

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ПРОФІЛІВ РОЗЧИНЕННЯ ПРОТИВІРУСНОГО ЗАСОБУ**Ключові слова:** ВЕРХ, валідація, профілі розчинення, енісаміуму йодид

O. V. BURMAKA

Farmak JSC, Kyiv

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD QUANTITATIVE DETERMINATION OF ENISAMIUM IODIDE FOR THE ASSESSMENT OF DISSOLUTION PROFILE OF ANTIVIRAL AGENT**Key words:** HPLC, validation, dissolution profiles, enisamium iodide

Одним із важливих напрямів характеризування твердих лікарських форм є вивчення профілів розчинення, яке здійснюють як на етапі розроблення лікарського засобу, так і протягом його життєвого циклу. На ранньому етапі розроблення препарату за допомогою вивчення профілів розчинення можна визначити чинники, які впливають на швидкість вивільнення активного фармацевтичного інгредієнта (АФІ), що надає можливість оптимізації швидкості вивільнення АФІ з готової лікарської форми (ГЛФ). Так, наприклад, можна оцінити, наскільки буде критичним застосування АФІ, що виготовлений на різних виробничих дільницях. За допомогою профілів розчинення можна оцінити вплив розміру частинок АФІ/допоміжних речовин на швидкість вивільнення АФІ. У разі внесення змін до складу лікарського засобу необхідно перевірити, чи відбулися зміни, пов'язані з вивільненням діючої речовини з лікарської форми. Зміни можуть стосуватися не тільки допоміжних речовин, а й запровадження альтернативного виробника АФІ, технології виготовлення ГЛФ тощо [1]. До того ж, за допомогою профілів розчинення можна оцінити відтворюваність продукту під час масштабування та у разі виготовлення препарату від серії до серії.

Метою цієї роботи було розроблення та валідація методики кількісного визначення енісаміуму йодиду методом ВЕРХ, придатної для дослідження профілів розчинення таблеток противірусного засобу [2, 3] енісаміуму йодиду.

Матеріали та методи дослідження

Визначення було виконано відповідно до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) та Європейської фармакопеї (ЄФ) за пунктами 2.9.3 та 2.2.29. Як середовища розчинення використовували буферні розчини з рН 1,2; 4,5; 6,8, що приготовані відповідно до ДФУ та ЄФ.

Об'єктом дослідження був препарат «Амізон, таблетки, вкриті оболонкою, 0,25 г» виробництва ПАТ «Фармак».

Об'єм середовища розчинення становив 900 мл, швидкість обертання лопаті – 50 об/хв, час розчинення – 45 хв з точками відбору: 5, 10, 15, 20, 30, 45 хв.

Використано прилад для вивчення розчинення ERWEKA DT 820 (Німеччина).

Випробований розчин. Для випробування застосовували таблетки (1 таблетка містила 0,25 г енісаміуму йодиду).

Через 5, 10, 15, 20, 30, 45 хв відбирали по 2 мл із центральної частини посудини для розчинення, фільтрували крізь паперовий фільтр «синя стрічка» або застосовува-

© О. В. Бурмака, 2018

ли автоматичний відбірник проб (із застосуванням фільтрів «Poroplast», QLA (США) із розміром пор 20 мкм).

Розчин порівняння. 0,028 г стандартного зразка (СЗ) або робочого стандартного зразка (РСЗ) енісаміуму йодиду розчиняли у 80 мл відповідного буферного розчину і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл.

Буферний розчин рН 2,5. Суміш 1,085 г натрію октансульфонату і 1,000 г динатрію гідрофосфату безводного розчиняли в 900 мл води, доводили рН розчину фосфорною кислотою до $2,5 \pm 0,05$ і доводили об'єм розчину водою до 1 000,0 мл.

Хроматографування здійснювали на рідинному хроматографі Agilent 1260 (США) зі спектрофотометричним детектором за таких умов:

- хроматографічна колонка Zorbax Eclipse XDB – C18 розміром $150 \times 4,6$ мм, заповнена сорбентом із розміром частинок 5 мкм;
- рухома фаза – буферний розчин рН 2,5–вода–ацетонітрил (30:35:35);
- термін придатності рухомої фази 1 місяць;
- швидкість рухомої фази 0,5 мл/хв;
- час хроматографування 5 хв;
- детектування за довжини хвилі 225 нм;
- температура термостату колонки 30 °С.

Хроматографували 5 мкл розчину порівняння.

Час утримування першого піка енісаміуму йодиду (йодид-іон) близько 2,6 хв, другого піка енісаміуму йодиду (енісаміум) – близько 3,8 хв.

Хроматографічну систему вважали придатною, якщо на хроматограмі розчину порівняння:

- відносне стандартне відхилення, розраховане для піків енісаміуму з трьох паралельних хроматограм, не перевищувало 0,5%;
- ефективність хроматографічної колонки, обчислена за піком енісаміуму, становила не менше 2 500 теоретичних тарілок;
- коефіцієнт симетрії, розрахований для піка енісаміуму, становив не більше 1,5.

Хроматографували 5 мкл випробовуваного розчину.

Кількість енісаміуму йодиду, що перейшла у розчин із таблеток, у відсотках (X_1), обчислювали за формулою:

$$X_1 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 900 \cdot P \cdot (100 - W_0) \cdot 100}{S_0 \cdot 100 \cdot n \cdot a \cdot 100 \cdot 100},$$

де S_1 – площа піка енісаміуму, отримана на хроматограмі випробовуваного розчину;

S_0 – площа піка енісаміуму, отримана на хроматограмі розчину порівняння;

m_0 – наважка СЗ або РСЗ енісаміуму йодиду, взята для приготування розчину порівняння, мг;

a – заявлений вміст енісаміуму йодиду в одній таблетці, мг;

n – кількість таблеток, взятих для випробування;

P – вміст основної речовини у СЗ або РСЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, в перерахуванні на суху речовину, %;

W_0 – втрата в масі під час висушування у СЗ або РСЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, %.

За основу описаної методики було взято методику, що застосовують для визначення супровідних домішок енісаміуму йодиду [4].

Дослідження було здійснено в Центральній лабораторії фармацевтичної розробки ПАТ «Фармак».

Результати дослідження та обговорення

Підтверджено, що запропоновані умови хроматографування забезпечують селективність та достатньо короткий час хроматографування. При хроматографуванні розчину порівняння та випробовуваного розчину час утримування першого піка енісаміум йодид (йодид-іон) становить близько 2,6 хв, другого піка енісаміуму йодиду (енісаміум) – близько 3,8 хв. Типову хроматограму розчину порівняння наведено на рисунку.

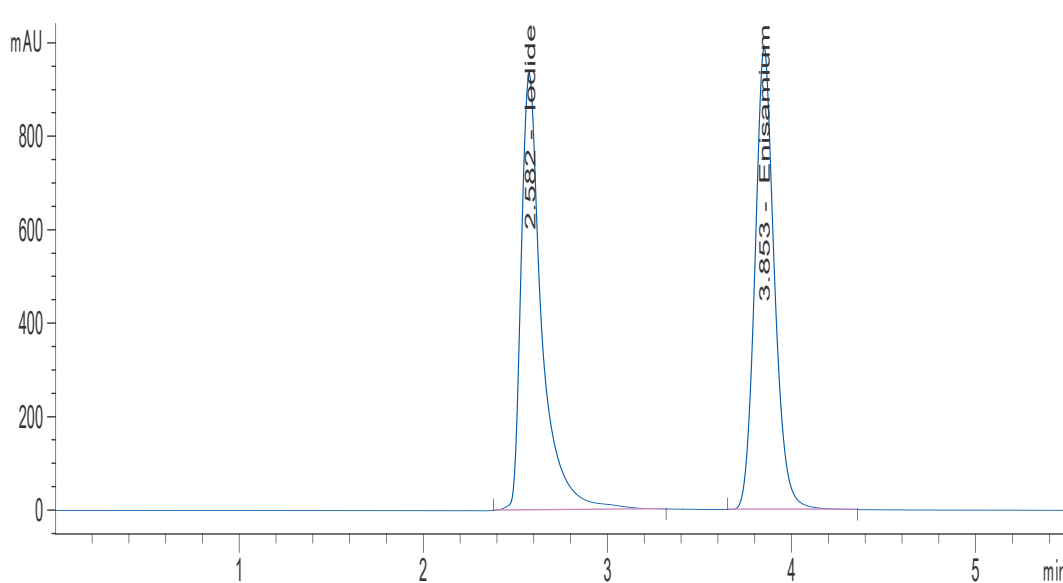


Рис. 1. Типова хроматограма розчину порівняння

Валідацію аналітичної методики було виконано відповідно до рекомендацій Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів для людини (ICH) [5].

Для підтвердження специфічності методики було приготовано розчин допоміжних речовин, що входять до складу препарату, в результаті чого була підтверджена відсутність співпадіння часу утримування визначуваного піка з піками допоміжних речовин.

Вивчення лінійності робили на модельних сумішах, в яких концентрація енісаміуму йодиду лінійно змінювалася в діапазоні від 5% до 130% відносно номінальної концентрації (0,28 мг/мл) енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині.

Розрахунок параметрів лінійної залежності здійснювали методом найменших квадратів [6].

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності, що рекомендовані ДФУ [7], дані наведено в табл. 1.

**Показники і метрологічні характеристики лінійності методики
визначення енісаміуму методом ВЕРХ**

Величина	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Отримані значення		
		середовище рН 1,2	середовище рН 4,5	середовище рН 6,8
b	–	1,0002	0,9964	0,9953
s_b	–	0,00346	0,00162	0,00177
$ a $	$\leq 5,0$	0,27531	0,07551	0,21467
s_a	–	0,2727	0,1280	0,13297
s_0	–	0,35605	0,16707	0,18183
s_0/b	–	0,35598	0,16767	0,18269
$ r $	$\geq 0,995$	0,99998	0,99999	0,99999

Примітка: b – кутовий коефіцієнт для розрахованої регресійної прямої; s_b – тангенс кута нахилу для розрахованої регресійної прямої; $|a|$ – вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої; s_a – стандартне відхилення вільного члена лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої; s_0 – залишкове стандартне відхилення; $|r|$ – коефіцієнт кореляції між введеним та знайденим значенням для енісаміуму.

Точність вивчено на рівні збіжності та внутрішньолабораторній прецизійності.

Для оцінки збіжності готували та аналізували розчини порівняння та 6 випробовуваних розчинів із концентраціями діючої речовини на рівні 100% вивільнення АФІ. Розчини було приготовано з однієї і тієї самої серії ГЛФ.

Внутрішньолабораторну прецизійність підтверджували порівняно з результатами другого аналітика, який наступного дня аналізував додаткові розчини порівняння та випробовувані розчини.

Результати перевірки точності аналітичної методики наведено в табл. 2.

**Результати вивчення точності методики визначення
енісаміуму методом ВЕРХ**

Аналітик	Знайдений вміст, %			
	№ зразка	середовище рН 1,2	середовище рН 4,5	середовище рН 6,8
Перший	1	99,7	99,3	98,8
	2	100,0	98,8	99,9
	3	103,2	99,3	99,2
	4	99,9	99,8	99,2
	5	99,9	99,6	99,1
	6	100,8	99,4	99,9
	Середнє значення	100,6	99,4	99,4
	$RSD_x, \%$	1,3	0,3	0,5
Другий	1	100,1	98,5	99,0
	2	100,0	98,3	99,6
	3	99,9	98,7	99,7
	4	100,3	98,4	100,1
	5	100,0	97,6	100,5
	6	99,9	98,8	101,6
	Середнє значення	100,0	98,4	100,1
	$RSD_x, \%$	0,2	0,4	0,9
–	RSD внутрішньо-лабораторної прецизійності, %	0,9	0,6	0,8
–	Відносна різниця середніх значень	0,6	1,0	0,7

Як впливає з табл. 2, відносне стандартне відхилення (*RSD*) отриманих результатів аналізу першого та другого аналітика, а також відносна різниця середніх значень результатів не перевищує 2,0%, що свідчить про належну повторюваність результатів.

Для оцінки правильності готували 3 групи модельних розчинів із концентрацією енісаміуму йодиду 5%, 100% та 130% відносно концентрації енісаміуму йодиду у розчині порівняння в трьох паралельних дослідах для кожного концентраційного рівня (в кожному середовищі розчинення). Отримані результати наведено в табл. 3.

Т а б л и ц я 3

Результати вивчення правильності методики визначення енісаміуму методом ВЕРХ

У модельній суміші відносно концентрації у розчині порівняння, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100$	Концентрація енісаміуму йодиду					
	знайдена на підставі площ піків відносно концентрації у розчині порівняння, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 100$			розрахована щодо введеної кількості, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$		
	середовище рН 1,2	середовище рН 4,5	середовище рН 6,8	середовище рН 1,2	середовище рН 4,5	середовище рН 6,8
5	4,88	5,08	5,02	97,60	101,60	100,40
5	4,91	5,05	4,99	98,20	101,00	99,80
5	4,90	5,10	5,03	98,00	102,00	100,60
100	100,56	99,47	99,74	100,56	99,47	99,74
100	100,46	100,40	99,60	100,46	100,40	99,60
100	100,69	99,81	100,01	100,69	99,81	100,01
130	129,95	129,44	129,39	99,96	99,57	99,53
130	129,77	129,38	129,33	99,82	99,52	99,48
130	130,04	129,68	129,44	100,03	99,75	99,57
<i>RSD</i> (Z_i), % (для рівня 5%)				0,3	0,5	0,4
<i>RSD</i> (Z_i), % (для рівня 100%)				0,1	0,5	0,2
<i>RSD</i> (Z_i), % (для рівня 130%)				0,1	0,1	0
<i>RSD</i> між значеннями всіх концентраційних рівнів (Z_i), %				1,2	1,0	0,4

П р и м і т к а: X_i та Y_i – нормалізовані значення «знайдено/введено»; Z_i – відношення «знайдено/введено» енісаміуму йодиду, %; C_i – концентрація енісаміуму йодиду в i -ому аналізованому розчині; C_{st} – концентрація енісаміуму йодиду в розчині порівняння; S_i – площа піка енісаміуму для i -того аналізованого розчину; S_{st} – площа піка енісаміуму для розчину порівняння.

Відносне стандартне відхилення між результатами для одного концентраційного рівня для енісаміуму становить не більше 2,0%.

Правильність аналітичної методики знаходиться в межах критерію 98,0–102,0%.

Робасність вивчали за стабільністю досліджуваних розчинів та надійністю хроматографічної процедури.

Стабільність випробовуваних розчинів вивчали за зміною площ піків під час зберігання розчинів за температури 25 °С. Було встановлено, що розчини порівняння та випробовувані розчини стабільні щонайменше протягом 24 год.

Надійність хроматографічної процедури перевіряли за варіабельністю швидкості потоку рухомої фази (0,45 мл/хв, 0,50 мл/хв, 0,55 мл/хв), температури термостату колонки (30 °С, 25 °С, 35 °С), складу рухомої фази (буферний розчин рН 2,5–вода–ацетонітрил (30:35:35), (31:35:34), (29:35:36)), рН буферного розчину (рН 2,5, рН 2,4, рН 2,6) та застосуванням альтернативної хроматографічної колонки (колонки з іншим серійним номером). Відповідно до цього виконували хроматографування розчинів порівняння та випробовуваних розчинів.

Варіабельність площ піків енісаміуму для кожної із умов порівняно з початковими умовами становить не більше 2,0%. Таким чином, аналітичну методику можна вважати робасною.

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки було здійснено, виходячи з даних, наведених в табл. 4.

Т а б л и ц я 4

Вихідні дані для розрахунку невизначеності пробопідготовки

Операція	Дані для розрахунку	Невизначеність, %
<i>Розчин порівняння</i>		
Зважування стандартного зразка	З точністю до $\pm 0,0002$ г	При наважці 28 мг становить 0,71
Доведення об'єму розчину до 100,0 мл	Колба на 100,0 мл	0,12
<i>Випробовуваний розчин</i>		
Відмірювання об'єму середовища розчинення	Мірний циліндр на 1 000 мл	1,0

Розрахунок сумарної невизначеності ΔSp для розчину порівняння наведено нижче.

$$\Delta Sp = \sqrt{0,71^2 + 0,12^2} = 0,72\% .$$

Сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить:

$$\sqrt{1,0^2 + 0,72^2} = 1,23\% .$$

Примітка: невизначеність пробопідготовки перевищує допустимий рівень, оскільки прийнятний рівень становить $0,32 \cdot \Delta_{As} = 0,32 \cdot 3,0 = 0,96\%$ ($1,23 > 0,96$).

Відповідно до вимог ДФУ, у разі, коли не виконується наведене вище співвідношення, то використовують критерій незначущості цієї систематичної похибки порівняно з максимально припустимою невизначеністю аналізу [7].

Прогноз загальної невизначеності аналізу Δ_{As} робили за таким співвідношенням:

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

де Δ_{SP} – невизначеність пробопідготовки;

Δ_{FAO} – невизначеність кінцевої аналітичної операції (у цьому разі – ВЕРХ).

Δ_{FAO} розраховується зі співвідношення:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \times \frac{RSD_{\max} \times t_{95\%,n-1}}{\sqrt{n}} ,$$

де $\sqrt{2}$ – враховує наявність розчину порівняння та випробовуваного розчину;

RSD_{\max} – відносне стандартне відхилення (%), що описане у вимогах до придатності хроматографічної системи;

$t_{95\%,n-1}$ – односторонній коефіцієнт Стюдента для імовірності 95%;

n – число паралельних хроматограм.

Таким чином, виходячи із даних RSD , Δ_{FAO} становить:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \times \frac{0,5 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 1,18\%.$$

Тоді Δ_{As} становить = $\sqrt{1,23^2 + 1,18^2} = 1,70\% < 3,0\%$.

Оскільки прогноз загальної невизначеності аналізу Δ_{As} не перевищує критичного значення (3,0%), то методику вважають коректною, її можна відтворювати в інших лабораторіях із необхідною точністю.

Висновки

1. Розроблено методику кількісного визначення енісаміуму методом ВЕРХ, придатну для дослідження профілів розчинення таблеток енісаміуму йодиду. Підтверджено специфічність аналітичної методики. Коефіцієнти кореляції лінійної залежності (r) між введеним та знайденими значеннями для енісаміуму йодиду становлять $> 0,995$. Підтверджено правильність, прецизійність та робастність аналітичної методики.

2. Підтверджено стабільність випробовуваних розчинів та розчинів порівняння у разі їх зберігання за кімнатної температури щонайменше протягом 24 год.

3. Розроблена методика ВЕРХ кількісного визначення енісаміуму йодиду може бути використана для вивчення профілів розчинення таблеток енісаміуму йодиду.

Подяка

Автор висловлює подяку В. Д. Корзуненку та М. Г. Наливайченко за плідну дискусію та цінні поради до статті.

Конфлікт інтересів. Автор даної статті є працівником фармацевтичної компанії ПАТ «Фармак».

Список використаної літератури

1. Guideline on the investigation of bioequivalence /CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1 of European Medicines Agency. – London, 2010. – P. 18–19.

2. Boltz D., Peng X., Muzzio M. et al. Antiviral activity of enisamium against influenza viruses in differentiated normal human bronchial epithelial cells / The 3rd Antivirals Congress, 12–14 October 2014. – Amsterdam, 2014. – P. 46.

3. Boltz D., Cocking D., Cinatl J. et al. Antiviral Effect of a Derivative of Isonicotinic Acid Enisamium Iodide (FAV00A) Against Influenza Virus / The 5th ISIRV AVG Conference, 14–16 June 2017. – Shanghai, 2017. – P. 56.

4. Бурмака А. В., Гуреева С. Н., Маргутич В. М. Разработка методики контроля сопутствующих примесей субстанции энисамиума йодида // Фармаком. – 2017. – № 3. – С. 17–25.

5. Validation of analytical procedures: text and methodology / ICH Expert Working Group. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2 (R1). Step 4 version. – Guideline of European Medicines Agency. – London, 1995. – 13 p.

6. Державна фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Друге вид. – Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – С. 891–893.

7. Державна фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Друге вид. – Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – С. 924–925.

Надійшла до редакції 17 травня 2018 року.

А. В. Бурмака

ПАО «Фармак», г. Киев

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНИСАМИУМА ЙОДИДА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОФИЛЕЙ РАСТВОРЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНОГО СРЕДСТВА

Ключевые слова: ВЭЖХ, валидация, профили растворения, энисамиума йодид
А Н Н О Т А Ц И Я

Одним из важных направлений характеристики твердых лекарственных средств является изучение профилей растворения как на этапе фармацевтической разработки, так и на протяжении жизненного цикла лекарственного средства. При внесении изменений в состав лекарственного средства или технологию производства необходим контроль, касающийся изменений, которые связаны с высвобождением действующего вещества из лекарственной формы.

Целью этой работы была разработка и валидация методики изучения профилей растворения противовирусного средства энисамиума йодида в виде таблеток.

Использовали жидкостный хроматограф Agilent 1260 (США), оснащенный дегазатором, четырехканальным насосом, автоматическим вводом пробы, термостатом хроматографической колонки и диодноматричным детектором; а также хроматографическую колонку Zorbax Eclipse XDB – C18 размером 150 × 4,6 мм, заполненную октадецилсилильным сорбентом с размером частиц 5 мкм. Подвижная фаза представляла собой смесь буферного раствора рН 2,5, который содержал натрия октан-1-сульфоната в количестве 0,1%, воду и ацетонитрил (30:35:35 об/об/об). Также использован прибор для изучения растворения ERWEKA DT 820 (Германия).

При проведении валидации методики подтверждены такие характеристики как специфичность, правильность, прецизионность, робастность. Коэффициент корреляции линейной зависимости сигнала от концентрации (r) между введенными и найденными значениями для энисамиума йодида в каждой среде растворения составляет более 0,995.

Подтверждена стабильность растворов сравнения и испытуемых растворов при их хранении при комнатной температуре на протяжении 24 часов.

Разработанная методика ВЭЖХ количественного определения энисамиума йодида может быть использована для изучения профилей растворения таблеток энисамиума йодида.

O. V. Burmaka

Farmak JSC, Kiev

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD QUANTITATIVE DETERMINATION OF ENISAMIUM IODIDE FOR THE ASSESSMENT OF DISSOLUTION PROFILE OF ANTIVIRAL AGENT

Key words: HPLC, validation, dissolution profiles, enisamium iodide

А B S T R A C T

Assessment of the dissolution profiles is an important tool for characterization of solid drug products which need to be examined both at the stage of pharmaceutical development, and throughout their life cycle. It is necessary to control the release of the

active substance from the dosage form after changes which are related to variation of drug product composition or technology used.

The aim of this work was to develop and validate a method for the study of dissolution profiles of the antiviral agent enisamium iodide, tablets.

The liquid chromatograph Agilent 1260 (USA) equipped with degasser, four-channel pump, autosampler, chromatographic column thermostat and diode area detector was used. The chromatographic column Zorbax Eclipse XDB-C18, with dimensions 150×4.6 mm, filled by octadecylsilane sorbent, with a particles size of 5 μm , was used. The mobile phase is a mixture of a buffer solution of pH 2.5 containing sodium octane-1-sulfonate in an amount of 0.1%, water, acetonitrile (30:35:35 v/v/v). The flow rate of the mobile phase was 0.5 ml/min, and the temperature of the column was 30 °C. The detection wavelength was 225 nm, and 5 μL of sample solution was injected to the sampler. The retention times of the first and second peaks of enisamium iodide were 2.6 and 3.8 min, respectively. The dissolution tester ERWEKA DT 820 (Germany) was also used.

During the validation such parameters as specificity, accuracy, precision and robustness were confirmed. The correlation coefficients of linear regression (r) between the entered and found values for enisamium iodide is greater than 0.995.

Stability of the reference solutions and test solutions at storage at room temperature for 24 hours has been confirmed.

The developed HPLC method of the quantitative determination of enisamium iodide can be used for study of the dissolution profiles of enisamium iodide tablets.

Електронна адреса для листування з автором: o.burtaка@farmak.ua