

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИМЕТАЗИДИНА ДИГИДРОХЛОРИДА В ТАБЛЕТКАХ ПО 0,02 г

Е. В. Компанцева, Г. А. Мартиросова, М. Г. Цыбулина

Пятигорская государственная фармацевтическая академия

В Пятигорской государственной фармацевтической академии предложена новая технология таблеток триметазидина дигидрохлорида и разработана соответствующая ФСП. Цель нашей работы заключается в оценке адекватности аналитических методов, которые были использованы при разработке методик количественного определения триметазидина дигидрохлорида в таблетках, покрытых оболочкой. При обсуждении разработанных методик нами была проведена их валидация в соответствии со следующими параметрами: специфичность, точность (правильность), воспроизводимость, линейная зависимость, аналитическая область методики и пригодность системы. Количественный анализ проводили методами ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии. При помощи процедуры валидации установлено, что методики количественного определения триметазидина дигидрохлорида, предлагаемые проектом ФСП, являются правильными, точными, специфичными и в обоих методиках наблюдается линейная зависимость в аналитической области. По воспроизводимости метод ВЭЖХ существенно превосходит метод УФ-спектрофотометрии.

ВВЕДЕНИЕ

Триметазидина дигидрохлорид нашел широкое применение в качестве антиангинального средства в комплексной терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы и при нарушениях мозгового кровообращения и выпускается в виде таблеток «Предуктал», «Вастарел», «Веро-триметазидин» и др. [1]. В Пятигорской государственной фармацевтической академии предложена новая технология таблеток триметазидина дигидрохлорида и разрабатывается соответствующая ФСП.

При сравнительном анализе методик количественного определения триметазидина дигидрохлорида, описанных в НД на таблетки «Предуктал» (НД 42-2855-00 «Лаборатория Сервье» Франция) и на таблетки «Веро-триметазидин» (НД 42-10947-00 ЗАО «Верофарм» Россия), были выявлены различия в условиях их проведения. Во всех методиках используется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с применением в качестве подвижной фазы смеси из гептансульфоната натрия, воды, спирта метилового и ацетонитрила (Франция); или смеси из гептансульфоната натрия, ацетонитрила, триэтиламина и 25 % раствора кислоты ортофосфорной (Россия). Дополнительно в качестве альтернативного метода отечественной НД предлагается УФ-спектрофотометрия с использованием спирта метилового в качестве растворителя (НД 42-10947-00 ЗАО «Верофарм» Россия).

В отличие от вышеперечисленных методик нами предлагается метод ВЭЖХ с использованием

подвижной фазы: 0,1 % раствор кислоты трифторуксусной и ацетонитрил и метод УФ-спектрофотометрии с применением в качестве растворителя 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной.

Цель работы заключается в оценке адекватности аналитических методов, которые были использованы при разработке методик количественного определения триметазидина дигидрохлорида в таблетках, покрытых оболочкой.

Нами была проведена валидация разработанных методик с помощью следующих параметров: специфичность, точность (правильность), воспроизводимость, линейная зависимость, аналитическая область методики, пригодность системы.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

При использовании метода УФ-спектрофотометрии 5 таблеток лекарственного препарата (n) помещали в мерную колбу вместимостью 200 мл с 100 мл 0,1 М раствора кислоты хлороводородной и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин. Затем доводили 0,1 М раствором кислоты хлороводородной до метки, перемешивали и фильтровали через фильтр типа «синяя лента», отбрасывая первую порцию фильтрата (раствор А). 2 мл раствора А разводили до 50 мл этим же растворителем и полученный раствор измеряли на спектрофотометре ЛОМО СФ-56 при длине волны 230 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм ($A_{исп}$). В качестве раствора сравнения использовали этот же растворитель.

Содержание триметазида дигидрохлорида в одной таблетке в г (X) при использовании УФ-спектрофотометрии вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_{исп} \cdot a_{см} \cdot 2}{A_{см} \cdot n}$$

При количественном анализе методом ВЭЖХ в работе использовали микроколоночный жидкостный хроматограф «Милихром А-02» (г. Новосибирск, Россия). Колонка длиной 75 мм заполнена сорбентом Силасорб S_{18} (размер зерен которого 5 мкм в диаметре), температура термостата колонки-35 °С; подвижная фаза состоит из элюента А — 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты и элюента Б — ацетонитрила. Скорость потока составляет 100 мкл/мин, объем вводимой пробы 10 мкл. Детектирование: в УФ-свете при длине волны 230 нм (максимум светопоглощения триметазида); время записи хроматограммы 12 минут. Хроматографирование производили с использованием градиента от 10 % до 70% элюента Б за 12 мин.

Испытуемый раствор готовили из 5 таблеток лекарственного препарата (n), помещенных в мерную колбу вместимостью 25 мл с 15 мл воды. Его встряхивали 2—3 мин, затем обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин, доводили водой до метки, перемешивали и фильтровали через фильтр типа «синяя лента» (раствор А). 10 мл раствора А разводили водой до 100 мл (раствор В) и хроматографировали ($S_{исп}$).

Содержание триметазида дигидрохлорида в одной таблетке в г (X) при использовании ВЭЖХ вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S_{исп} \cdot a_{см}}{S_{см} \cdot n}$$

Раствор рабочего стандартного образца готовили в концентрации 0,02 мг/мл (для УФ спектрофотометрии; $A_{ст}$, $a_{ст}$) и 0,4 мг/мл (для ВЭЖХ; $S_{ст}$, $a_{ст}$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При определении специфичности методом УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ разработанных методик были проведены исследования по изучению влияния вспомогательных веществ таблетированной лекарственной формы триметазида дигидрохлорида (таблетки по 0,02 г, покрытые оболочкой). Этими методами установлено, что вспомогательные вещества (лудипресс, колликут, кальций стеариновоксильный и др.) не мешают определению триметазида дигидрохлорида в таблетках [2—4].

Оптимальность разработанной нами методики высокоэффективной жидкостной хроматографии

подтверждали критерием пригодности системы [2, 3]. Было установлено, что пик триметазида дигидрохлорида хорошо отделяется от пика продукта деструкции (рис. 1) и коэффициент разделения пиков (R_s) составляет 4,4 (что соответствует требованиям фармакопеи Британии и другим НД) [5, 9, 10].

Нормативы [5, 9] для данных параметров были установлены в следующих пределах: эффективность не менее 2000 теоретических тарелок, коэффициент асимметрии пика не более 2,0, коэффициент разделения пиков не менее 2,5, что соответствует требованиям Европейской фармакопеи [5].

Правильность методик определяли на лабораторном образце (модельная смесь) таблеток, приготовленных с количественной точностью из всех компонентов лекарственного препарата.

В соответствии с общими требованиями статей фармакопей Британии, Европы и США [5, 9, 10] по валидации фармакопейных методов был построен трехуровневый эксперимент по 3 опыта на каждом уровне. Предварительно выбрали диапазон измерения, исходя из возможного варьирования количества исследуемого вещества в таблетках — $0,02 \pm 0,002$ г триметазида дигидрохлорида. Таким образом, верхнему уровню соответствует навеска 0,022 г, среднему — 0,020 г, нижнему — 0,0180 г. С целью получения метрологических характеристик методик [6—9] была проведена совместная статистическая обработка результатов количественного определения триметазида дигидрохлорида в таблетках (табл. 1)

Полученные данные проверены на однородность и установлено, что все они не имеют грубой ошибки: $Q_i < Q(9; 95\%)$, т.е. $Q_i < 0,51$ [7—9].

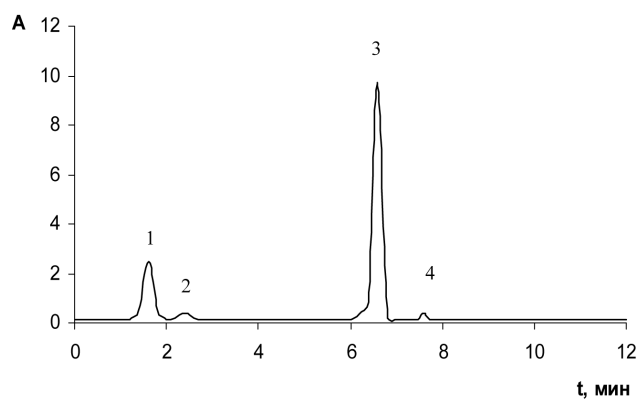


Рис. 1. Хроматограмма проверки пригодности хроматографической системы: 1, 2 — пики реактивов; 3 — пик триметазида дигидрохлорида; 4 — пик продукта деструкции (примеси) триметазида дигидрохлорида

Данные сравнительной метрологической оценки двух методов анализа

Таблица 1

№	Уровень	Триметазидина дигидрохлорид, г		μ	f	$\bar{X}, \%$	S_2	S	$P, \%$	$t_{(P, f)}$ табл.	ΔX	Σ	$t_{\text{выч}}$	$F_{\text{табл}}$	$F_{\text{выч}}$	δ
		Взято	Найдено													
1*	I	0,0188	0,0186	100	8	99,5	0,935	0,966	95	2,31	0,7	0,7	1,55	6,03	12,47	—
			0,0187													
			0,0188													
	II	0,0204	0,0204	100	8	99,9	0,075	0,274	95	2,31	0,31	0,3	1,09	6,03	12,47	—
			0,0201													
			0,0199													
	III	0,0220	0,0217	100	8	99,9	0,075	0,274	95	2,31	0,31	0,3	1,09	6,03	12,47	—
			0,0219													
			0,0217													
2*	I	0,0187	0,0186	100	8	99,9	0,075	0,274	95	2,31	0,31	0,3	1,09	6,03	12,47	—
			0,0187													
			0,0187													
	II	0,0202	0,0202	100	8	99,9	0,075	0,274	95	2,31	0,31	0,3	1,09	6,03	12,47	—
			0,0202													
			0,0202													
	III	0,0220	0,0220	100	8	99,9	0,075	0,274	95	2,31	0,31	0,3	1,09	6,03	12,47	—
			0,0220													
			0,0220													

1* — метод УФ-спектрофотометрии, 2* — метод ВЭЖХ

Для определения воспроизводимости рассчитывали стандартное отклонение S , дисперсию S^2 , определяли границы доверительных интервалов и оценивали сходимость двух параллельных определений. Проведенный расчет для двух крайних вариантов показал, что разность $|X_i - X_n|$ составляет 0,0002 (1 и 2 методики), а величина $L(P, m) \cdot S = 0,0003$. Выполнение неравенства $|X_i - X_n| < L(P, m) \cdot S$ говорит о достаточной точности полученных результатов в обоих случаях. Использование этих методик позволяет достоверно определять содержание триметазида дигидрохлорида в таблетках.

Данные таблицы указывают на то, что значение вычисленного критерия Стьюдента ($t_{\text{выч}}$) для методов 1 и 2 меньше табличного значения 3,50 ($t_{\text{таб}}$, $(P = 99\%, f = 8)$), из этого следует, что гипотеза $|\mu - X| \neq 0$ может быть отвергнута, и позволяет считать результаты выборок свободными от систематической ошибки.

Сравнение значений вычисленных критериев Фишера $F_{\text{выч}}$ с табличными $F(P, f_1, f_2)$, найденными при $P = 99\%$, показало, что различие значений S_1^2 и S_2^2 значимо, так как описывается неравенством $F_{\text{выч}} = 12,47 > F_{\text{табл.}} = 6,03$. Следовательно, оба метода дают воспроизводимые результаты, но воспроизводимость метода ВЭЖХ более высокая. К тому же эта методика имеет меньшую относительную ошибку (табл. 1).

Линейную зависимость методов определяли на 5 образцах модельной смеси таблеток триметазида дигидрохлорида с концентрацией от 0 до 120% по отношению к содержанию, декларированному в готовом лекарственном препарате 0,02 г. Проводили анализ вышеупомянутыми методами.

В обеих методиках коэффициент корреляции ($r_1 = 1, r_2 = 0,9975$) больше табличного ($r_{95\%} = 0,990$), что свидетельствует о наличии линейной зависимости между указанными параметрами. Расчет и статистическая оценка параметров линейной зависимости оптической плотности или площади пика от концентрации триметазида дигидрохлорида показали, что данная зависимость описывается следующими уравнениями:

$$y_1 = 2,36x + 0,002$$

методика УФ-спектрофотометрии,

$$y_1 = 253,16x + 0,089$$

методика ВЭЖХ.

Как показала проверка значимости коэффициентов уравнений с помощью коэффициента Стьюдента, свободные члены в обоих уравнениях

(+0,002 и +0,089) незначимы ($t_{\text{выч}} < t_{\text{табл.}}$) и могут быть исключены из них. Таким образом, прямые, описывающие зависимость между оптической плотностью или площадью пика и концентрацией триметазида дигидрохлорида, для обеих методик проходят через начало координат.

Линейная зависимость для методов УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ находится в пределе концентраций триметазида дигидрохлорида — от 0 кг/мл до 24 мкг/мл и 48 мкг/мл соответственно. Аналитическая область методик соответственно составляет от 18 мкг/мл до 22 мкг/мл (от 36 мкг/мл до 44 мкг/мл) лекарственного вещества в анализируемом растворе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при помощи процедуры валидации установлено, что методики количественного определения триметазида дигидрохлорида, предлагаемые проектом ФСП, являются правильными, точными, специфичными и в обеих методиках наблюдается линейная зависимость в аналитической области.

По воспроизводимости метод ВЭЖХ существенно превосходит метод УФ-спектрофотометрии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машковский М.Д. Лекарственные препараты: В 2 т. — 15-е изд., перераб. и доп. /М.Д. Машковский — М.: Новая волна, 2001. — Т. 1. — С. 386.
2. Совершенствование методики обнаружения и количественного определения триметазида методом ВЭЖХ / Е.В. Компанцева, Г.А. Мартиросова, М.Г. Цыбулина // Межрегион. науч. конф. по разработке, исследованию и маркетингу новой фармацевтической продукции (58; 2003; Пятигорск): Материалы... — Пятигорск. 2003. — С. 214—215.
3. Разработка методики определения посторонних примесей в таблетках триметазида дигидрохлорида / Е.В. Компанцева, Г.А. Мартиросова, М.Г. Цыбулина // Межрегион. науч. конф. по разработке, исследованию и маркетингу новой фармацевтической продукции (59; 2004; Пятигорск): Материалы... — Пятигорск. 2004. — С. 181 — 183.
4. Валидация методики количественного определения УФ-спектрофотометрическим методом триметазида дигидрохлорида в таблетках, покрытых оболочкой / Г.А. Мартиросова // Всероссийская научно-практическая конференция по современным проблемам фармакологии и фармации (18—19 мая; 2005; Новосибирск): Материалы... — Новосибирск. 2005. — С. 310—312.
5. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе / Н.А. Эпштейн // Хим.-фармац. журн. — 2004. — Т. 38, №4. — С. 40—56.

6. Арзамасцев А.П., Садчикова, Н.П., Лутцева, Т.Ю. Валидация методики количественного определения бензоната в таблетированных лекарственных формах / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Т.Ю. Лутцева // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. — 2001. — № 4. — С. 29—31.
7. Государственная фармакопея СССР. XI изд. — М.:— Медицина, — 1987. — Вып. 1. — С. 199—252.
8. Дерффель К. Статистика в аналитической химии / К. Дерффель — М. :Мир, 1994. — 276 с.
9. British Pharmacopoeia. — 2001. — Vol. 11, Appendix III. — A 141—144.
10. Huber L. Validation of analytical Methods: Review and Strategy / L.Huber // BioPharm. 1999. — Vol. 12, №1. — P. 64—66.