

УДК 615.074:615.22:615.453.6

О. С. НАЗАРОВА

*Державне підприємство «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції»*

## РОЗРОБКА І ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛІЗИНОПРИЛУ ДИГІДРАТУ ДЛЯ ОЦІНКИ КІНЕТИКИ РОЗЧИНЕННЯ *IN VITRO* З ТАБЛЕТОК

*Представлена розроблена методика кількісного визначення лізиноприлу дигідрату для оцінки кінетики розчинення лікарських препаратів в твердій дозованій формі (таблетки) в умовах *in vitro* з використанням методу рідинної хроматографії. Проведені валідаційні дослідження підтверджують специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність і діапазон застосування запропонованої методики.*

**Ключові слова:** лізиноприлу дигідрат, валідація, метод рідинної хроматографії, таблетки.

### ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Оцінка еквівалентності *in vitro* - це випробування, призначене для оцінки еквівалентності профілів розчинення в трьох середовищах зі значеннями рН, відповідними фізіологічному діапазону значень рН різних відділів шлунково-кишкового тракту, досліджуваного лікарського засобу та препарату порівняння. На відміну від випробування «Розчинення», яке проводиться при оцінці якості твердих дозованих лікарських форм відповідно до умов, встановлених у методах контролю якості на лікарський препарат, оцінку еквівалентності *in vitro* проводять в особливих умовах (середовища розчинення, кількість досліджуваних зразків, швидкість обертання мішалки, точки контролю, методики кількісного визначення вивільненої речовини), які зазвичай не збігаються між собою [1-3].

Проведення фармацевтичної розробки вітчизняного препарату-генерику з лізиноприлом дигідратом в формі таблеток робить актуальними розробку та стандартизацію методики кількісного визначення лізиноприлу для оцінки кінетики розчинення *in vitro*.

### АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Таблетки з лізиноприлом описані в USP 36 монографія «Lisinopril Tablets» і в ВР-2013 мо-

нографія «Lisinopril Tablets» [4, 5]. Кількісне визначення вмісту лізиноприлу згідно цих монографій при проведенні тесту «Розчинення» запропоновано проводити методом рідинної хроматографії (РХ) на хроматографічній колонці розміром (200x4,6) мм, яка заповнена октилсилільним силікагелем для хроматографії за температури 40 °С, детектування за довжини хвилі 215 нм. Для приготування рухомої фази 1 г натрію 1-гексансульфонату розчиняють в 820 мл буферного розчину рН 2,0 і додають 180 мл ацетонітрилу, швидкість рухомої фази 1 мл/хв. Ці умови були покладені нами в основи розробки методики кількісного визначення лізиноприлу при проведенні тесту «Розчинення» в лікарському препараті у формі таблеток [6].

### ВИДІЛЕННЯ НЕВИРШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Слід зазначити, що в запропонованих фармакопейних методиках [4, 5] кількісного визначення лізиноприлу методом РХ для приготування рухомої фази використовують в якості йон-парного реагенту натрію 1-гексансульфонат. Це пов'язано з тим, що в зазначених умовах одночасно проводять, як кількісне визначення, так і визначення супровідних домішок і є необхідність в досягненні необхідного ступеня розділення основного піку лізиноприлу з рядом домішок, але цей реагент є дуже дорогим і використання його при проведенні великої кількості

експериментальних робіт з вивчення кінетики розчинення є не доцільним. Тому є науковий інтерес пов'язаний з пошуком нового складу рухомої фази без йон-парного реагенту для розробки методики кількісного визначення лізиноприлу, який перейшов в середовище розчинення, при проведенні досліджень *in vitro*.

#### ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою даної роботи є розробка і валідація методики кількісного визначення лізиноприлу дигідрату для оцінки кінетики розчинення лікарських препаратів в твердій дозованій формі в умовах *in vitro*.

#### ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

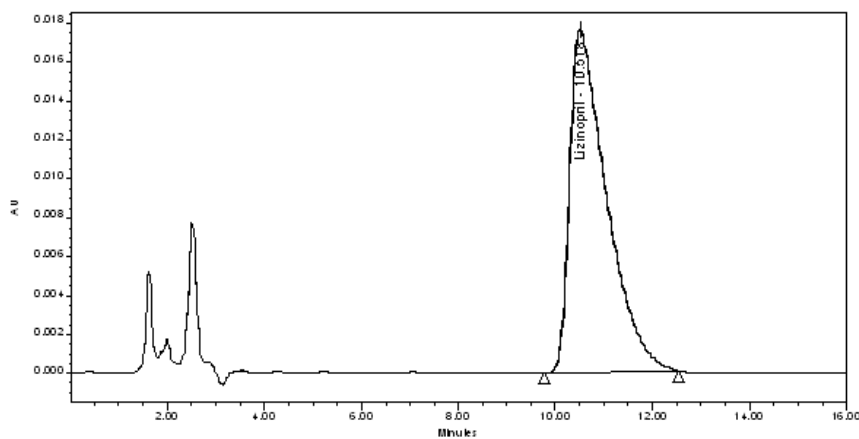
Об'єктом досліджень є препарат-генерик «Лізиноприл-Лугал» у формі таблеток, розроблений лабораторією таблетованих лікарських засобів ДП «ДНЦЛЗ» для впровадження на ПАТ «Луганський хіміко-фармацевтичний завод», Україна, який містить в якості діючої речовини лізиноприлу дигідрат (фірми «Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd.», Китай) дозуванням 10 мг та 20 мг на одну таблетку.

Аналітичні дослідження проводили методом рідинної хроматографії на хроматографі фірми «Waters 2487» (США) з ультрафіолетовим детектором в ізократичному режимі, з використанням аналітичних ваг ВА 210-S фірми «Sartorius» (Німеччина) і рН-метру МР-512 (Китай). Як стандарт використовували стандартний зразок (СЗ) лізиноприлу дигідрату (фірма «Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd.», Китай, або ФСЗ ДФУ).

Для приготування розчинів СЗ наважку лізиноприлу дигідрату спочатку розчиняли в суміші розчинників вода – метанол (4:1), а потім аліквору отриманого розчину розводили відповідним середовищем розчинення до отримання концентрації лізиноприлу дигідрату 24 мг/мл.

Вивчення кінетики розчинення проводили в трьох рекомендованих середовищах розчинення з різними значеннями рН [1]: в розчині хлористоводневої кислоти рН 1.2, ацетатному буферному розчині рН 4.5 та фосфатному буферному розчині рН 6.8. Всі буферні розчини готували згідно ДФУ, Доповнення 2, 2.9.3, с. 141.

Для кількісного визначення лізиноприлу дигідрату, який перейшов в середовище розчинення, при проведенні досліджень *in vitro* нами запропоновано використовувати методом РХ (ДФУ, 2.2.29, 2.2.46). На підставі проведених експериментальних досліджень були обрані найбільш оптимальні умови хроматографування з використанням в елюенті мінімальної кількості полярного органічного компонента (ацетонітрилу) і без використання йон-парного реагенту: хроматографічна колонка розміром (250x4.6) мм, заповнена сферичним октилсилільним силікагелем для хроматографії з розміром часток 5 мкм (наприклад XTerra RP8); рухома фаза: ацетонітрил – фосфатний буферний розчин рН 2,0 (4 : 96); швидкість рухомої фази – 1,5 мл/хв; детектування за довжини хвилі 210 нм; температура колонки – 50 °С. Типова хроматограма розчину СЗ лізиноприлу дигідрату в буферному розчині з рН 1.2 в зазначених умовах наведена на рис. 1. Хроматограми в інших середовищах розчинення мають аналогічний профіль.



	Vial	Injection	SampleName	Area
1	63	1	Lizinoприл*KinetRast*pH1,2^CO	904185
2	63	2	Lizinoприл*KinetRast*pH1,2^CO	905731
3	63	3	Lizinoприл*KinetRast*pH1,2^CO	904958

Рис. 1. Хроматограма розчину стандартного зразку лізиноприлу дигідрату в буферному розчині з рН 1.2

Доказ придатності умов хроматографічного визначення забезпечується введенням в методику тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи». Для розчину СЗ лізиноприлу дигідрату введені наступні умови придатності хроматографічної системи для піку лізиноприлу: ефективність хроматографічної колонки має бути не менше 1000 теоретичних тарілок; відносне стандартне відхилення (RSD) має відповідати вимогам ДФУ, 2.2.46; коефіцієнт симетрії має бути не більше 2.5.

Методики кількісного визначення, які використовують під час фармацевтичної розробки, мають бути валідовані. Набір досліджуваних валідаційних характеристик залежить від призначення аналітичної методики. В нашому випадку максимальна невизначеність аналізу при проведенні досліджень має бути не більше  $\max \Delta A_s\% = 3.0\%$  і критерії оцінки цієї методики використовували для цієї невизначеності [7-9].

Специфічність методики була доведена тим, що час утримування піку лізиноприлу на хроматограмі випробуваного розчину збігається з часом утримування відповідного піку на хроматограмі розчину СЗ і основний пік відокремлюється від системних піків (рис. 1).

Лінійність, збіжність, правильність і діапазон застосування методики визначали на модельних сумішах з відомим вмістом діючої речовини з «плацебо». Вміст аналізованої речовини був в межах від 50% до 130% відносно номінального значення. В усіх досліджуваних середовищах встановлена лінійність залежності площі піку від концентрації лізиноприлу дигідрату в нормалізованих координатах в області 50–130% (рис. 2-4).

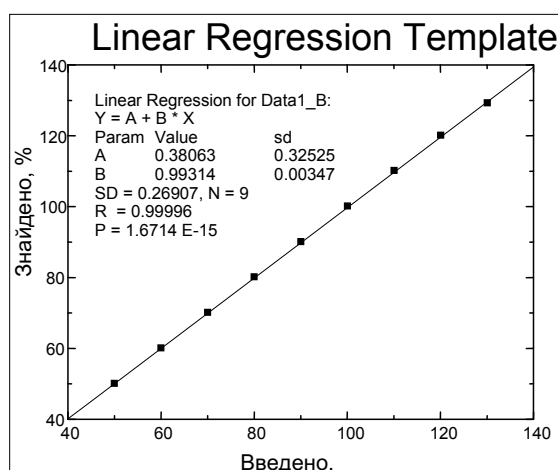


Рис. 2. Лінійна залежність площі піка від концентрації лізиноприлу в нормалізованих координатах в середовищі з хлористоводневою кислотою рН 1.2

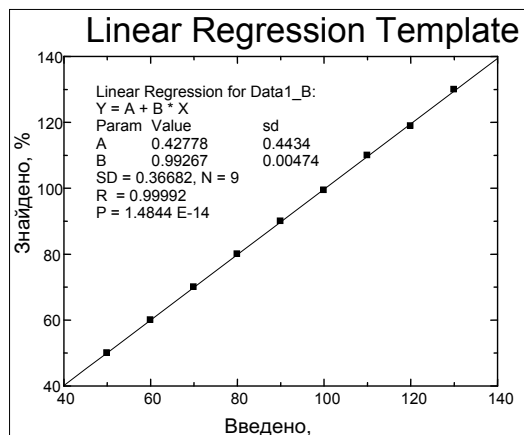


Рис. 3. Лінійна залежність площі піка від концентрації лізиноприлу в нормалізованих координатах в середовищі ацетатного буферного розчину рН 4.5

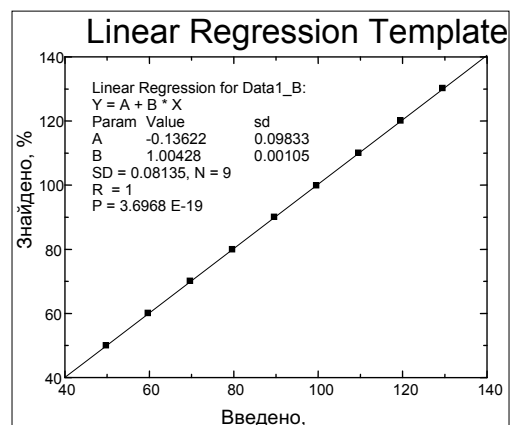


Рис. 4. Лінійна залежність площі піка від концентрації лізиноприлу в нормалізованих координатах в середовищі фосфатного буферного розчину рН 6.8

Розрахунок параметрів лінійної залежності  $Y_i = b \cdot X_i + a$  для лізиноприлу дигідрату був проведений методом найменших квадратів. Як видно з табл. 1, виконуються вимоги до параметрів лінійної залежності ( $R$ ,  $a$ ), тобто лінійність методики визначення лізиноприлу дигідрату підтверджується в усьому діапазоні концентрацій (50-130%). Високі значення коефіцієнтів кореляції, також задовольняють вимогам критерію прийнятності ( $R_{\min} = 0.9984$ ) і підтверджують лінійність залежності між «введеною» і «знайденою» кількістю досліджуваної речовини (табл. 1) в усіх досліджуваних середовищах.

З табл. 1 видно, що для лізиноприлу дигідрату методика аналізу характеризується достатньою прецизійністю (збіжністю). Знайдені значення відносного довірчого інтервалу величини  $Z$  ( $\Delta$ ) менше критичного значення для збіжності результатів (3.0 %).

**РЕЗУЛЬТАТИ, ОТРИМАНІ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ВАЛІДАЦІЇ АНАЛІТИЧНОЇ ПРОЦЕДУРИ  
КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЛІЗИНОПРИЛУ ДИГІДРАТУ МЕТОДОМ РХ ДЛЯ  
ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ КІНЕТИКИ РОЗЧИНЕННЯ В УМОВАХ *IN VITRO***

N п/п	Валідаційні параметри	Результати	Критерії прийнятності	Висновок
1	Перевірка повної невідомості результатів	<i>Таблетки по 10 мг</i> $\Delta_{As} = 1,25 \%$  <i>Таблетки по 20 мг</i> $\Delta_{As} = 1,20 \%$	Прогнозована невизначеність результатів аналізу за методикою кількісного визначення лізиноприлу: $\Delta_{As} \leq 3,0 \%$	Відповідає
2	Специфічність	На хроматограмі розчину «плацебо» немає додаткових піків, які мають час утримування, що збігається або близький до часу утримування основного піка лізиноприлу	На хроматограмі розчину «плацебо» не повинно бути додаткових піків, які мають час утримування, що збігається або близький до часу утримування основного піка лізиноприлу	Відповідає
		<i>pH 1,2:</i> $K_{sim} = 1,9$ <i>pH 4,5:</i> $K_{sim} = 1,9$ <i>pH 6,8:</i> $K_{sim} = 1,9$	Коефіцієнт симетрії піка лізиноприлу має бути не більше 2.5	Відповідає
		<i>pH 1,2:</i> 1100 теоретичних тарілок <i>pH 4,5:</i> 1165 теоретичних тарілок <i>pH 6,8:</i> 1261 теоретичних тарілок	Ефективність хроматографічної колонки, розрахована для піків лізиноприлу має бути не менше 1000 теоретичних тарілок	Відповідає
3	Лінійність	<i>pH 1,2:</i> $ a  = 0,38063$ $R = 0,99996$ <i>pH 4,5:</i> $ a  = 0,42778$ $R = 0,99992$ <i>pH 6,8:</i> $ a  = 0,13622$ $R = 1,00000$	Для лінійної залежності площі піку від вмісту аналізованої речовини: $ a  \leq 1,92$ $R \geq 0,9984$	Відповідає
4	Правильність	<i>pH 1,2:</i> $\delta = 0,24 \%$ <i>pH 4,5:</i> $\delta = 0,21 \%$ <i>pH 6,8:</i> $\delta = 0,27 \%$	Повинен виконуватися критерій незначущості систематичної похибки: 1) $\delta\% \leq \frac{\Delta}{3}$ 2) $\delta\% \leq 0,32 \times 3,0 = 0,96 \%$	Відповідає
5	Прецизійність (збіжність)	<i>pH 1,2:</i> $\Delta_z = 0,41 \%$ <i>pH 4,5:</i> $\Delta_z = 0,64 \%$ <i>pH 6,8:</i> $\Delta_z = 0,17 \%$	Довірчий інтервал одиничного значення для вибірки відносин знайдено / введено повинен задовольняти вимогам: $\Delta_z \leq 3,0 \%$	Відповідає
6	Діапазон застосування	<i>pH 1,2,</i> <i>pH 4,5, pH 6,8:</i> 50 – 130 % від номінального вмісту	50 – 130 % від номінального вмісту	Відповідає

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики - систематичні похибки методики є статистично і/або практично незначущими, тобто методика аналізу характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 50% до 130% (табл. 1).

Таким чином, підтверджена лінійність, прецизійність (збіжність) і правильність визначен-

ня лізиноприлу дигідрату методом рідинної хроматографії в діапазоні використання від 50% до 130% для всіх трьох середовищ розчинення.

Розрахунок невизначеності пробопідготовки, виконаний за розрахунковою формулою методики контролю з використанням підходу до допустимої невизначеності мірного посуду (табл. 1), підтверджує, що повна прогнозована невід-

значеність результатів для двох дозованих форм (10 мг і 20 мг на одну таблетку) при дослідженні кінетики розчинення менше критичного значення  $\Delta A_s = 3.0\%$ , тобто методика має забезпечити достатню точність вимірювань.

#### ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

1. Розроблена методика кількісного визначення лізиноприлу дигідрату з використанням методу рідинної хроматографії, яка може бути використана для оцінки кінетики розчинення в умовах *in vitro*, в препаратах в формі таблеток.

2. Проведені валідаційні дослідження підтверджують специфічність, лінійність, прецизійність (збіжність), правильність і діапазон застосування запропонованої методики.

#### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

- 5.N.2. Дослідження біодоступності та біоеквівалентності генеричних лікарських засобів [Державна Фармакопея України] / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. – Доповнення 2. — Х. : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – С. 231.
- Настанова з клінічних досліджень. Лікарські засоби. Дослідження біодоступності та біоеквівалентності: Настава 42-7.1:2005 / Державний фармакологічний центр МОЗ України і ДП «Державний науковий центр лікарських засобів». Розроб.: В. І. Мальцев, М.О. Ляпунов та ін.- Офіц. вид.- Київ: МОЗ України [Моріон], 2005.- 22 с.
- Who Expert Committee On Specifications For Pharmaceutical Preparations, Who Technical Report Series 937, Fortieth Report, Geneva.

- [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_937\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf)
- The United States Pharmacopeia 36th ed. – National Formulary 31th ed. – USP 36-NF 31. - Rockville: The United States Pharmacopeial Convention [Електронний ресурс].
  - British Pharmacopoeia [Електронний ресурс] / The British Pharmacopoeia secretariat. – London, 2013. – CD-ROM.
  - Myrna T.O. Development and validation of methods of quantitative determination of lisinopril during the «Dissolution» test in tablets / T.O. Myrna, O.S. Nazarova, Yu.M. Verbova // Актуальні питання створення нових лікарських засобів: XXII міжнар. наук.-практ. конф. молод. вчен. та студ., 23 квіт. 2015 р.: матеріали конф.- Харьков: Вид-во НФаУ, 2015.
  - 2.2.N.2. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид. – Доповнення 2. - Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – С. 85.
  - Гризодуб А.И. Стандартизация процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // 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: изд. «НТМТ», 2011 г., т. 3 – с. 934-1063.
  - Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / [Багирова В.Л., Гризодуб А.И., Чибилев Т.Х. и др.] ; под ред. Н.В. Юргеля. - М.: Фарм. пром., 2007. – 58 с.

**УДК 615.074:615.22:615.453.6**

**Е. С. Назарова**

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛИЗИНОПРИЛА ДИГИДРАТА ДЛЯ ОЦЕНКИ  
КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ *IN VITRO* ИЗ ТАБЛЕТОК**

Представлена разработанная методика количественного определения лизиноприла дигидрата для оценки кинетики растворения лекарственных препаратов в твердой дозированной форме (таблетки) в условиях *in vitro* с использованием метода жидкостной хроматографии. Проведенные валидационные исследования подтверждают специфичность, линейность, прецизионность (сходимость), правильность и диапазон применения предложенной методики.

**Ключевые слова:** лизиноприла дигидрат, валидация, метод жидкостной хроматографии, таблетки.

**UDC 615.074:615.22:615.453.6**

**E. S. Nazarova**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ASSAY METHOD FOR EVALUATION  
LISINOPRIL DIHYDRATE KINETICS OF *IN VITRO* FROM TABLETS**

Submitted by the technique of quantitative determination of lisinopril dihydrate to assess the kinetics of dissolution of drugs in solid dosage form (tablets) under conditions *in vitro* using liquid chromatography method. The conducted validation studies confirm specificity, linearity, precision (convergence), the accuracy and range of application of the proposed methodology.

**Key words:** lisinopril dihydrate, validation, method of liquid chromatography, tablets.

*Адреса для листування:*

61085, м. Харків, вул. Астрономічна, 33

Тел: (057) 720-64-61, 098-271-77-91

E-mail: lenanazarova1969@rambler.ru

lenanazarova@i.ua

Надійшла до редакції:

04.05.2015 р.