10 хв при 105 °С. Після охолодження пластинку поміщають в сканер та сканують кожен трек в наступних умовах:

розмір зони сканування – 8 мм × 0.4 мм; швидкість сканування – 20 мм/с; довжина хвилі реєстрації – 650 нм.

Вміст сенецифіліну, як для препарату «Платифілін-Здоров'я» так і для субстанції платифіліну гідротартрату повинен бути не більше 1.0%.

Вміст будь-якої іншої домішки, як для препарату «Платифілін-Здоров'я» так і для субстанції платифіліну гідротартрату повинен бути не більше 1.0%.

В якості придатності хроматографічної системи використані наступні критерії: на хроматограмі випробуваного розчину 10 мкл (20 мкг) та розчину сенецифіліну В 10 мкл (0.20 мкг), нанесених однією плямою, додаткова пляма сенецифіліну має чітко ділитися з основною плямою випробуваного розчину ($\Delta R_f \geq 0.15$);

на хроматограмах розчинів порівняння платифіліну гідротартрату 2.5 мкл (0.05 мкг) та розчину порівняння сенецифіліну В 2.5 мкл (0.05 мкг) мають чітко фіксуються плями.

Валідація методики

Валідацію методики проводили відповідно до вимог [1, 5] і підходами, описаними в [3, 6, 7, 9, 10]. Методику було відвалідовано за характеристиками специфічність (селективність), робасність, правильність, прецизійність (збіжність), лінійність, межа виявлення, межа кількісного визначення та діапазон застосування.

Вміст домішок в субстанції платифіліну гідротартрату згідно [11] не має перевищувати 1.0% для вмісту сенецифіліну та не більше 1.0% будь-якої іншої домішки. По факту аналіз домішок в субстанції та препараті ні чим не відрізняються, так як останній є 0.2% розчином платифіліну гідротартрату у воді без додавання будь-яких інших компонентів. Їх різниця полягає лише в тому, що останній може містити в собі продукти гідролізу під дією таких чинників як температура (під час стерилізації) та взаємодія з продуктами вилуговування скла (під час стерилізації та

зберігання). Запропонована методика є наскрізною для препарату та субстанції. Специфічність (селективність) для даної методики доказана нами раніше [8] в тесті на придатність хроматографічної системи, та при дослідженні розділення продуктів гідролізу платифіліну гідротартрату від основного компоненту та сенецифіліну. Показано, що платинециновий спирт (основний продукт гідролізу) залишається на старті і не заважає хроматографічному розділенню платифіліну та сенецифіліну; методика селективна.

При вивченні робасності методики визначення домішки сенецифіліну та інших супровідних домішок методом ОФ ВЕТШХ було перевірено ряд параметрів: різні серії пластинок для ВЕТШХ, різні виробники пластинок, насиченість та ненасиченість хроматографічної камери, зміна складу рухомої фази. Як критичний параметр оцінювали зміну величини R_f . Результати визначень наведені в табл. 2.

Як можна побачити з даних, представлених в таблиці 2, незначні варіювання параметрів хроматографування не впливають на одержувані хроматографічні дані.

Таблиця 2. Робасність методики ОФ ВЕТШХ.

№ п/п	Стаціонарна фаза	Рухома фаза	t, °C	Насиченість камери*	** , хв	R _f ***
1	Fluka «Nano-Silica gel RP-18W» (серія BCBL4033V 2014 рік)	метанол – аміаку розчин 25% (95:5)	20	-	7.5	0.55; 0.75
2	теж саме	теж саме	20	+	7.0	0.53; 0.73
3	– // –	метанол – аміаку розчин 25 % (94:6)	20	+	7.8	0.51; 0.70
4	– // –	метанол – аміаку розчин 25 % (95:5)	15	+	9.2	0.54; 0.75
5	– // –	теж саме	25	+	6.7	0.49; 0.68
6	Fluka «Nano-Silica gel RP-18W» (серія BCBL3317V 2010 рік)	– // –	20	+	7.3	0.52; 0.71
7	MACHEREY-NAGEL «RP-18 W/ UV ₂₅₄ » (серія 902042 2011 рік)	– // –	20	+	8.2	0.54; 0.75

Примітка: * – «+» – насичена камера, «-» – ненасичена камера; ** – час хроматографування; *** – перше значення для платифіліну друге для сенецифіліну.

Дослідження характеристик правильність, прецизійність (збіжність), лінійність, межа виявлення, межа кількісного визначення та діапазон застосування були досліджені методом «введено-знайдено». При цьому діапазон нанесених кількостей (0.05–0.45 мкг/пляма), як для платифіліну гідротартрату (метод внутрішньої нормалізації для визначення неідентифікованих домішок), так і для сенецифіліну, склав 25–225% від номінального (0.2 мкг/пляма) вмісту будь-якої іншої неідентифікованої домішки та (0.2 мкг/пляма) сенецифіліну. Лінійність в діапазоні застосування методики було встановлено виходячи

з попереднього експерименту по визначенню лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації компонента, що визначається. Вибір цього діапазону обумовлений різним вмістом сенецифіліну та інших неідентифікованих домішок в субстанції платифіліну гідротартрату. Субстанція виділяється з рослинної сировини де вміст сенецифіліну знаходиться на рівні платифіліну гідротартрату, а вміст останнього збільшують з використанням різного роду збагачувальних процесів, які не завжди дають результат, що відповідає вимогам [11].

Валідаційні характеристики визначення домішки сенецифіліну. Результати хроматографування 9 розчинів порівняння сенецифіліну в діапазоні 0.05–0.45 мкг/пляма, 5 досліджуваних розчинів субстанції платифіліну гідротартрату та розчинника (води) наведено в таблиці 3. За результатами хроматографування

було отримано наступне рівняння: $y = (1936.6 \pm 36.48) \cdot x + (84.13 \pm 10.88)$, $R^2 = 0.9975$, де x – кількість сенецифіліну нанесеного на пластинку, мкг.

Зображення пластинки після проявлення (пари йоду 1 год., обробка розчином фосфорної кислоти та нагрів при 105 °С) показано на рис. 1.

Таблиця 3. Результати сканування хроматограм розчинів порівняння сенецифіліну, випробуваних розчинів та розчинника.

№ треку (рис. 1)	Значення R_f	Інтегральна площа піка	Нанесена кількість сенецифіліну, мкг
Розчин порівняння сенецифіліну			
2	0.60	176.7	0.053
3	0.60	272.6	0.106
5	0.61	406.7	0.159
6	0.62	496	0.212
8	0.62	624.3	0.265
9	0.62	705.9	0.318
11	0.63	798	0.371
12	0.63	892.4	0.424
14	0.64	1003.3	0.477
Випробуваний розчин			
1	0.62	318.4	–
4	0.61	295.6	–
7	0.61	302.2	–
10	0.61	307.1	–
13	0.62	315.8	–
Розчинник			
15	–	0	–

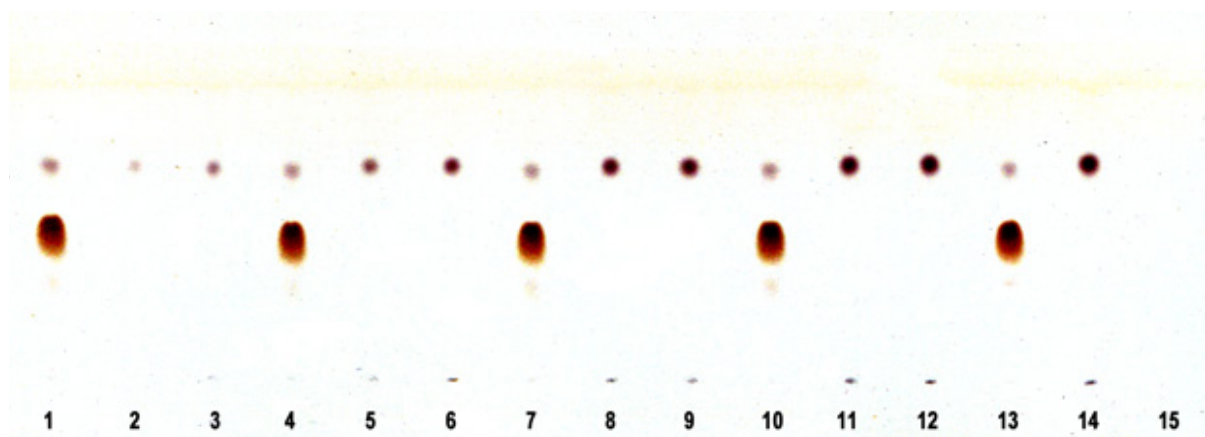


Рис. 1. Хроматограми розчинів порівняння сенецифіліну від 0.05 до 0.45 мкг/пляма (треки 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14), випробуваних розчинів субстанції платифіліну гідротартрату (треки 1, 4, 7, 10, 13) та розчинника (трек 15).

З отриманих даних розраховували межу виявлення (0.02 мкг/пляма) та межу кількісного визначення (0.05 мкг/пляма). Межі визначали згідно 3.3 s/b та 10 s/b критеріям, де s – стандартне відхилення середньої інтегральної площі піка хроматографічної зони зразка, b – тангенс кута

нахилу градуальної прямої.

По наведеним в таблиці 3 результатам розраховували вміст сенецифіліну в модельних розчинах сенецифіліну (розчинах порівняння). Результати представлені в таблиці 4.

Таблиця 4. Результати аналізу модельних розчинів та їх статистична обробка для кількісного визначення сенецифіліну.

№ роз- чину	Введено в % від номінальної концентрації (, фактично, %)	Знайдено в % від номінальної концентрації (, %)	Знайдено в % до введеного
1	26.5	27.75	104.70
2	53	55.92	105.52
3	79.5	76.29	95.96
4	106	105.34	99.38
5	132.5	126.40	95.40
6	159	157.27	98.91
7	185.5	186.16	100.36
8	212	214.63	101.24
9	238.5	239.17	100.28
Середнє, (Z_{cp} , %)			100.19
Відносне стандартне відхилення, (RSD_z , %)			3.403
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z, \% = t(95\%, 9 - 2) \times RSD_z = 1.895 \times 3.403$			6.449
Критичне значення для збіжності результатів (Δ_{As} , %)			8.0
Систематична похибка ($\delta, \% = Z_{cp} - 100 $)			0.194
Критерій незначущості систематичної похибки:			
1) статистична незначущість: $\delta < \Delta_z: \sqrt{9} = 6.449:3 = 2.150\% > 0.194\%$			Виконується
Якщо не виконується 1), то $\bar{\delta} \leq \max \bar{\delta}$:			Виконується
2) практична незначущість: $\bar{\delta}, \% \leq 0.32 \times 8.0 = 2.56\% > 0.194\%$			Виконується
Загальний висновок про методику			КОРЕКТНА

З даних, наведених в таблиці 4, випливає, що методика кількісного визначення сенецифіліну не має статистично значущої систематичної похибки, характеризується достатньою правильністю та прецизійністю (збіжністю) у всьому діапазоні нанесень (від 25 % до 225 %) і є коректною.

Рівняння лінійної залежності знайденої

кількості сенецифіліну від введеної в нормалізованих координатах: $Y = (1.0022 \pm 0.0151) \cdot X - (0.6869 \pm 2.2517)$, $R^2 = 0.9984$, де X – введена кількість сенецифіліну, %, Y – знайдена, %. Результати статистичної обробки представлені в таблиці 5.

Таблиця 5. Метрологічні характеристики лінійної залежності для кількісного визначення сенецифіліну.

Найменування величини	Значення	Критерії прийнятності	Висновок (відповідає чи ні)
B	1.0022	–	
S_b	0.0151	–	
A	-0.6869	$\leq 1.8946 \times s_a = 4.27$	відповідає
s_a	2.2517	–	
s_r	3.0994	≤ 4.22	відповідає
R	0.9984	0.9508	відповідає

Невизначеність методики (Δ_{As}) складається з невизначеності пробопідготовки (Δ_{SP}) та невизначеності кінцевої аналітичної операції – хроматографування та розрахунку інтегральних площ піків речовини, що визначається (Δ_{FAO}):

$$\Delta As = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2}$$

Розрахункова невизначеність операцій приготування випробуваного розчину та розчину порівняння сенецифіліну (невизначеність вагів 33 мкг) складає 1.01%. Невизначеність кінцевої

аналітичної операції розраховували по результатам хроматографування модельного розчину з концентрацією сенецифіліну, що відповідає гранично допустимій (1.0%) та розчину порівняння сенецифіліну. Сумарне значення невизначеності результатів кінцевої хроматографічної операції, за трьома паралельними хроматограмами кожного з розчинів складає 4.2%. Звідси випливає, що загальна невизначеність методики (Δ_{As}) складає 4.32%. Це значення не перевищує гранично допустиму величину – 8.0%.

Валідаційні характеристики визначення

неідентифікованих домішок. Результати хроматографування 9 розчинів порівняння платифіліну гідротартрату (метод внутрішньої нормалізації) в діапазоні 0.05–0.45 мкг/пляма, 5 досліджуваних розчинів субстанції платифіліну

гідротартрату та 5 досліджуваних розчинів препарату «Платифілін-Здоров'я» (виготовлених з цієї субстанції) наведено в таблиці 6.

Зображення 3D-хроматограм після проявлення та сканування показано на рис. 2.

Таблиця 6. Результати сканування хроматограм розчинів порівняння платифіліну гідротартрату, випробуваних розчинів субстанції та препарату.

№ треку (рис. 2)	Значення R_f	Інтегральна площа піка	Нанесена кількість платифіліну гідротартрату, мкг
Розчин порівняння платифіліну гідротартрату			
2	0.70	405.2	0.051
4	0.72	682.3	0.103
6	0.71	952.4	0.154
8	0.70	1173.6	0.205
10	0.71	1459.2	0.256
12	0.71	1745	0.308
14	0.70	2056.1	0.359
16	0.71	2350	0.410
18	0.70	2631.6	0.461
Випробуваний розчин субстанції (неідентифіковані домішки, за винятком сенецифіліну)			
1	–	не знайдено	–
5	–	те ж	–
9	–	– // –	–
13	–	– // –	–
17	–	– // –	–
Випробуваний розчин препарату (неідентифіковані домішки, за винятком сенецифіліну)			
3	0.60	412.8	–
7	0.59	428.0	–
11	0.61	399.9	–
15	0.60	415.6	–
19	0.61	420.3	–

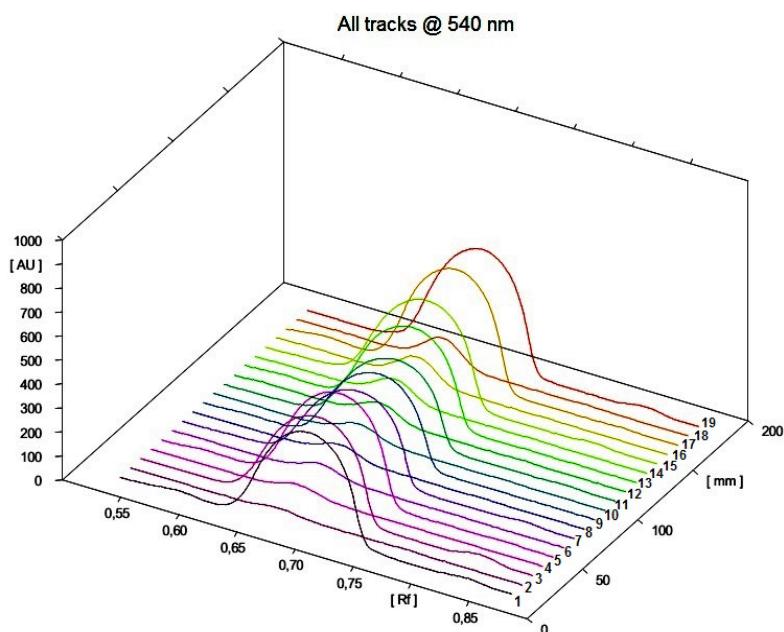


Рис. 2. 3D-хроматограми кількісного визначення неідентифікованих домішок в субстанції платифіліну гідротартрату та препараті "Платифілін-Здоров'я" (значення R_f – відносне; взяте відношення до більшої відстані ніж те, що пройшла рухома фаза, так як це дозволяє краще оцінити вклад фону).

Рівняння лінійної залежності площ піків від нанесеної кількості платифіліну гідротартрату на пластинку: $y = (5426.8 \pm 74.64) \cdot x + (104.42 \pm 21.53)$, $R^2=0.9987$, де x – кількість платифіліну гідротартрату нанесеного на пластинку, мкг.

Розрахунки проводили так само, як і для вмісту домішки сенецифіліну. Межа виявлення –

0.02 мкг/пляма, межа кількісного визначення – 0.05 мкг/пляма.

В таблиці 7 представлені результати аналізу модельних розчинів та їх статистична обробка для кількісного визначення неідентифікованих домішок.

Таблиця 7. Результати аналізу модельних розчинів та їх статистична обробка для кількісного визначення неідентифікованих домішок.

№ розчину	Введено в % від номінальної концентрації (, фактично, %)	Знайдено в % від номінальної концентрації (, %)	Знайдено в % до введеного
1	24.19	25.63	94.41
2	49.63	51.25	96.83
3	75.78	76.88	98.57
4	106.28	102.50	103.69
5	131.27	128.13	102.46
6	156.23	153.75	101.61
7	178.95	179.38	99.77
8	203.20	205.00	99.12
9	228.52	230.63	99.09
Середнє, (Z_{cp} , %)			99.50
Відносне стандартне відхилення, (RSD_z , %)			2.852
Відносний довірчий інтервал			
$\Delta_z, \% = t(95\%, 9 - 2) \times RSD_z = 1.895 \times 2.852$			5.404
Критичне значення для збіжності результатів (Δ_{As} , %)			8.0
Систематична похибка ($\delta, \% = Z_{cp} - 100 $)			0.50
Критерій незначущості систематичної похибки:			
1) статистична незначущість: $\delta < \Delta_z: \sqrt{9} = 5.404:3 = 1.801\% > 0.5\%$			Виконується
Якщо не виконується 1), то $\delta \leq \max \delta$:			
2) практична незначущість: $\delta, \% \leq 0.32 \times 8.0 = 2.56\% > 0.5\%$			Виконується
Загальний висновок про методику			КОРЕКТНА

Рівняння лінійної залежності знайденої кількості платифіліну гідротартрату від введеної в нормалізованих координатах: $Y = (0.9979 \pm 0.0126) \cdot X - (0.365 \pm 1.8178)$, де X введена кількість

платифіліну гідротартрату, %, Y – знайдена, %. Результати статистичної обробки представлені в таблиці 8.

Таблиця 8. Метрологічні характеристики лінійної залежності для кількісного визначення неідентифікованих домішок (метод внутрішньої нормалізації).

Найменування величини	Значення	Критерії прийнятності	Висновок (відповідає чи ні)
B	0.9979	–	
S_b	0.0126	–	
A	0.3650	$\leq 1.8946 \times s_a = 4.27$	відповідає
s_a	1.8178	–	
s_r	2.5021	≤ 4.22	відповідає
R	0.9989	0.9508	відповідає

Розрахункова невизначеність операцій приготування випробуваного розчину та розчину порівняння платифіліну гідротартрату складає 0.80%. Невизначеність кінцевої аналітичної операції розраховували по результатам хроматографування модельного розчину з концентрацією платифіліну

гідротартрату, що відповідає гранично допустимій 1.0% [11]. Сумарне значення невизначеності результатів кінцевої хроматографічної операції, за трьома паралельними хроматограмами складає 3.40%. Звідси випливає, що загальна невизначеність методики (Δ_{As}) складає 3.49%.

Це значення не перевищує гранично допустиму величину – 8.0%.

Висновки

Проведені валідаційні дослідження показали, що методика характеризується хорошою

селективністю, прецизійністю (збіжністю) і правильністю, і може бути рекомендована фармацевтичним підприємствам для контролю якості субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційного препарату «Платифілін-Здоров'я».

Література

1. Державна фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків: РІРЕГ, 2001. С. 556. Доповнення 1. 2004. С. 520. Доповнення 2. 2008. С. 620.
2. European Pharmacopoeia 8th edn. Council of Europe: France, Strasbourg, 2013. P. 3655.
3. Аналитическая химия в создании стандартизации и контроле качества лекарственных средств: в 3-х томах на русском языке. Под ред. член-кор. НАН Украины В.П. Георгиевского. Харьков: «НТМТ», 2011, т. 1., С. 464. т. 2. С. 474. т. 3. С. 520.
4. Technical Guide for the Elaboration of Monographs. European Pharmacopoeia. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 7th Edition. Council of Europe: France, Strasbourg, 2015. P. 67.
5. *Validation of Analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*. In: www.ich.org
6. 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.
7. Ferenczi-Fodor K., Végh Z., Renger B. Impurity profiling of pharmaceuticals by thin-layer chromatography. *J.Chromatogr.A.*, 2011, 1218(19), 2722 – 2731.
8. Колісник А.В. Розробка методики контролю сенецифіліну та інших супровідних домішок в субстанції платифіліну гідротартрату та ін'єкційному препараті «Платифілін-Здоров'я» методом ОФ ВЕТШХ. *Фармаком.* 2015, 2, 59–67.
9. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна и др.; Разработчики В.Л. Багирова, А.И. Гризодуб, Т.Х. Чибилев, Д.А. Леонтьев, Н.А. Ляпунов и др. Москва: Фармацевтическая промышленность, 2007. С. 58.
10. Ренкевич А.Ю., Куликов А.Ю. Разработка и валидация методики количественного определения 4-аминобутановой кислоты в таблетках алендроната натрия методом мицеллярной тонкослойной хроматографии. *Методы и объекты химического анализа.* 2013, 8(4), 199 – 206.
11. АНД-ДВ-ДР-023 «Платифиллина гидротартрат».