

## ВАЛИДАЦИЯ ВЭЖХ-МЕТОДИКИ АНАЛИЗА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА «РЕМЕЛТОП»

Воробьева В. М., Макарова О. Г.

*ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Барнаул, Россия (656038, Барнаул, проспект Ленина, 40), e-mail: [ymv@agmu.ru](mailto:ymv@agmu.ru)*

Выполнена валидация ВЭЖХ-методики качественного и количественного анализа метилурацила и метронидазола в составе экспериментального препарата «Ремелтоп». Исследования проведены на жидкостном хроматографе LC-20 фирмы «SHIMADZU» (Япония) с УФ-детектором, с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с использованием программы «LCsolution version 1.4». неподвижная фаза – хроматографическая колонка 4,6×150 мм PerfectChrom C-18, размер частиц 5 нм («MZ-Analysentechnik», Германия). Подвижная фаза – А: трифторуксусная кислота раствор 0,1 %, Б: ацетонитрил 100 %. Температура колонки – 35 °С, скорость подачи элюента – 100 мкл/мин, объем пробы – 20 мкл, градиентное элюирование – изменение концентрации элюента Б от 10 % до 50 %, продолжительность анализа – 8 мин. Разработанная методика качественного и количественного анализа метилурацила и метронидазола методом ВЭЖХ может быть использована для оценки качества экспериментального препарата «Ремелтоп», порошка для приготовления суспензии для приема внутрь, так как экспериментальным путем установлены параметры линейности ( $R^2=0,9991$  при  $y=233600 \times x - 19,458$ ;  $R^2=0,9993$  при  $y=7490576 \times x + 0,246$ ), диапазона применения (от 50 до 150 %), прецизионности в условиях повторяемости (RSD = 0,50 %; 1,04%), правильности ( $\bar{Z} = 95,52 \pm 0,56\%$ ,  $99,96 \pm 0,16\%$ ) для метилурацила и метронидазола соответственно, которые не превышают рекомендуемых значений.

Ключевые слова: Ремелтоп (порошок для приготовления суспензии для приема внутрь), ВЭЖХ, количественное определение, валидация.

## VALIDATION OF HPLC-PROCEDURES FOR ANALYSIS OF AN EXPERIMENTAL DRUG «REMELTOP»

Vorobyeva V. M., Makarova O. G.

*The Altai State Medical University, 40 Lenin Str., Barnaul 656038, Russia, e-mail: [ymv@agmu.ru](mailto:ymv@agmu.ru)*

Validation HPLC-methods of qualitative and quantitative analysis of methyluracile and metronidazole in the structure of the experimental drug, «Remeltop» was performed. In liquid chromatograph LC-20 of the company «SHIMADZU» (Japan) with UV detector with further computer processing of the results of research using the program «LCsolution version 1.4» studies were conducted. Stationary phase - chromatography column 4,6 x 150 mm PerfectChrom C-18, a particle size of 5 nm («MZ-Analysentechnik», Germany). The mobile phase: trifluoroacetic acid a solution of 0.1%, B: acetonitrile 100%. Gradient elution concentration changes of eluent B from 10% to 50%, duration of the analysis 8 min. The technique for quality assessment Remeltop (a powder for oral suspension) can be used, as experimentally defined settings linearity ( $R^2=0,9991$ ,  $y=233600 \times x - 19,458$ ;  $R^2=0,9993$ ,  $y=7490576 \times x + 0,246$ ), application range (50 to 150%), precision in terms of the frequency of occurrence (RSD=0,50%; 1,04%; 1,75%), correctness ( $\bar{Z} = 95,52 \pm 0,56\%$ ,  $99,96 \pm 0,16\%$ ) for methyluracile and metronidazole respectively, which do not exceed the recommended values.

Keywords: Remeltop (a powder for oral suspension), HPLC, quantification, validation.

### Введение

Составной частью комплексного лечения ожогов пищевода является местная терапия, которая должна проводиться в соответствии с фазами развития патологического процесса. Сотрудниками кафедр фармацевтической технологии и детской хирургии АГМУ для местной терапии химических ожогов пищевода разработаны и запатентованы мукоадгезивные композиции на основе производного целлюлозы в форме геля для перорального приема. С целью увеличения срока годности и возможности промышленного

производства составы получены в форме «сухих суспензий» – однородных смесей лекарственных веществ со стабилизаторами, к которым добавляют необходимое количество растворителя непосредственно перед применением. Препараты получили условные названия «Премелтоп» (применение в фазу воспаления) и «Ремелтоп» (применение в фазу грануляций) [1,3].

При подготовке нормативной документации (ФСП, регламенты) на экспериментальный препарат «Ремелтоп» была разработана методика анализа лекарственных веществ, входящих в состав препарата, методом ВЭЖХ.

Цель данной работы – проведение валидационных исследований ВЭЖХ-методики качественного и количественного анализа экспериментального препарата «Ремелтоп».

### **Материалы и методы исследования**

Объект исследования – порошок для приготовления суспензий для приема внутрь: «Ремелтоп» по 7,5 г (в 100,0 готовой к применению суспензии: метилурацила (ФС 42-0256-07) 2,0; метронидазола (ФС 42-0257-07) 0,75; регенкура (ФС 42-3395-97) 4,0; ароматизатора, идентичного натуральному 0,5, натрия сахарината (ФС 42-1826-82) Е 954 0,24) для применения в фазу грануляций и формирования рубца.

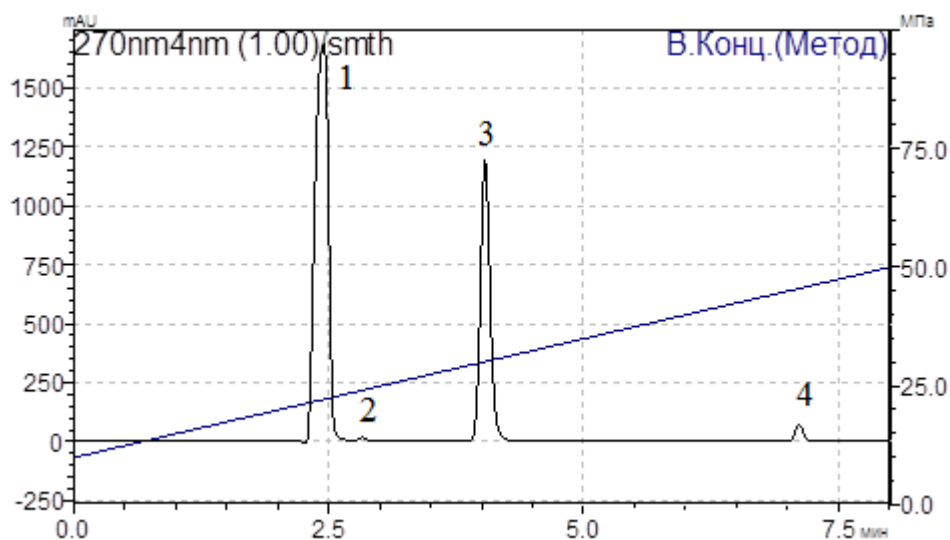
Экспериментальные исследования проведены на жидкостном хроматографе LC-20 фирмы «SHIMADZU» (Япония) с УФ-детектором, с последующей компьютерной обработкой результатов с использованием программы «LCsolution version 1.4». Неподвижная фаза – хроматографическая колонка 4,6×150 мм PerfectChrom C-18, размер частиц 5 нм («MZ-Analysentechnik», Германия). Подвижная фаза – А: трифторуксусная кислота (ТФУК) раствор 0,1 %, Б: ацетонитрил 100 %. Температура колонки – 35 °С, скорость подачи элюента – 100 мкл/мин, объем пробы – 20 мкл, градиентное элюирование – изменение концентрации элюента Б от 10 % до 50 %, продолжительность анализа – 8 мин.

*Методика.* Около 0,05 (точная навеска) порошка помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и обрабатывали смесью ацетонитрил-вода в соотношении (1 : 9), перемешивали в течение 5 минут, доводили объем раствора до метки тем же растворителем. Центрифугировали в течение 10 минут и фильтровали через бумажный фильтр. Полученный фильтрат вводили в колонку хроматографа как анализируемую пробу. Для приготовления элюентов использовали ацетонитрил для хроматографии «Сорт 1» («Криохром», Россия), ТФУК марки «ч.д.а» («ВЕКТРОН») и воду очищенную, полученную на установке для получения воды аналитического качества «УПВА-5».

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Согласно современным рекомендациям ICH и ведущих фармакопей методика количественного определения должна быть валидирована по основным характеристикам, таким как специфичность (specificity), линейность (linearity), правильность, или истинность (accuracy, or trueness), прецизионность (precision) [5,6,7,8].

**Специфичность методики.** При проведении исследования установлено (рис. 1), что время удерживания метилурацила составляет 2,44 мин, метронидазола 4,03 мин, на хроматограмме пики определяемых веществ хорошо разделены между собой, пики примесей из растворителя, вспомогательных веществ и основы лекарственной формы не мешают их определению.



**Рис. 1.** Хроматограмма фильтрата состава «Ремелтоп»,

(1 – метилурацил (2,44 мин), 3 – метронидазол (4,03 мин), 2,4 – вспомогательные вещества (2,82 и 7,10 мин))

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что спектральные отношения анализируемых веществ идентичны соответствующим спектральным отношениям стандарта. Времена удерживания метилурацила и метронидазола не существенно отличается от времени удерживания соответствующих веществ стандарта и не превышают нормы, указанной в технической документации прибора (0,5 %).

Таблица 1

**Времена удерживания и спектральные отношения компонентов состава «Ремелтоп»**

Компоненты	Проба		Стандарт		Стандартное отклонение, %
	Время удерживания, мин	$A_{270} / A_{220}$	Время удерживания, мин	$A_{270} / A_{220}$	

Метилурацил	2,44	0,471	2,42	0,471	0,014
Метронидазол	4,03	1,305	4,09	1,305	0,042

**Пригодность хроматографической системы.** Расчет параметров пригодности хроматографической системы оценивали путем последовательного шестикратного введения растворов анализируемых веществ в хроматограф и регистрации хроматограмм. Полученные результаты позволяют оценить параметры хроматографической системы как удовлетворительные (табл. 2 и 3) и сделать заключение о пригодности используемой хроматографической системы для анализа экспериментального препарата «Ремелтоп».

Таблица 2

### Характеристики пригодности хроматографической системы

Компоненты	Коэффициент асимметрии пика, $T$	Коэффициент разделения пиков, $R_s$	Эффективность хроматографической колонки т.т., $N$
Метилурацил	1,84	2,97	1385
Метронидазол	1,42	3,24	3529
<b>Рекомендуемые значения</b>	$T \leq 2,0$	$R_s > 2,0$	$N \geq 1000$

Таблица 3

### Критерий воспроизводимости площадей пиков

№ п/п	Метилурацил	Метронидазол
1	14131262	7106568
2	14141831	7212533
3	14145876	7188526
4	14124236	7112995
5	14151220	7188456
6	14174663	7214421
Scp	14144848	7170583,5
SD	17601,87	48450,52
RSD $\leq 2,0$ %	0,12	0,68

**Линейность методики** исследовали на 5 уровнях концентрации от теоретического содержания лекарственных веществ в препарате в диапазоне концентраций от 50 до 150 % от номинального значения. Коэффициент корреляции линейного регрессивного графика

составил для метилурацила 0,9991 при  $y=233600x-19,458$  (рис. 2), для метронидазола 0,9993 при  $y=7490576x+0,246$  (рис. 3).

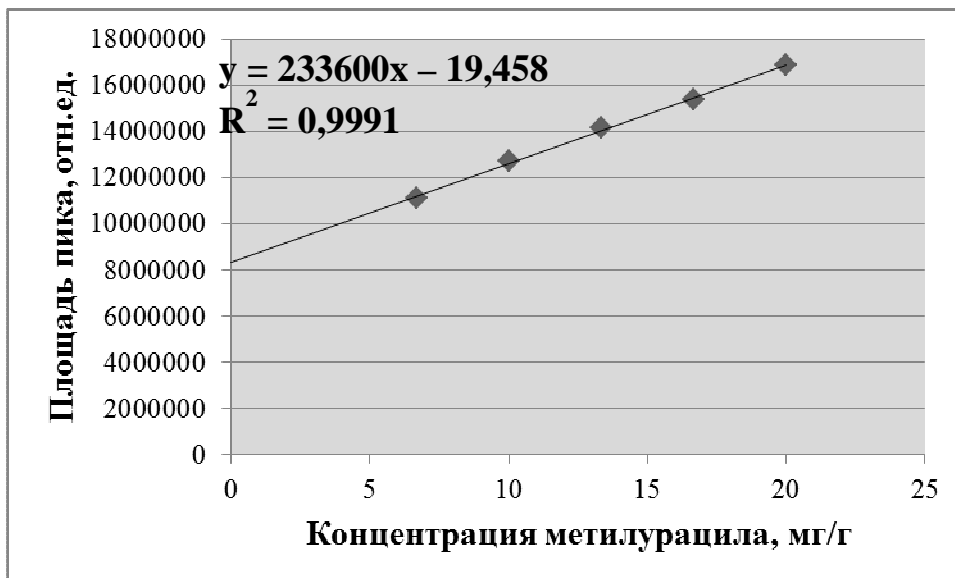


Рис. 2. Линейность методики определения метилурацила

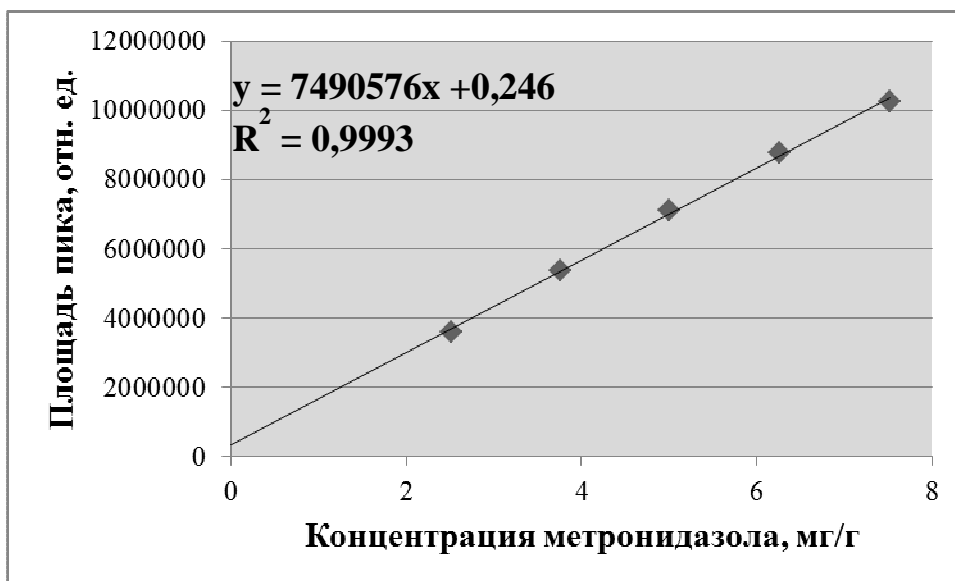


Рис. 3. Линейность методики определения метронидазола

Диапазон экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели, в интервале концентраций от 50 до 150 % можно рассматривать как **аналитическую область методики**.

Параметр «**прецизионность аналитической методики**» включает в себя повторяемость, промежуточную прецизионность и воспроизводимость. При оценке повторяемости методики (табл. 5) установлена величина относительного стандартного отклонения для метилурацила 0,50 %; для метронидазола 1,04 %, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

**Определение повторяемости разработанной методики**

Повторность	Концентрация вещества в 1,0 г порошка для суспензий, мг	
	Метилурацил	Метронидазол
1	265,88	100,81
2	267,74	100,22
3	267,04	98,23
4	266,56	100,88
5	264,20	99,87
6	264,91	99,03
Среднее значение	266,06	99,83
RSD ≤ 2,0%	0,50	1,04

**Оценку правильности методики проводили** по результатам анализа модельных составов экспериментального препарата на четырех уровнях содержания действующих веществ 50, 80, 100 и 120 %. Критерием приемлемости является средний процент восстановления (отклик) при использовании растворов заданных концентраций, скорректированных на 100 %, и его средняя величина должна находиться в пределах 100±5 % (табл. 6).

Таблица 6

**Определение правильности методики**

Метилурацил			Метронидазол		
содержание, мг в 1г порошка		Отклик, %	содержание, мг в 1г порошка		Отклик, %
Ожидаемое	Полученное		Ожидаемое	Полученное	
133,60	130,56	97,73	50,20	49,89	99,39
133,60	130,84	97,94	50,20	50,09	99,77
133,60	132,29	99,02	50,20	50,27	100,14
213,60	213,16	99,79	80,20	80,50	100,37
213,60	213,84	100,11	80,20	80,05	99,81
213,60	213,96	100,17	80,20	80,27	100,09
267,00	265,17	99,31	100,20	100,09	99,89
267,00	265,91	99,59	100,20	100,10	99,90

267,00	267,22	100,08	100,20	100,25	100,05
320,40	320,83	100,13	120,20	120,10	99,91
320,40	321,56	100,36	120,20	120,25	100,04
320,40	320,34	99,98	120,20	120,31	100,09
Среднее значение выхода –					
95,52 %			99,96 %		

Среднее значение выхода составило для метилурацила  $95,52 \pm 0,56$  %, для метронидазола  $99,96 \pm 0,16$  %, и не превысило рекомендуемых значений.

Таким образом, согласно результатам проведенных исследований, разработанная ВЭЖХ-методика качественного и количественного определения метилурацила и метронидазола в составе экспериментального препарата «Ремелтоп» позволяет объективно оценить качество многокомпонентной лекарственной формы. Полученные результаты включены в ФСП и Лабораторный регламент на производство «Ремелтоп», порошок для приготовления суспензии для приема внутрь.

### **Заключение**

Разработанная методика качественного и количественного анализа метилурацила и метронидазола методом ВЭЖХ может быть использована для оценки качества экспериментального препарата «Ремелтоп», порошка для приготовления суспензии для приема внутрь, так как экспериментальным путем установлены параметры линейности ( $R^2=0,9991$  при  $y=233600 \times x - 19,458$ ;  $R^2=0,9993$  при  $y=7490576 \times x + 0,246$ ), диапазона применения (от 50 до 150 %), прецизионности в условиях повторяемости ( $RSD = 0,50$  %; 1,04 %), правильности ( $\bar{Z} = 95,52 \pm 0,56$  %,  $99,96 \pm 0,16$  %) для метилурацила и метронидазола соответственно, которые не превышают рекомендуемых значений.

### **Список литературы**

1. Воробьева В. М. Технология и биофармацевтическая оценка экспериментальных препаратов «Премелтоп» и «Ремелтоп» / В. М. Воробьева, Д. Г. Полухин // Современные проблемы медицины: теория и практика: материалы **международной** заочной научно-практической конференции. (02 июля 2012 г.). – Новосибирск: Изд. «Сибирская ассоциация консультантов», 2012. – С. 49–54.
2. Государственная фармакопея Российской Федерации XII, ч.2 / Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2010 // [farmakopeya12.ru](http://farmakopeya12.ru)

3. Патент РФ № 2286781 Способ лечения химических ожогов пищевода у детей / В. А. Кожевников, В. М. Воробьева, А. К. Смирнов, В. Ф. Турецкова, Д. Г. Полухин (РФ), заявка 2003121575/14 от 11.07.2003 г., патент РФ №2286781, опубликовано 10.11.2006 г., Бюл. № 31. 8 с.
4. Шатц В. Д., Сахартова О. В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. – Рига: Зинанте, 1988. – 390 с.
5. Эпштейн Н. А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38. – № 4. – С. 40–55.
6. European Pharmacopoeia, 7<sup>th</sup> ed. European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe. – Strasburg, France, 2010.
7. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Q2A «Text on Validation of Analytical Procedures». – ICH, Geneva, 1995.
8. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Q2B «Validation of Analytical Procedures: Methodology». – ICH, Geneva, 1997.

**Рецензенты:**

Федосеева Людмила Михайловна, доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической химии с курсом органической и токсикологической химии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул.

Лампатов Вячеслав Витальевич, доктор биологических наук, профессор кафедры фармакологии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул.