

УДК 615.074

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2023.72.45.001>

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ В ТАБЛЕТКАХ НИМЕСУЛИДА МЕТОДОМ ВЭЖХ-УФ

А.А. Уразгалиева, аспирант кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества, ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань, alsushka.urazgalieva-2011@mail.ru

Ю.В. Филиппов, канд. хим. наук, начальник исследовательского отдела, АО «Татхимфармпрепараты», г. Казань, filippov@tatpharm.ru

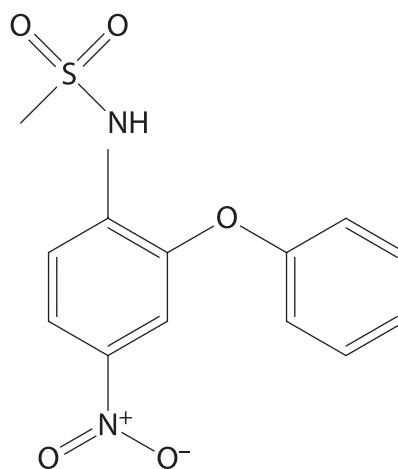
С.Ю. Гармонов, доктор хим. наук, профессор кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества, ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань, serggar@mail.ru

Представлена разработка и валидация методики определения примесей в новой лекарственной форме (дженерика) нимесулида в виде таблеток, диспергируемых в полости рта (100 мг), для осуществления их контроля качества с целью дальнейшей разработки нормативной документации на территории Российской Федерации. Подобраны хроматографические условия разделения компонентов лекарственной формы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора (УФ). Проведена валидация разработанной методики по показателям: «специфичность», «предел количественного определения», «линейность», «правильность» и «прецизионность».

Ключевые слова: нимесулид, лекарственные препараты, высокоэффективная жидкостная хроматография, ВЭЖХ-УФ, валидация, контроль качества

Нимесулид является нестероидным противовоспалительным средством из класса сульфонанилидов, при этом он обладает выра-

женным обезболивающим, противовоспалительным и жаропонижающим действием [1,2]:



Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) – одни из наиболее часто назначаемых лекарственных средств (ЛС). Спектр патологических состояний, при которых применяются НПВП, чрезвычайно широк – от хронической мышечно-скелетной боли и различных форм острой боли до альгодисменореи [3]. При этом нимесулид широко применяется как противовоспалительное лекарственное средство в хирургической, травматологической и ортопедической практике.

Он ингибирует циклооксигеназу ЦОГ-1 именно в очаге воспаления и боли, что может иметь особое терапевтическое преимущество при отсутствии влияния на этот фермент в желудке и почках [4].

Однако небольшой выбор на отечественном фармацевтическом рынке препаратов нимесулида обуславливает ограничения к его более широкому клиническому применению с достаточной экономичностью и эффективностью. Появление качественных дженериков нимесулида позволит сделать современную противовоспалительную терапию более доступной для пациентов. Для обеспечения эффективности и безопасности применения ЛС – дженериков необходима разработка соответствующих методик контроля качества готовой лекарственной формы.

При стандартизации новой лекарственной формы (дженерика) одной из важнейших характеристик является ее чистота, определяемая таким показателем, как «примеси».

Целью настоящего исследования является разработка и валидация методики определения примесей нимесулида в лекарственном препарате методом ВЭЖХ-УФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе использовали стандартный образец нимесулида (LGC); стандартный образец (СО) примеси С (LGC); стандартный образец примеси D (EP CRS); аммония дигидрофосфат (ACROS ORGANICS, Испания); аммиака раствор концентрированный (АО «Вектон», Россия); ацетонитрил (Merck, Германия).

Для изготовления опытной серии таблеток из фармацевтической субстанции нимесулида готовили таблетную массу. В состав таблетки входят: целлюлоза микрокристаллическая, крахмал кукурузный, натрия крахмал гликолят (примогель), кремния диоксид коллоидный (аэросил), натрия сахаринат, ароматизатор,

табак, магния стеарат. Из полученной смеси прессовали таблетки.

Для определения примесей использовали систему ВЭЖХ LC-20 Prominace (Shimadzu, Япония) с УФ-детектором. Хроматографическое разделение выполняли на колонке Luna (2) (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм). Элюирование осуществлялось в изократическом режиме. Подвижная фаза, состоящая из буферного раствора pH 7,0 и ацетонитрила в соотношении 65:35 об. %, подавалась со скоростью потока 1,5 мл/мин. Объем пробы составлял 20 мкл. Детектирование выполняли при длине волны 230 нм. Время анализа – 56 минут.

Буферный раствор pH 7,0 готовили следующим образом: 1,15 г аммония дигидрофосфата поместили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворили в 900 мл воды, довели pH полученного раствора до $7,0 \pm 0,1$ аммиака раствором концентрированным 25% и довели объем раствора водой до метки.

В качестве растворителя проб использовали смесь «вода – ацетонитрил» в соотношении 3:2, об. %.

Стандартный раствор нимесулида с концентрацией 0,002 мг/мл готовили путем растворения точной навески стандартного образца в растворителе. Раствор использовали свежеприготовленным.

Методика определения. Для определения примесей испытуемый раствор готовили следующим образом: около 0,40 г (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл ацетонитрила и встряхивают в течение 30 мин., доводят объем раствора водой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр PTFE с диаметром пор не более 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата. В качестве раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы используют смесь примесей С и D. Для проверки чувствительности хроматографической системы

используют раствор нимесулида в концентрации 0,0002 мг/мл.

Содержание любой единичной примеси в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 2,5 \cdot 1 \cdot 100 \cdot G \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 10 \cdot 25 \cdot 50 \cdot L \cdot 100} = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot G \cdot 0,02}{S_0 \cdot a \cdot L},$$

где S – площадь пика любой единичной примеси на хроматограмме испытуемого раствора; S₀ – площадь пика нимесулида на хроматограмме раствора СО нимесулида; a₀ – навеска СО нимесулида, в миллиграммах; a – навеска порошка растертых таблеток, в граммах; G – средняя масса таблетки, в граммах; L – заявленное содержание нимесулида в таблетке, в миллиграммах; P – содержание основного вещества в СО нимесулида, в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В фармацевтической субстанции нимесулида нормируются следующие примеси: А (N-(2,4-динитро-6-феноксифенил)метансульфонамид); В (N-(2-феноксифенил)метансульфонамид); С (2-феноксанилин); D (4-нитро-2-феноксанилин); Е (N-метансульфонил-N-(2-феноксифенил)метансульфонамид); F (N-метансульфонил-N-(2-нитро-2-феноксифенил)метансульфонамид), имеющие технологическую и родственную природу.

Были проведены исследования по выбору оптимального состава подвижной фазы, скорости, температуры для наилучшего разделения примесей и компонентов плацебо. При этом подвижная фаза, состоящая из буферного раствора рН 7,0 и ацетонитрила (в соотношении 65:35 об. %), обеспечивала хорошее разделение действующего вещества и примесей при элюировании со скоростью 1,5 мл/мин

и объеме пробы 20 мкл. Оптимальной аналитической волной детектирования была выбрана длина волны 230 нм, соответствующая наиболее максимальному светопоглощению аналитов.

Валидацию аналитической методики определения примесей проводили согласно требованиям ГФ XIV [5,6].

Подтверждение *специфичности* проводили сравнением хроматограмм растворителя, раствора плацебо, стандартного раствора, раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы и раствора примесей нимесулида (рис. 1–5). Специфичность аналитической методики считается доказанной, если на хроматограмме раствора плацебо отсутствуют пики в районе выхода пика действующего вещества препарата и его примесей и выполняются все условия пригодности хроматографической системы. Вспомогательные компоненты, используемые при производстве лекарственного препарата, не имеют мешающего влияния при определении.

Хроматографическая система считается пригодной, если:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику нимесулида на хроматограмме СО нимесулида, не менее 5000 теоретических тарелок; фактор асимметрии

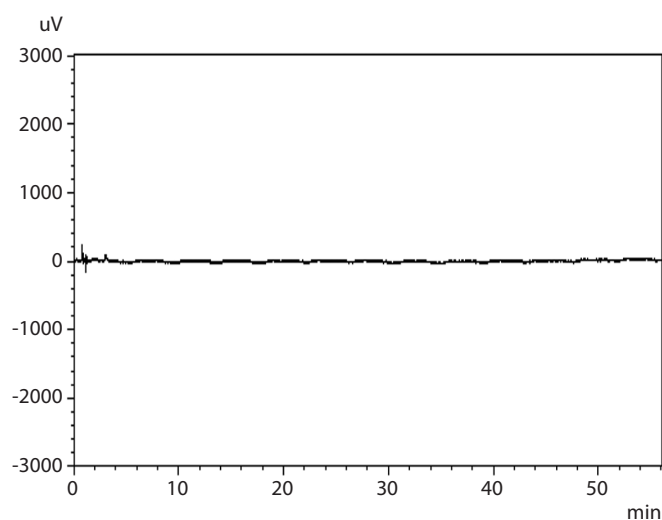


РИС. 1. Хроматограмма растворителя

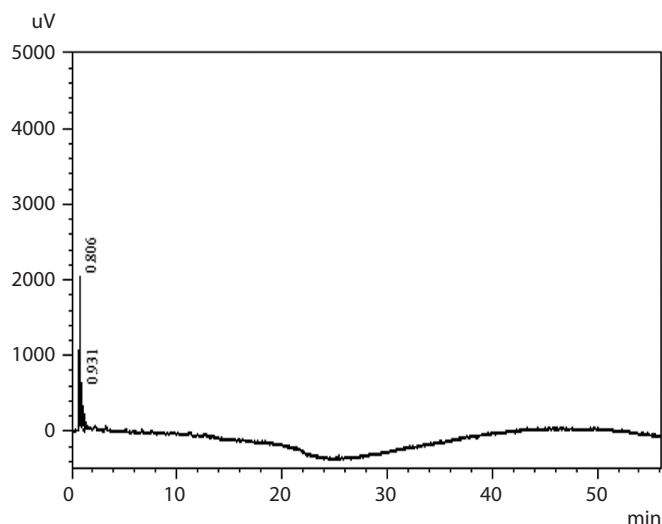


РИС. 2. Хроматограмма раствора плацебо

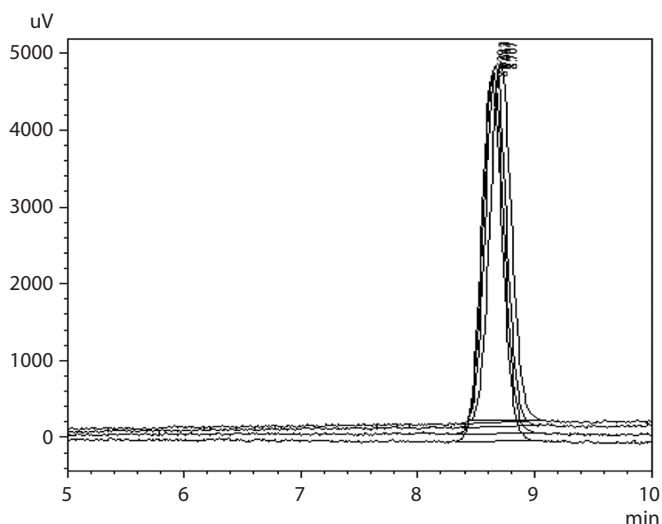


РИС. 3. Хроматограмма раствора стандартного образца нимесулида

пика нимесулида на хроматограмме раствора СО нимесулида от 0,8 до 2,0;

- разрешение (R) между пиками примеси С и примеси D на хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы не менее 2,0;
- отношение сигнал/шум для пика нимесулида на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы не менее 10;

- относительное стандартное отклонение площадей пиков нимесулида на пяти хроматограммах раствора СО нимесулида не более 2,0%.

Согласно полученным данным, параметр «специфичность» соответствует заявленным критериям приемлемости, удовлетворяются требования пригодности хроматографической системы, на хроматограмме растворителя и плацебо отсутствуют пики в районе выхода пика нимесулида и его примесей.

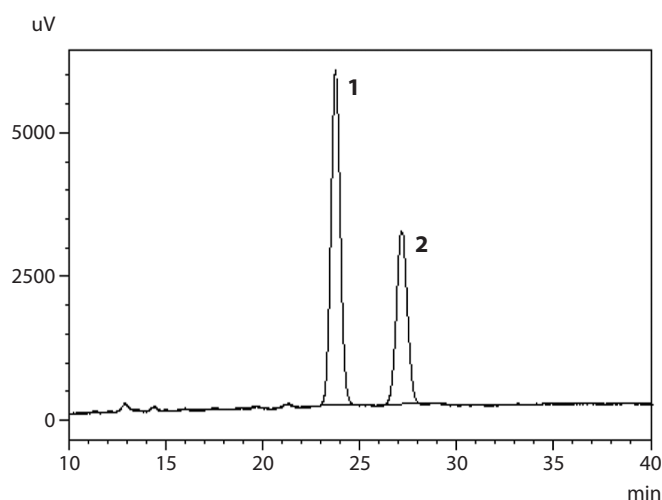


РИС. 4. Хроматограмма раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы: 1 – примесь С, 2 – примесь D

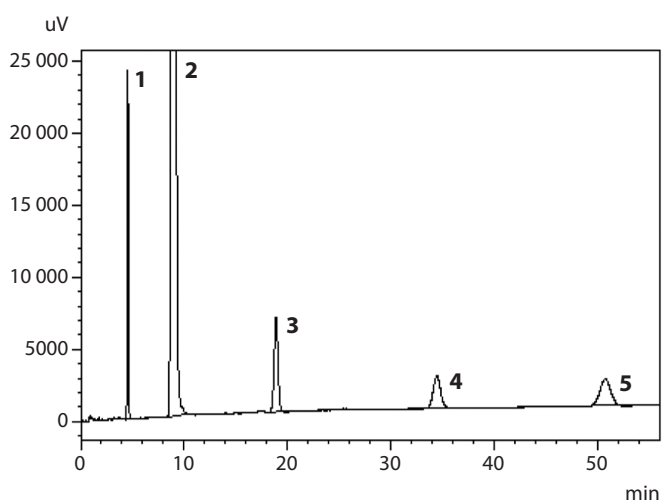


РИС. 5. Хроматограмма раствора примесей нимесулида: 1 – примесь А, 2- нимесулид, 3 – примесь В, 4 – примесь Е, 5 – примесь F

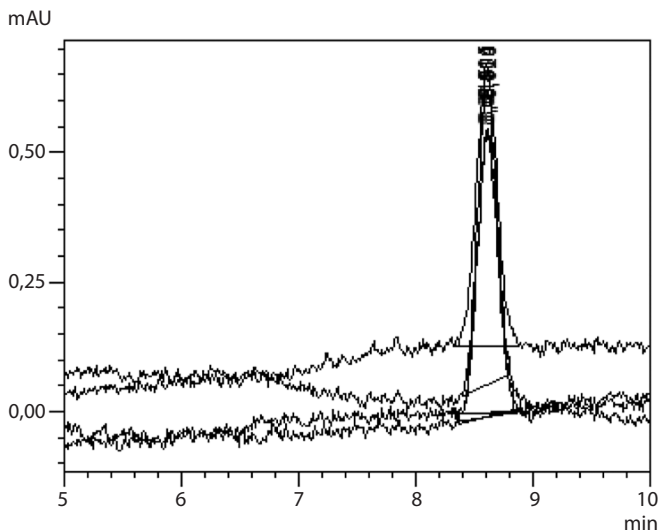


РИС. 6. Хроматограмма раствора при проверке чувствительности хроматографической системы

Предел количественного определения. Определяли отношение сигнал/шум раствора наименьшей концентрации (рис. 6). Предел количественного определения нимесулида составляет 0,02%. Отношение сигнал/шум составляет от 15 до 19. Относительное стандартное отклонение 6 измерений площадей пиков нимесулида составляет 6,1. Согласно полученным данным, параметр «предел количествен-

ного определения» соответствует заявленным критериям приемлемости.

Линейность. Проводили анализ семи образцов стандартных растворов с соответствующими концентрациями, растворы хроматографировали не менее трех раз. Градуировку проводили методом абсолютной калибровки. Линейная градуировочная зависимость отношения площади пиков от их концентраций описывается уравнениями регрессии с хорошим коэффициентом корреляции: 0,9988. Критерием приемлемости являлся коэффициент корреляции $r > 0,99$.

Правильность разрабатываемой методики оценивали методом «введено – найдено». Испытание проводили на 9 независимых образцах. В качестве критериев приемлемости выбрали следующие: средняя степень извлечения для определения примесей от 90% до 110% (100% концентрация); относительное стандартное отклонение $\leq 4,0\%$ (табл. 1).

Для оценки **прецизионности** методики по параметру «повторяемость» («сходимость») было проанализировано шесть образцов одним химиком в течение 1 дня на одном приборе. Для подтверждения **внутрилабораторной**

Таблица 1

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИМЕСУЛИДА В МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРАХ

№	Заложено, мг	Найдено		Метрологические характеристики
		мг	%	
1	0,00168	0,00167	99,41	$t(95\%, 8) = 2,31$ $\bar{x}, \% = 99,13$ $s^2 = 0,1739$ $s = 0,4171$ $s_{\bar{x}} = 0,1390$ $\pm \Delta \bar{x} = 0,3211$ $RSD, \% = 0,42$ $RSD_{\bar{x}}, \% = 0,14$
2	0,00168	0,00167	99,35	
3	0,00168	0,00167	99,13	
4	0,00210	0,00208	99,21	
5	0,00210	0,00209	99,68	
6	0,00210	0,00209	99,71	
7	0,00252	0,00252	100,00	
8	0,00252	0,00252	99,94	
9	0,00252	0,00253	100,41	

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ В ОБРАЗЦАХ

Первая серия измерений		Вторая серия измерений	
№ измерения	Содержание примесей, %	№ измерения	Содержание примесей, %
	Любая единичная примесь		Любая единичная примесь
<i>исполнитель № 1</i>		<i>исполнитель № 1</i>	
1	0,012	1	0,012
2	0,011	2	0,011
3	0,011	3	0,011
<i>исполнитель № 2</i>		<i>исполнитель № 2</i>	
1	0,012	1	0,011
2	0,011	2	0,011
3	0,011	3	0,011
среднее значение, %	0,011	среднее значение, %	0,011
стандартное отклонение	0,0004	стандартное отклонение	0,0004
RSD, %	3,76	RSD, %	3,52

прецизионности было проанализировано по 6 образцов двумя химиками в разные дни на разном оборудовании (табл. 2). Критерий приемлемости – относительное стандартное отклонение результатов шести определений каждого сотрудника лаборатории должно быть не более 4,0%.

Согласно проведенным исследованиям, была разработана методика определения примесей в лекарственном препарате «Нимесулид таблетки, диспергируемые в полости рта, 100 мг», метрологические характеристики которой удовлетворяют заявленным критериям для фармацевтического анализа.

ВЫВОДЫ

1. При использовании метода обращенно-фазовой ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектированием разработана методика определения

примесей в лекарственном препарате нимесулида с целью обеспечения контроля качества выпускаемой продукции. Установлены оптимальные условия хроматографических определений примесей нимесулида.

2. Проведена валидация разработанной методики. Согласно полученным результатам, разработанная методика определения примесей нимесулида в лекарственном препарате удовлетворяет требованиям ОФС 1.1.0012.15 ГФ XIV «Валидация аналитической методики» по показателям: «специфичность», «предел количественного определения», «линейность», «правильность», «сходимость» и «внутрилабораторная прецизионность».

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Manju K. Nair. A clinical study on nimesulide hepatotoxicity / K. Nair Manju, M.N. Rema,

- K.T. Shenoy // International Journal of Research in Medical Sciences. 2018. V. 6(11). P. 3523–3526.*
2. Греченков А.С. Нимесулид как препарат выбора при лечении боли в амбулаторной практике / А.С. Греченков, Е.Н. Кондрашенко, А.В. Бутров // *Амбулаторная хирургия. 2016. №3–4. С. 63–64.*
 3. *Vein J.R., Botting R.M. Therapeutic roles of selective COX-2 inhibitors. – London: William Harvey Press, 2001. P. 524–540.*
 4. *Davis R. Nimesulide. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy / R. Davis, R.N. Brogden // Drugs. 1994. V. 48. №3. P. 431–454.*
 5. *Валидация аналитических методик. ОФС.1.1.0012.15. Государственная фармакопея Российской Федерации. 2018. 14-е изд. Т. 1. С. 276–288.*
 6. *Нежиховский Г.П. Валидация аналитических методик. – СПб.: ЦОП «Профессия», 2016. – 312 с.*

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR DETERMINING IMPURITIES IN NIMESULIDE TABLETS BY HPLC-UV

A.A. Urazgalieva¹, Yu.V. Filippov², S.Yu. Garmonov¹

¹ *Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia*

² *JSC "Tatkhimpharmpreparaty", Kazan, Russia*

The paper presents the development and validation of methods for determining impurities in a new dosage form (generic) of nimesulide in the form of tablets dispersed in the oral cavity (100 mg) to control their quality in order to further develop regulatory documentation in the Russian Federation. Chromatographic conditions were selected for the separation of the components of the dosage form by high-performance liquid chromatography (HPLC) using an ultraviolet detector (UV). The developed methods were validated according to the following indicators: "specificity", "limit of quantitation", "linearity", "accuracy" and "precision".

Keywords: nimesulide, drugs, high-performance liquid chromatography, HPLC-UV, validation, quality control