

УДК 615.012

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНЪЕКЦИОННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ИЗ РЯДА ПРОИЗВОДНЫХ АДАМАНТАНА МЕТОДОМ ГЖХ

*М.С. Сергеева, Л.Н. Грушевская, Л.М. Гаевая, Н.И. Авдюнина,
М.Е. Дуденкова, Е.Д. Денисенко, С.В. Минаев*

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН

Метод газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) – один из наиболее перспективных методов анализа лекарственных препаратов из ряда производных адамантана, в связи с их достаточно высокой летучестью и устойчивостью к воздействию повышенных температур. Целью настоящего исследования являлась валидация разработанной ранее методики количественного определения гимантана в инъекционном растворе методом газо-жидкостной хроматографии. Определены валидационные характеристики методики: специфичность, линейность, предел обнаружения, предел количественного определения, правильность и сходимости, а также проведен расчет ее полной неопределенности.

Ключевые слова: гимантан, валидация, количественное определение, газо-жидкостная хроматография.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-4(68)-91-96

ASSAY TECHNIQUE VALIDATION OF THE ADAMANTANE DERIVATIVE DRUG IN INJECTION DOSAGE FORM BY GLC

*M.S. Sergeeva, L.N. Grushevskaya, L.M. Gaevaya, N.I. Avdyunina,
M.E. Dudenkova, E.D. Denisenko, S.V. Minaev*

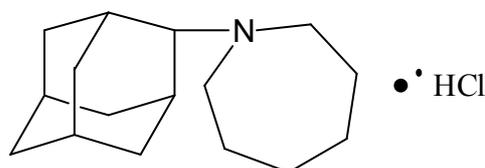
FSBSI «Research Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusov» RAMS

Gas-liquid chromatography (GLC) is one of the most promising methods of adamantane derivatives analysis due to their sufficiently high volatility and resistance to high temperatures. The purpose of this study was validation of a previously developed technique for assay of gimantan injection by gas-liquid chromatography. Defined validation characteristics were specificity, linearity, limit of detection, limit of quantification, accuracy and precision, also the calculation of technique uncertainty was performed.

Key words: gimantan, validation, assay, gas-liquid chromatography.

Гимантан – оригинальный противопаркинсонический препарат из ряда производных адамантана, созданный и фармакологически изученный в ФГБНУ НИИ фармакологии имени В.В. Закусова [1,3]. По химической структуре препарат представляет собой N-(2-адамантил)-гексаметиленimina гидрохлорид (рис. 1) [4].

карственного препарата является разработка методик его фармацевтического анализа и их последующая валидация с целью оценки их соответствия поставленным целям.



$C_{16}H_{27}N \cdot HCl$

l. i. 269,87

Рис. 1. N-(2-адамантил)-гексаметиленimina гидрохлорид

В результате поиска оптимальных лекарственных форм гимантана, проведенного в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, рекомендована к разработке инъекционная лекарственная форма.

Внедрение нового лекарственного средства в медицинскую практику невозможно без его стандартизации. Основопологающим этапом стандартизации ле-

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Валидация разработанной ранее методики количественного определения гимантана в инъекционной лекарственной форме методом ГЖХ.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования использовались серийные образцы субстанции гимантана гидрохлорида, исходные продукты синтеза субстанции – гексаметиленимин и адамантан-2-он, основание гимантана и серийные образцы раствора гимантана для инъекций с концентрацией действующего вещества 25 мг/мл.

Изучение хроматографической подвижности основания гимантана с помощью метода ГЖХ было выполнено на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором (Chrom 5, Чешская Республика).

Хроматографирование проводили в следующих условиях: стеклянная колонка 1,2 м × 3 мм, сорбент Хромосрб WAW (80/100 меш) с нанесенной неподвижной фазой 10 % Apiezon L, 2 % KOH, температура

испарителя – 210 °С, температура термостата – 190 °С, температура детектора – 210 °С, газ-носитель – азот, скорость подачи газа-носителя – 50 мл/мин, скорость водорода – 40 мл/мин, скорость воздуха – 400 мл/мин, объем пробы 1 мкл. Рабочая концентрация испытуемого раствора гимантана 0,1 мг/мл. Для расчета содержания гимантана в пробах применен метод внутреннего стандарта, в качестве которого был использован N-(1-адамантил)ацетамид [6].

Типичная хроматограмма основания гимантана и N-(1-адамантил)ацетамида представлена на рис. 2.

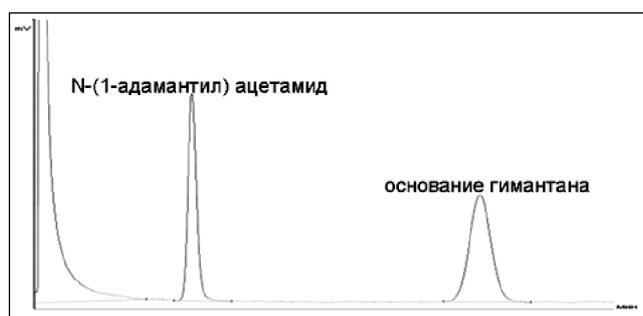


Рис. 2. Типичная хроматограмма основания гимантана и его внутреннего стандарта в концентрации 0,1 мг/мл

Пробоподготовка образцов инъекционного раствора представляла собой двукратную экстракцию основания гимантана эфиром диэтиловым при подщелачивании водной фазы 1М раствором натрия гидроксида.

10 мл объединенного содержимого не менее чем 20 ампул раствора гимантана для инъекций помещали в делительную воронку вместимостью 50 мл, добавляли 10 мл раствора 1М натрия гидроксида, тщательно взбалтывали и оставляли на несколько минут. Экстракцию эфиром диэтиловым проводили следующим образом: добавляли 10 мл экстрагента, тщательно перемешивали и оставляли на 10 минут до расслаивания, добавляли еще 10 мл эфира диэтилового и процедуру повторяли. Затем отбирали 2 мл эфирного экстракта и помещали в мерную колбу на 25 мл, доводили объем раствора до метки спиртом этиловым и перемешивали. Отбирали 10 мл полученного раствора, помещали в мерную колбу на 100 мл, добавляли 10 мл раствора внутреннего стандарта, доводили объем раствора спиртом этиловым до метки и перемешивали (испытуемый раствор с концентрацией гимантана и его внутреннего стандарта по 0,1 мг/мл). Учитывая, что полнота экстракции основания гимантана в выбранных условиях составляет около 90 %, для устранения ошибки определения, связанной с неполным экстрагированием исследуемого вещества, содержание гимантана в инъекционном растворе оценивали относительно раствора рабочего стандартного образца (PCO) гимантана, пробоподготовку которого проводили аналогичным образом.

Валидацию разработанной методики количественного определения гимантана в лекарственной форме проводили по следующим параметрам: специфичность,

предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, правильность, прецизионность и диапазон применения.

Характеристики правильности, прецизионности, линейности и диапазона применения методики исследовались на пяти модельных растворах гимантана с концентрациями 80, 90, 100, 110, 120 % от содержания гимантана по отношению к номинальному значению ($X_{\text{факт}} \%$). Для каждого из пяти модельных растворов проводили экстракцию, описанным выше способом, далее отбирали по три аликвоты экстракта, получая по три испытуемых раствора на каждую точку диапазона концентраций. Оценку содержания гимантана проводили относительно раствора PCO гимантана.

Хроматографировали испытуемые растворы и раствор PCO гимантана, получая не менее 5 хроматограмм каждого из растворов.

Рассчитывали средние значения содержания гимантана в процентах к концентрации раствора сравнения (Y_i) и величину Z_i , представляющую собой найденную концентрацию в процентах к введенной.

Оценку отдельных валидационных характеристик проводили по ряду расчетных критериев согласно требованиям «Руководства по валидации методик анализа лекарственных средств» и рекомендациям авторов статьи «Стандартизованная процедура валидации методики количественного анализа лекарственных средств методом стандарта» [2, 5].

Расчеты параметров линейной зависимости b , S_b , a , S_a и RSD_0 (относительное остаточное стандартное отклонение) проводили методом наименьших квадратов. Прямую ($y = bx + a$) строили в нормализованных координатах (X_i и Y_i).

Для оценки линейности методики использовали следующие критерии:

1) требования статистической и практической незначимости к свободному члену прямой (a).

Так, величина свободного члена должна быть меньше доверительного интервала своей неопределенности (т.е. статистически неотличима от нуля):

$$|a| \leq \Delta_A = t(95\%, n-2) \cdot s_a = 1.895 \cdot s_a,$$

где S_a – стандартное отклонение свободного члена на прямой, найденное методом наименьших квадратов.

Вклад свободного члена в неопределенность результата анализа должен быть незначимым в сравнении с максимально допустимой неопределенностью (практическая незначимость):

$$|a| \leq \frac{0.32 \cdot \Delta_{As} (\%) }{1 - (80/100)}, |a| \leq 3.8$$

2) требование к остаточному стандартному отклонению (RSD_0).

Доверительный интервал разброса точек вокруг прямой равный произведению остаточного стандартного отклонения (RSD_0) на коэффициент Стьюдента (число степеней свободы точек прямой равняется

$f = 5 - 2 = 3$) не должен превышать максимально допустимую неопределенность методики анализа:

$$RSD_0 / b \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%, 3)} = \frac{2.4}{3.182} = 0.754\%,$$

где b – угол наклона для рассчитанной регрессионной прямой.

3) требование к коэффициенту корреляции (r).

Диапазон исследуемых концентраций характеризуется стандартным отклонением (RSD_{range}), рассчитанным по формуле:

$$RSD_{range} = \sqrt{\frac{\sum (C_i - C_{cp})^2}{C_{cp}^2 \cdot (g - 1)}} \cdot 100\%,$$

где C_i – концентрация i -го раствора;

C_{cp} – средняя концентрация растворов;

g – число выборок (число точек прямой).

Величина RSD_{range} для 5 исследуемых точек составляла 15,81. Коэффициент корреляции рассчитывали по формуле:

$$r = \sqrt{1 - \left(\frac{RSD_0}{RSD_{range}} \right)^2}$$

Рассчитанный коэффициент корреляции не должен быть менее следующего критического (минимального) значения:

$$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{\Delta_{As} / t(95\%, g - 2)}{RSD_{range}} \right)^2} = 0,9988$$

Прогноз полной неопределенности методики включал в себя неопределенность пробоподготовки (Δ_{SP}) и неопределенность конечной аналитической операции (Δ_{FAO}).

Неопределенность конечной аналитической операции рассчитывали по следующей формуле:

$$\Delta_{FAO} = \frac{\sqrt{2} \times (RSD_A \times 1.645)}{\sqrt{5}},$$

где $RSD_A = 1,36\%$ – предельное относительное стандартное отклонение соотношения площадей пиков основания гимантана к внутреннему стандарту для пяти параллельных измерений;

1,645 – коэффициент Гаусса для односторонней вероятности 95 %;

$\sqrt{2}$ – коэффициент, обусловленный получением данных путем сравнения площадей пиков, полученных при хроматографировании испытуемого раствора и раствора РСО гимантана;

$\sqrt{5}$ – коэффициент, обусловленный проведением пяти параллельных хроматографирований пробы.

Неопределенность пробоподготовки рассчитывали по формуле:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{\sum_i^n \Delta^2 V_i},$$

где ΔV_i – составляющая неопределенности, связанная с конкретной операцией пробоподготов-

ки (взятие навески, аликвоты и др.) и рассчитанная с применением предельных неопределенностей взвешивания и мерной посуды, приведенных в «Руководстве по валидации методик анализа лекарственных средств» [5].

Максимально допустимую полную неопределенность результатов анализа (Δ_{max-As}), рассчитывали исходя из допуска содержания действующего вещества в препарате ($B, \%$), что, согласно ГФ XI, составляет $\pm 7,5\%$, соответственно $\Delta_{max-As} = 0,32 \times B = 0,32 \times 7,5 = 2,4$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В выбранных условиях анализа время удерживания технологической примеси адамантан-2-она составляет около 1 мин, время удерживания внутреннего стандарта N-(1-адамантил)ацетамида – около 5 мин, пика технологической примеси гексаметиленмина на хроматограмме при выбранной температуре колонки не наблюдается в течение 45 мин анализа, что может быть объяснено выходом вещества вместе с растворителем. Таким образом, учитывая, что время выхода основного действующего вещества составляет в выбранных условиях 12 мин, методику можно охарактеризовать как специфичную.

Пределы обнаружения и количественного определения были установлены экспериментально по соотношению сигнал/шум и составляли 0,001 мкг и 0,002 мкг для N-(1-адамантил)ацетамида, и 0,0005 мкг и 0,001 мкг для основания гимантана соответственно.

Требования к параметрам линейной зависимости выполняются в диапазоне концентраций от 80 до 120 % от номинального содержания гимантана в препарате (табл. 1). График линейной зависимости в нормализованных координатах представлен на рис. 3.

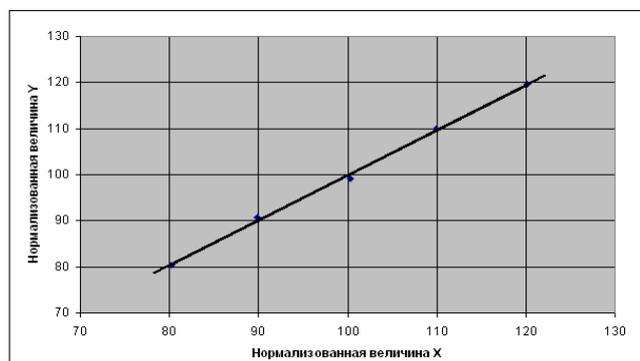


Рис. 3. Линейная зависимость площади пика от концентрации модельных растворов гимантана в нормализованных координатах

Результаты определения правильности и прецизионности методики количественного определения гимантана на модельных смесях представлены в табл. 2.

Таблица 1

Метрологические характеристики линейной зависимости

$y = 0,9766x + 2,2385$			
Параметр	Значение	Критерии ($B \pm 7,5\%$, диапазон 80 -120 %, $n = 5$)	Вывод
b	0,9766	-	-
Sb	0,0243	-	-
a	2,2385	1) $\leq 7,7$ (статистическая незначимость) 2) $\leq 3,8$ (практическая незначимость)	выполняется по обоим критериям
Sa	2,4136	-	-
RSD ₀	0,754	-	-
RSD ₀ /b	0,751	$\leq 0,754$	соответствует
r	0,9988	$\geq 0,9988$	соответствует

Таблица 2

Результаты анализа модельных растворов гимантана и их статистическая обработка

Навески гимантана, г	Введено гимантана в % от номинального (X_i факт, %)	Найдено гимантана в % к концентрации раствора сравнения (Y_i , %)		Относительная ошибка определения, %	Найдено гимантана в % к введенному $Z_i = 100 \times (Y_i/X_i)$, %
0,5013	80,2	81,0	80,4	1,0	101,00
		80,4		0,25	100,25
		79,9		0,37	99,63
0,5621	89,9	91,3	90,8	1,56	101,56
		90,2		0,33	100,33
		90,8		1,00	101,00
0,6262	100,2	99,3	99,1	0,90	99,10
		98,9		1,30	98,70
		91,1		1,11	98,89
0,6874	109,9	110,5	109,9	0,55	100,55
		110,1		0,18	100,18
		109,2		0,64	99,36
0,7507	120,1	120,3	119,6	0,17	100,17
		118,9		1,00	99,00
		119,7		0,33	99,67
Среднее Z_{cp} , %					99,96
Относительное стандартное отклонение S_z , %					0,86
Доверительный интервал $\Delta_z = t(95\%, 14) \times S_z = 2,145 \times 0,86$					1,84
Критическое значение для сходимости результатов Δ_{As} , %					2,4
Критерий прецизионности $\Delta_z = t(95\%, 14) \times S_z$, % $\leq \Delta_{As}$					Выполняется
Систематическая погрешность $\delta\% = Z-100 $					0,04
Критерий незначимости систематической погрешности: $\delta\% \leq \Delta_z / \sqrt{n} = 1,84 / 3,87 = 0,48$ 2) $\delta\% \leq 0,75 (0,1 * B)$					0,04 \leq 0,48 (выполняется) Выполняется

Из данных, приведенных в таблице, следует, что методика характеризуется достаточной правильностью и прецизионностью во всем диапазоне концентраций (от 80 % до 120 %): доверительный интервал (Δ_z) не превышает максимально допустимую неопределенность результатов анализа (Δ_{As}), выполняются критерии статистической и практической незначи-

мости систематической погрешности ($\delta\%$) разработанной методики.

Прогнозируемая полная неопределенность методики, вычисленная как сумма неопределенности подготовки проб и неопределенности конечной аналитической операции, не превышает критического значения 2,4 % (табл. 3), то есть будет давать корректные результаты и в других лабораториях.

Расчет полной неопределенности методики количественного определения гимантана в инъекционном растворе методом ГЖХ, %

Расчет неопределенности пробоподготовки	
операция пробоподготовки	неопределенность
Раствор РСО гимантана	
1. Взятие навески РСО гимантана (0,625 г)	$0,2/625 \times 100\% = 0,032$ (0,2 мг погрешность взвешивания)
2. Доведение до объема в мерной колбе вместимостью 25 мл	0,23
3. Отбор аликвоты пипеткой 10 мл	0,5
4. Двукратное добавление экстрагента пипеткой 10 мл	0,5 и 0,5
5. Отбор аликвоты экстракта пипеткой 2 мл	0,5
6. Доведение до объема в мерной колбе вместимостью 25 мл	0,23
7. Отбор аликвоты пипеткой 10 мл	0,5
8. Отбор аликвоты раствора внутреннего стандарта 10 мл	0,5
9. Доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	0,12
Испытуемый раствор гимантана	
1. Отбор аликвоты пипеткой 10 мл	0,5
2. Двукратное добавление экстрагента пипеткой 10 мл	0,5 и 0,5
3. Отбор аликвоты экстракта пипеткой 2 мл	0,5
4. Доведение до объема в мерной колбе вместимостью 25 мл	0,23
5. Отбор аликвоты пипеткой 10 мл	0,5
6. Отбор аликвоты раствора внутреннего стандарта 10 мл	0,5
7. Доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	0,12
Раствор внутреннего стандарта	
1. Взятие навески внутреннего стандарта (0,1 г)	$0,2/100 \times 100\% = 0,2$
2. Доведение до объема в мерной колбе вместимостью 100 мл	0,12
$\Delta_{sp} = \sqrt{(0,032^2 + 0,23^2 + 0,5^2 + 0,5^2 + 0,5^2 + 0,5^2 + 0,23^2 + 0,5^2 + 0,5^2 + 0,12^2 + 0,5^2 + 0,5^2 + 0,5^2 + 0,5^2 + 0,23^2 + 0,5^2 + 0,5^2 + 0,12^2 + 0,2^2 + 0,12^2)} = \sqrt{3,2} = 1,79$	
Расчет неопределенности конечной аналитической операции	
$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \times (RSD_A \times 1,645 / \sqrt{5}) = \sqrt{2} \times (1,36 \times 1,645 / \sqrt{5}) = 1,41$	
Расчет полной неопределенности методики	
$\Delta_{As} = \sqrt{(\Delta_{sp})^2 + (\Delta_{FAO})^2} = \sqrt{(1,41^2 + 1,79^2)} = 2,28$	
$\Delta_{As} \leq \max \Delta_{As} \quad 2,28 \leq 2,4$	

ЛИТЕРАТУРА

1. Абаимов Д.А., Зимин И.А., Кудрин В.С. и др. Влияние противопаркинсонического препарата гимантана на содержание и метаболизм нейромедиаторных моноаминов в структурах головного мозга мышей линии C57BL/6 // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – № 1. – С. 64–67.
2. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Подпрудников Ю.В. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 3–17.
3. Капица И.Г., Кокшенев И.И., Вальдман Е.А., Воронина Т.А. Изучение эффектов инъекционной формы гимантана на экспериментальных моделях паркинсонического синдрома // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2012. – № 2. – С. 10–16.
4. Патент № 1825499 АЗ РФ / Гидрохлорид N-(2-адамантил)гексаметиленимина, обладающий антикаталептической активностью / Середенин С.Б., Воронина Т.А., Авдюнина Н.И. и др. / Бюл. изобр. № 24. – 1993.
5. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств (методические рекомендации) / Под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В. Бурдейна и др. – М.: Ассоциация российских фармацевтических производителей, 2007. – 48 с.

6. Сергеева М.С., Грушевская Л.Н., Пятин Б.М., Авдюнина Н.И., Гаевая Л.М., Клумова В.С., Дуденкова М.Е., Алексеев К.В. Фармацевтический анализ и стандартизация инъекционной лекарственной формы гимантана // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45 № 8. – С. 49–52.

REFERENCES

1. Abaimov D.A., Zimin A.I., Kudrin V.S., et al. Vliyanie protivoparkinsonicheskogo preparata gimantana na sodержanie i metabolizm nejromediatornykh monoaminov v strukturah golovnogo mozga myshej linii S57BL/6 [Effect of antiparkinsonian drug gimitan on the content and metabolism of neurotransmitter monoamines in brain structures of line C57BL/6 mice]. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Experimental and clinical pharmacology], 2009, no. 1, pp. 64–67. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Grizodub, A.I., Leontiev D.A., Denisenko N.V., Podpruzhnikov Y.V. Standartizovannaya procedura validacii metodik kolichestvennogo analiza lekarstvennykh sredstv metodom standart [Standardized procedure for assay technique validation of medicinal products by the method of standard]. *Farmakom* [Pharmakom], 2004, no. 3, pp. 3–17. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Kapitsa I.G., Kokshenev I.I., Valdman E.A., Voronina T.A. Izucheniye ehffektov in'ekcionnoj formy gimantana na ehksperimental'nyh modelyah parkinsonicheskogo sindroma [Study of the effects of gimantan injection dosage form in experimental models of Parkinsonian syndrome]. *Farmakokinetika i farmakodinamika* [Pharmacokinetics and pharmacodynamics], 2012, no. 2, pp. 10–16. (In Russ.; abstr. in Engl.).

4. Patent № 1825499 A3 RF. Gidrohlorid N-(2-adamantil)geksametilenimina, obladayushchij antikatalepticheskoy aktivnost'yu [Patent No. 1825499 A3 RF. Hydrochloride N-(2-adamantyl)hexamethylenimine with anticataleptic activity]. Seredenin S.B., Voronina, T.A., Avdunina N.I. et al. 1993, Bull., no. 24.

5. Rukovodstvo po validacii metodik analiza lekarstvennyh sredstv (metodicheskie rekomendacii) [Guidance for validation of medical products methods of analysis]. In N.V. Urgel, A.L. Mladentsev, A.V. Burdein (ed.). Moscow: Association of Russian pharmaceutical manufacturers, 2007. 48 p.

6. Sergeeva M.S., Grushevskaya L.N., Pyatin B.M., Avdunina N.I., Gaevaya L.M., Klumova V.S., Dudenkova M.E., Alekseev K.V. Farmaceuticheskij analiz i standartizaciya in'ekcionnoj lekarstvennoj formy gimantana [Pharmaceutical analysis and standardization of gimantan injection dosage form]. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal* [Chemical-pharmaceutical journal], 2011, Vol. 45, no. 8, pp. 49–52. (In Russ.; abstr. in Engl.).

Контактная информация

Сергеева Мария Сергеевна – к. ф. н., старший научный сотрудник опытно-технологического отдела ФГБНУ НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, e-mail: otopharm@mail.ru