

УДК 543.062:615.11:615.322

С.А.Шкляєв*, Ю.В.Підпружников

*Товариство з обмеженою відповідальністю «АСТРАФАРМ»
Національний фармацевтичний університет

ВЕРИФІКАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГІНКГОФЛАВОНОГЛІКОЗИДІВ В ЛІКАРСЬКОМУ ЗАСОБІ, ЩО МІСТИТЬ ЕКСТРАКТ ГІНКГО БІЛОБА

Проведена верифікація методики кількісного визначення гінкгофлавоноглікозидів в лікарському засобі, що містить екстракт Гінкго Білоба. Вивчені валідаційні характеристики вказаної методики у відповідності до вимог Державної фармакопеї України та доказана придатність її до визначення гінкгофлавоноглікозидів як в готовому лікарському засобі, так і в проміжних продуктах в процесі виробництва. Досліджена методика придатна для аналітичного супроводу валідації технологічного процесу виробництва готових лікарських засобів.

Ключові слова: високоефективна рідинна хроматографія, гінкгофлавоноглікозиди, верифікація, валідація.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Згідно з вимогами GMP, виробники повинні визначити, яка робота з валідації необхідна для підтвердження контролю критичних аспектів конкретних операцій, що проводяться ними. Значні зміни, що вносяться в технічні засоби, обладнання та процеси, які можуть вплинути на якість продукції, мають пройти валідацію [1]. Контроль проміжних продуктів повинен здійснюватися з використанням валідованих аналітичних методик, які забезпечують отримання правильних результатів з необхідною точністю.

Впевненість в результатах визначення стає актуальною та визначає необхідність в проведенні валідаційних досліджень.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Листя Гінкго описані в ДФУ, Британській та Європейській фармакопеях [2-4]. Екстракт Гінкго Білоба [5] входить до складу лікарського засобу «ГІНКГО БІЛОБА – АСТРАФАРМ, капсули по 40 мг» [6]. Основними діючими речовинами, що мають фармакологічну дію та визначаються нормативною документацією, є гінкгофлавоноглікозиди. Метод визначення вказаних речовин – високоефективна рідинна хроматографія з використанням маркерів: кверцетину, кемпферолу

та ізорамнетину. Слід зауважити, що два останні маркери ідентифікуються на хроматограмі за відносними часами утримування, що підвищує вимоги до відтворюваності умов, які наведені у нормативній документації.

Методика кількісного визначення гінкгофлавоноглікозидів, яка введена до аналітичної нормативної документації [6] на готовий лікарський засіб (ГЛЗ), відповідає умовам фармакопей [2-5].

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою нашої роботи була верифікація методики кількісного визначення за вимогами ДФУ [7] з метою використання її для валідації технологічного процесу виробництва ГЛЗ «ГІНКГО БІЛОБА – АСТРАФАРМ, капсули по 40 мг». У зв'язку з тим, що склад ГЛЗ відрізняється від того, що описаний в фармакопеях, обсяг робіт з верифікації має дорівнювати обсягу валідаційних робіт.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження був лікарський засіб: «ГІНКГО БІЛОБА – АСТРАФАРМ, капсули по 40 мг» серії 040509, який містить вказану кількість екстракту сухого Гінкго Білоба із вмістом гінкгофлавоноглікозидів не менше 8,64 мг та допоміжні речовини: лактози моногідрат і магнію стеарат. В якості стандартного зразка вико-

© С.А.Шкляєв, Ю.В.Підпружников, 2012

ристовувався кверцетин ф. Sigma ($P \geq 97\%$; Pcode 100962132; CAS 482-36-0).

Аналітичні дослідження проводили, згідно нормативної документації на ГЛЗ [6], методом високоефективної рідинної хроматографії на рідинному хроматографі Bischoff виробництва Німеччини в наступних умовах (в дужках наведені умови фармакопей [2-5] на листя та екстракт Гінкго): колонка ZORBAX Eclipse Plus C18, розміром 150×2,1 мм (125×4 мм) з передколункою 12,5×2,1 мм, розмір часток сорбенту 5 мкм; рухома фаза А: 0,3 г/л розчин орто-фосфорної кислоти та рухома фаза Б: метанол; градієнт рухомої фази наведений в табл. 1; швидкість рухомої фази 0,5 мл/хв. (1 мл/хв.); довжина хвилі детектування 254 нм (370 нм); температура колонки 35°C (25°C).

Таблиця 1

ГРАДІЄНТ РУХОМОЇ ФАЗИ

Час, хв.	Рухома фаза А, %	Рухома фаза Б, %
0-1	60	40
1-20	60→35 (45)	40→65 (55)
20-30 (20-21)	35 (45→0)	65 (55→100)
30-40 (21-25)	10 (0)	90 (100)

Верифікація аналітичної методики

Нормативною документацією визначені вимоги до тесту «Придатність хроматографічної системи»: коефіцієнт розділення для піків кемпферолу та ізорамнетину (відносні часи утримування за кверцетином становлять близько 1,4 та близько 1,5, відповідно) повинен бути не менше 1,5. Хроматограма випробуваного розчину наведе-

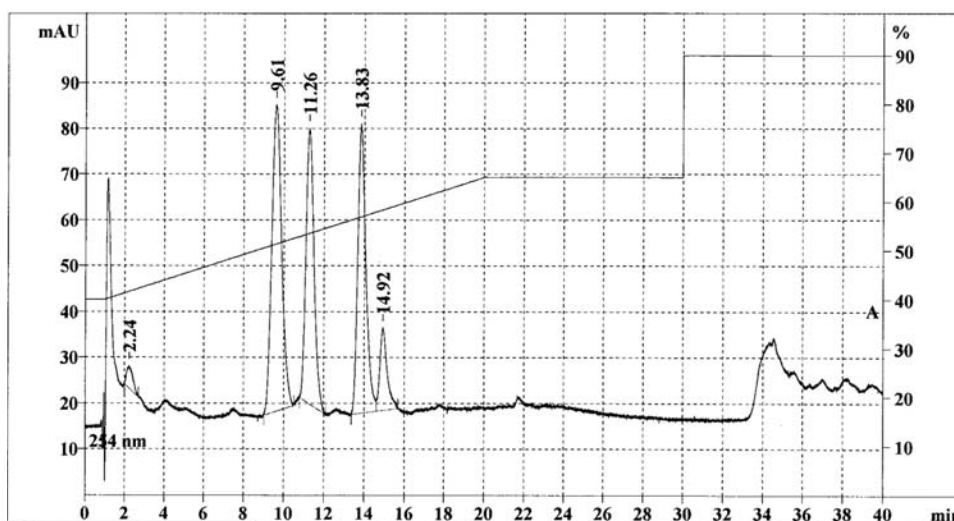


Рис. 1. Типова хроматограма випробуваного розчину.

Піки: кверцетин – 9,61 хв., кемпферол – 13,83 хв., ізорамнетин – 14,92 хв.

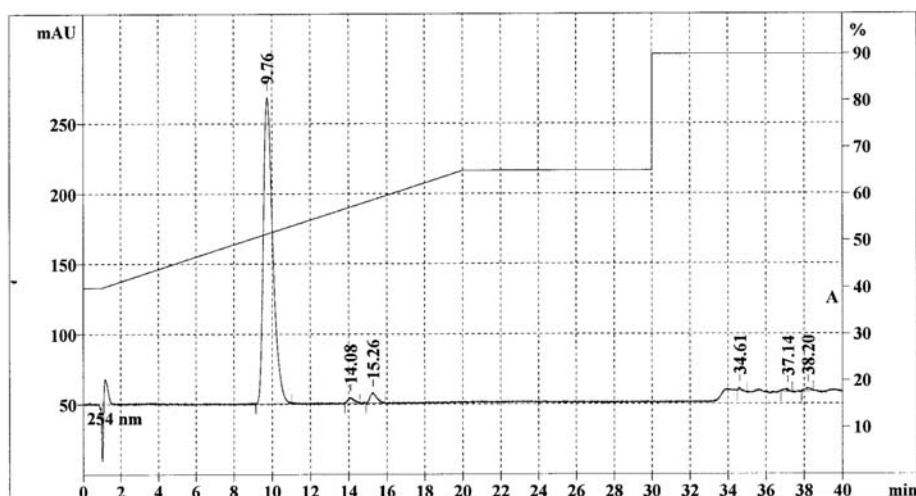


Рис. 2. Типова хроматограма стандартного розчину.

Пік кверцетину – 9,76 хв.

дена на рис. 1. Валідаційні характеристики методики досліджували на стандартному розчині кверцетину та його модельних розчинах. Хромотограма стандартного розчину кверцетину наведена на рис. 2.

На підставі отриманих хроматограм можна зробити висновок про відтворюваність умов хромотографування до вимог фармакопей: відносні часи утримування за кверцетином становлять для кемпферолу 1,43 (близько 1,4) та ізорамнетину 1,55 (близько 1,5); коефіцієнт розділення для піків кемпферолу та ізорамнетину – $1,7 > 1,5$.

Валідація аналітичної методики. Були досліджені наступні валідаційні критерії [7]: повна прогнозована невизначеність методики, специфічність, лінійність, збіжність, правильність, стабільність, внутрішньолабораторна точність. Методологія проведення валідації докладно викладена у [8, 9].

Для проведення валідації готували модельні розчини з концентрацією кверцетину в діапазоні 60 – 140 % від концентрації стандартного розчину (0,15 мг/мл в 96 % спирті).

Повна прогнозована невизначеність методики.

Виходячи з методики приготування розчинів для проведення тесту «Кількісне визначення» [6], повна прогнозована невизначеність методики становить $1,33 < 1,6$, що відповідає вимогам $\pm 5\%$ для кількісного вмісту діючої речовини (речовин).

Специфічність, правильність, збіжність. Специфічність підтверджується виконанням вимог до верифікації методики, піки речовин, що використовуються для розрахунків, відокремлені один від одного. В табл. 2 наведено результати визначення валідаційних критеріїв, правильність та збіжність.

З табл. 2 можна бачити виконання критеріїв правильності та збіжності відповідно до вимог ДФУ.

Лінійність. На підставі даних табл. 2 була побудована калібрувальна пряма, яка відображена на рис. 3.

В табл. 3 наведено визначення валідаційного критерію лінійності.

З таблиці 3 можна бачити відповідність критерію лінійності вимогам ДФУ.

Внутрішньолабораторна точність. На підставі визначення гінкгофлавоноглікозидів в зразках в 3 різні дні різними хіміками встановлена відсутність впливу випадкових факторів при відтворюванні методики в лабораторії: отримано значення критерію прийнятності $DZ_{intra} = 1,23 < \max D_{As} = 1,6$.

Стабільність розчинів. Визначали протягом 24 годин. У визначений термін встановлена

стабільність випробуваних та стандартних розчинів та їх придатність для проведення хромотографування: отримане значення критерію прийнятності $0,498 < \max d = 0,512$.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ РОЗВІДОК

1. Проведено верифікацію методики кількісного визначення гінкгофлавоноглікозидів у лікарському засобі «ГІНКГО БІЛОБА – АСТРА-ФАРМ, капсули по 40 мг» згідно вимог ДФУ.

2. Досліджені валідаційні характеристики вказаної методики та доведена придатність її для визначення гінкгофлавоноглікозидів у готовому лікарському засобі та проміжних продуктах в процесі виробництва.

3. Досліджена методика придатна для аналітичного супроводу валідації технологічного процесу виробництва готових лікарських засобів.

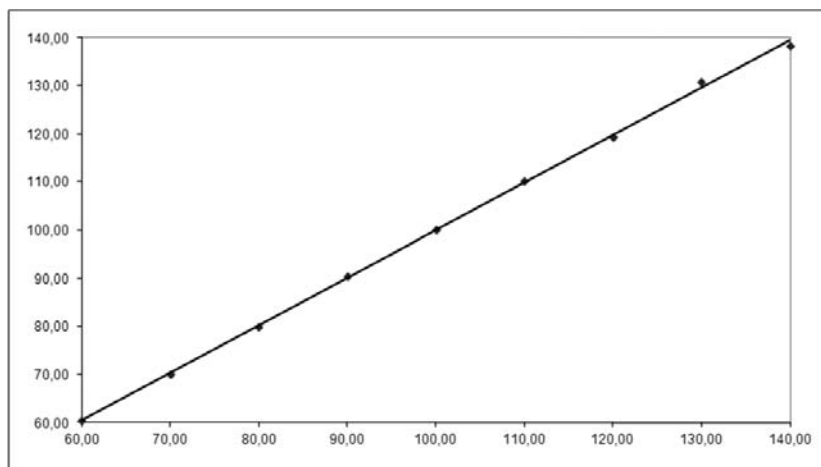
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2011. Лікарські засоби. Належна виробнича практика.
2. Листя Гінкго // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., Доповнення 2. — Х.: 2008. – С. 408-409.
3. British Pharmacopoeia, – 2008, – Р. 994-995.
4. European Pharmacopoeia, Monograph 1828.
5. European Pharmacopoeia, Monograph 1827.
6. Аналітична нормативна документація до Реєстраційного посвідчення № UA/6359/01/01 Наказ МОЗУ № 200 від 20.04.07 на ЛЗ «ГІНКГО БІЛОБА – АСТРАФАРМ, капсули по 40 мг № 10×3, 10×6 в контурній чарунковій упаковці».
7. Валідація аналітичних методик і випробувань // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – С. 58-67. – Доповнення 1. – 2004. – С. 2-4.
8. Гризодуб А.И. Валідація спектроскопічних методик кількісного аналізу лікарських засобів в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. – 2002. – № 3 – С. 42-50.
9. Гризодуб А.И. Стандартизованная процедура валідації методик кількісного аналізу лікарських засобів методом стандарта / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпрудников // Фармаком. – 2004. – № 3 – С. 3-17.

Таблиця 2

РЕЗУЛЬТАТИ АНАЛІЗУ МОДЕЛЬНИХ РОЗЧИНІВ І ЇХ СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА

№ модельного розчину	Концентрація модельного розчину, мг/мл	Концентрація в нормалізованих координатах, X_i , %	Середнє значення площ піків	Середнє значення площ піків в нормалізованих координатах, Y_i , %	$Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100\%$
Стандартний розчин	0,150		6998,0042		
1	0,090	60,00	4233,7859	60,50	100,83
2	0,105	70,00	4905,5933	70,10	100,14
3	0,120	80,00	5584,3986	79,80	99,75
4	0,135	90,00	6326,1859	90,40	100,44
5	0,150	100,00	6997,9932	100,00	100,00
6	0,165	110,00	7708,7106	110,16	100,14
7	0,180	120,00	8355,0443	119,39	99,49
8	0,195	130,00	9159,8135	130,89	100,69
9	0,210	140,00	9684,6630	138,39	98,85
Середнє $Z =$			100,04		
Стандартне відхилення $SD_Z =$			0,62		
Довірчий інтервал $= \Delta\% = t(95\%, f) \times SD_Z =$			1,14	$< \max \Delta_{As} = 1,6$	
Перевірка незначущості систематичної похибки					
Систематична похибка $\delta[Z-100] =$			0,04	$< \max \delta = 0,512$	
				$< \max \Delta_{As} = 1,6$	


Рис. 3. Лінійна залежність площ піків від концентрації кверцетину в модельних розчинах в нормалізованих координатах

Таблиця 3

МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛІНІЙНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ

Критичний параметр	Отриманий результат	Максимальне значення
b	0,988	
S_b	0,008	
a	1,1	$< 1,28$
S_a	0,9	
RSD_0	0,62	$\leq 0,85$
r(x)	0,999471	$> 0,999450$
Ліміт кількісного визначення	9,37	

УДК 543.062:615.11:615.322

С.А.Шкляев, Ю.В.Подпрузжников

**ВЕРИФИКАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ГИНКГОФЛАВОНОГЛИКОЗИДОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ,
СОДЕРЖАЩЕМ ЭКСТРАКТ ГИНКГО БИЛОБА**

Проведена верификация методики количественного определения гинкгофлавоногликозидов в лекарственном средстве, содержащем экстракт Гинкго Билоба. Изучены валидационные характеристики указанной методики в соответствии с требованиями ГФУ и доказана пригодность ее для определения гинкгофлавоногликозидов как в готовом лекарственном средстве, так и в промежуточных продуктах в процессе производства. Исследованная методика пригодна для аналитического сопровождения валидации технологического процесса производства готовых лекарственных средств.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, гинкгофлавоногликозиды, верификация, валидация.

UDC 543.062:615.11:615.322

S.A.Shklyayev, U.V.Pidpruzhnikov

**VERIFICATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION
OF GINKGOFLAVONOGLIKOZIDES IN MEDICINES, CONTAINING EXTRACT OF GINKGO BILOBA**

Verification of methods of quantifying ginkgoflavonoglikozides in medicines containing an extract of Ginkgo biloba is done. The validation characteristics of this method in accordance with the requirements of the State pharmacopoeia of Ukraine is studied and approved its suitability for the determination ginkgoflavonoglikozides both in the finished product, and in intermediates in the production process. The investigated method is suitable for analytical support of the validation process of finished pharmaceuticals.

Key words: high performance liquid chromatography, ginkgoflavonoglikozides, verification, validation.

Адреса для листування:

08132, Києво-Святошинський район,
м. Вишневе, вул. Київська 6,
Тел./факс: (044)-239-08-99;
E-mail: mail2serg@gmail.com

Надійшла до редакції:

01.03.2012