

УДК 615.074

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2024.80.79.001>

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ И РОДСТВЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ РИЗАТРИПТАНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

Ю.В. Власенко, генеральный директор ООО «Ферринг Продакшн», г. Москва

Н.В. Меньшутина, доктор техн. наук, профессор, зав. кафедрой химического и фармацевтического инжиниринга, ведущий научный сотрудник кафедры химического и фармацевтического инжиниринга Российского химико-технологического университета имени Д.И. Менделеева (РХТУ им. Д.И. Менделеева), г. Москва

Данная работа посвящена разработке и валидации методики определения количественного содержания и родственных примесей в лекарственных препаратах для осуществления их контроля качества с целью дальнейшей разработки нормативной документации на территории Российской Федерации. Подобраны хроматографические условия разделения для оптимального определения действующего вещества и его продуктов деградации методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием ультрафиолетового детектора. Доказаны специфичность, линейность, правильность методики. Полная неопределенность анализа, подтверждающая корректность методики при воспроизведении в других лабораториях, не превышает 1,6% ($\Delta_{A_s, \text{max}}\% = 1,1850\%$). Коэффициент вариации (RSD) меньше 1% (0,5027%). Проведена внутрилабораторная прецизионность (RSD 0,5965%), коэффициент корреляции составил $r = 0,9996$, подтверждена стабильность растворов в течение 24 часов при температуре не выше 25°C. Методика обладает достаточной правильностью, повторяемостью, линейностью, специфичностью, систематическая ошибка отсутствует. Следовательно, методика пригодна для дальнейшего

использования и включения в нормативную документацию.

Ключевые слова: ризатриптан, лекарственные препараты, ВЭЖХ-УФ, валидация, контроль качества, количественное определение, родственные примеси

Использование валидных методик анализа является необходимым для контроля и обеспечения качества лекарственных препаратов. С учетом загруженности лабораторий фармацевтических предприятий, а также различия парков оборудования актуальной задачей становится адаптация известных методик для возможности их осуществления на имеющихся приборах с минимальными временными затратами.

Мигрень является хроническим невровазкулярным заболеванием с наследственной предрасположенностью. Основное звено патогенеза – периодическое развитие периваскулярного нейрогенного воспаления мозговых сосудов, в первую очередь сосудов твердой мозговой оболочки. Распространенность мигрени в популяции стран Европы и США в среднем составляет 14% [1]. Ризатриптан – один из самых эффективных селективных агонистов 5-HT₁ рецепторов серотонина [2].

Поэтому разработка лекарственных препаратов, содержащих ризатриптан, является актуальной задачей.

Цель настоящего исследования – разработка и валидации методик количественного определения и родственных примесей ризатриптана методом ВЭЖХ-УФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вода для хроматографии, полученная на установке системы очистки воды Arium® Comfort II (Sartorius, Германия) с удельным сопротивлением не менее 0,18 МОм·м, с общим содержанием органического углерода не более 5 мкг/кг (ФЕАЭС 2.2.1.1 Реактивы); натрия хлорид (NaCl, рег. номер CAS: 7647-14-5, ACS reagent); калия хлорид (KCl, рег. номер CAS: 7447-40-7, ООО «МХЗ»); динатрия гидрофосфат додекагидрат (Na₂HPO₄·12H₂O, рег. номер CAS: 10039-32-4, «ХимСервис»); калия дигидрофосфат (KH₂PO₄, рег. номер CAS: 7778-77-0, ООО «Химмед Синтез»), хлороводородная кислота (HCl, рег. номер CAS: 7647-01-0, ACS reagent); натрия гидроксид (NaOH, рег. номер CAS: 1310-73-2, ACS reagent); ацетонитрил для хроматографии (CH₃CN, ФЕАЭС 2.2.1.1 Реактивы, рег. номер CAS: 75-07-8, Thermo Fisher); трифторуксусная кислота (C₂HF₃O), ФЕАЭС 2.2.1.1 Реактивы, рег. номер CAS: 76-05-1, Carl Roth); фармакопейный стандартный образец ризатриптана бензоата (EP CRS, кат. номер Y0001302, EDQM); фармакопейный стандартный образец ризатриптана для проверки пригодности хроматографической системы (EP CRS, кат. номер Y0001303, EDQM); водорода пероксида раствор концентрированный (H₂O₂, рег. номер CAS: 7782-84-1, ООО «Химмед Синтез»).

Хроматограммы методик количественного определения и родственных примесей получены на ультравысокоэффективном жидкостном хроматографе UPLC Acquity H-Class (Waters, США) с УФ-детектированием, колонка из не-

ржавеющей стали размером 250 мм × 4,6 мм, заполненная силикагелем фенилсилильным для хроматографии с размером частиц 5 мкм (Zorbax SB-Phenyl, кат. номер 880975-912, Agilent, США). Обработка хроматограмм проводилась с помощью программного обеспечения Chromeleon 7.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве исходной методики использовалась методика Европейской фармакопеи на ризатриптана бензоат. При адаптации фармакопейной методики количественного определения действующего вещества были учтены особенности оборудования. Изменение градиентного режима, уменьшение времени хроматографирования и увеличение скорости потока подвижной фазы произвели с целью ускорения элюирования основного вещества и сокращения общего времени анализа.

При проведении эксперимента использовали УВЭЖХ-систему Waters UPLC Acquity H-Class (Waters, США). УВЭЖХ-системы позволяют работать при высоких давлениях и скоростях потока, делая анализ быстрее, без потери селективности и эффективности. Конструктивными особенностями УВЭЖХ-системы Acquity H-Class являются ограничения по длине хроматографической колонки и объему вводимой пробы. Максимальная длина колонки не более 150 мм, а объем закола – до 10 мкл. Так как для анализа использовалась колонка длиной 250 мм с подключением в обход термостата, обеспечить нагрев колонки в термостате невозможно.

Для возможности проведения анализа на системе УВЭЖХ был уменьшен объем вводимой пробы с 20 мкл до 10 мкл в методике определения родственных примесей и до 2 мкл для методики количественного определения, чувствительность метода осталась достаточной. Изменение температуры колонки с 40°C

ПРОГРАММЫ ГРАДИЕНТНОГО ЭЛЮИРОВАНИЯ

Количественное определение			Родственные примеси		
Время, мин	Состав подвижной фазы, %		Время, мин	Состав подвижной фазы, %	
	A	B		A	B
0–6	100	0	0–8	100	0
6–6,5	100→20	0→80	8–17	100→70	0→30
6,5–10	20	80	17–20	70	30
10–10,5	20→100	20→100	20–20,1	70→100	30→0
10,5–15	100	0	20,1–23	100	0

на комнатную не оказало негативного влияния на пригодность хроматографической системы.

Измененное соотношение подвижных фаз при градиентном элюировании, а также увеличение скорости потока с 1,5 мл/мин на 1,7 мл/мин позволили сократить время хроматографирования для методики количественного определения с 23 минут до 15 минут. При этом время удерживания основного

пика составило около 5,3 минуты, асимметрия пика – 1,54, а количество теоретических тарелок превысило 9000.

Программы градиентного элюирования разработанных методик приведены в табл. 1.

Типовые хроматограммы методик приведены на рис. 1 и 2.

Для получения документального подтверждения того, что методики определения

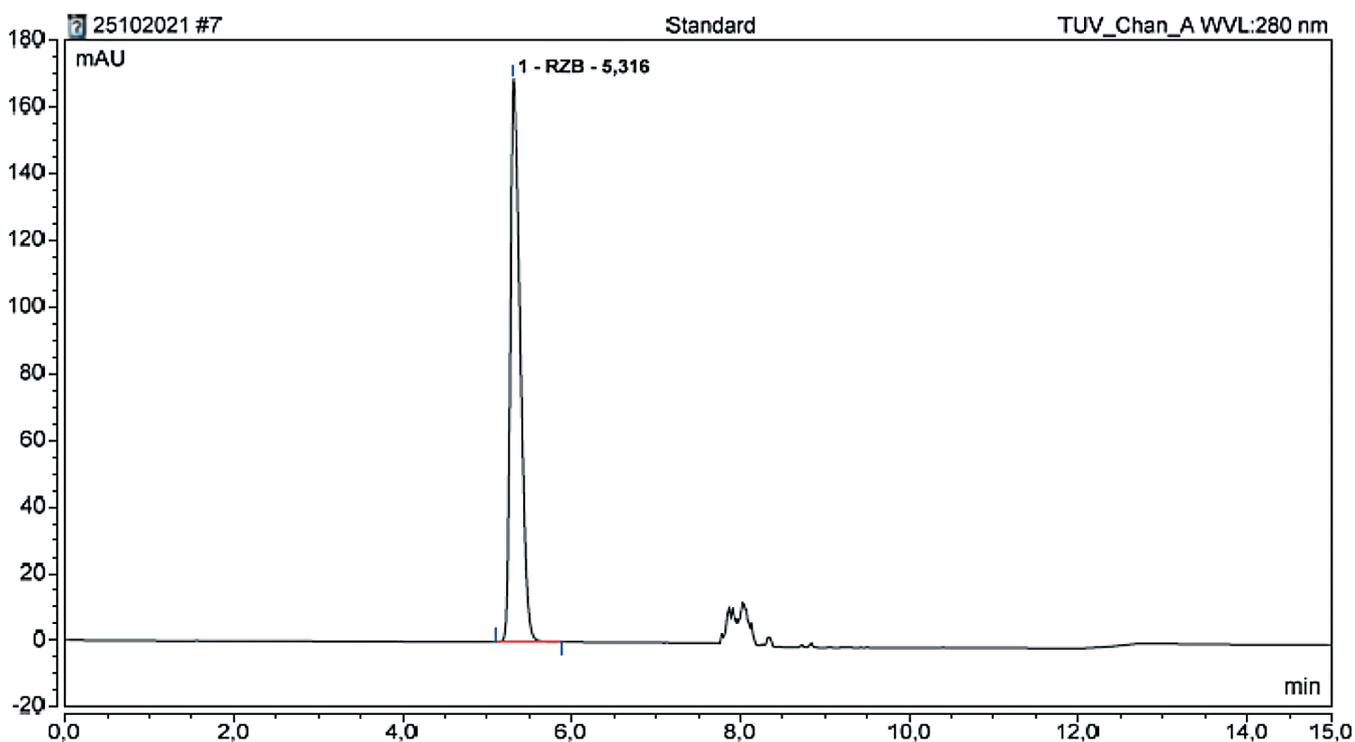


РИС. 1. Типовая хроматограмма методики количественного определения

родственных примесей и количественного содержания методом ВЭЖХ гарантируют получение результатов с необходимой степенью достоверности, была проведена их валидация в соответствии с рекомендациями ЕАЭС и ICH [4,5], оценивались следующие характеристики: специфичность (в том числе исследование растворов после кислотного гидролиза, щелочного гидролиза, окисления и воздействия повышенных температур), линейность; правильность; прецизионность (повторяемость и внутрिलाбораторная сходимость).

Дополнительно была рассчитана полная неопределенность результата анализа для оценки корректности методики, которая не превысила критического значения:

$$\Delta_{As}, \% = \sqrt{(\Delta_{SP}, \%)^2 + (\Delta_{FAO}, \%)^2} = \sqrt{0,9661^2 + 0,6862^2} = 1,1850 \leq \Delta_{As} \text{ max} = 1,6$$

Проверка специфичности проводилась с приготовлением растворов, для оценки полного спектра продуктов разложения действующего

вещества в различных условиях. Для кислотного гидролиза использовалась обработка раствора стандартного образца 5М раствором хлороводородной кислоты при температуре 90°C в течение 60 минут, нейтрализация осуществлялась 5М раствором натрия гидроксида с последующим охлаждением образца до комнатной температуры. Щелочной гидролиз проводился 5М раствором натрия гидроксида при температуре 90°C в течение 60 минут, гидролиз останавливали добавлением 5М раствора хлороводородной кислоты. Продукты перекисной деградации получали добавлением к раствору стандартного образца водорода пероксида раствора концентрированного в соотношении 1:5, полученный раствор выдерживали при температуре 60°C в течение 30 минут с последующим охлаждением. Термическая деградация проводилась при температуре 90°C в течение 60 минут. В приведенных условиях достигнуты следующие степени деградации: кислотный гидролиз – 0,89%, щелочной гидролиз – 1,24%, окисление – 4,81%, термическая деструкция – <0,5%.

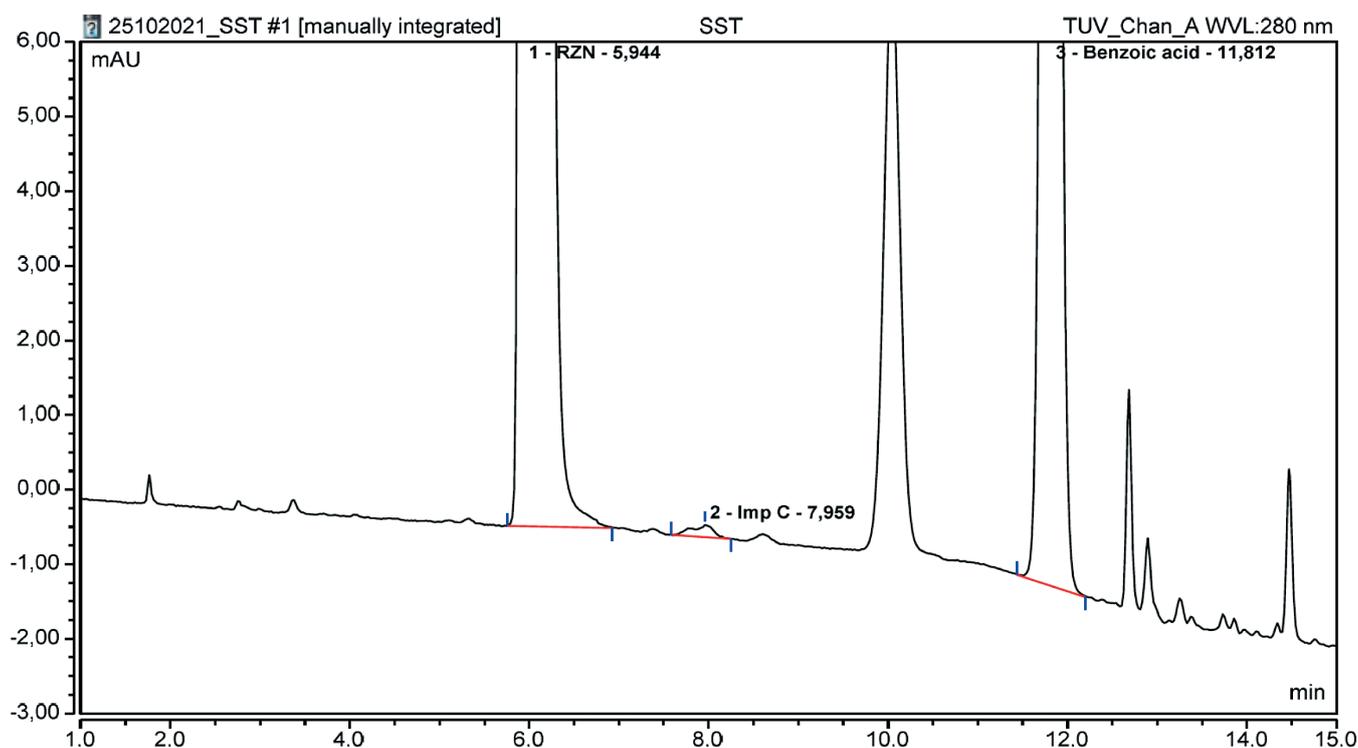


РИС. 2. Типовая хроматограмма методики определения родственных примесей

Таблица 2

ВРЕМЕНА УДЕРЖИВАНИЯ (t_r) И РАЗРЕШЕНИЯ (R_s) ДЛЯ ОСНОВНОГО КОМПОНЕНТА И БЛИЖАЙШИХ К НЕМУ ПРИМЕСЕЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ РАЗЛОЖЕНИИ

Наименование компонента	Щелочной гидролиз		Кислотный гидролиз		Окисление		Термическая деструкция	
	t_r	R_s	t_r	R_s	t_r	R_s	t_r	R_s
Ближайшая слева примесь	5,342	2,05	5,173	–	5,473	1,68	3,839	9,52
Основной компонент	5,914	–	5,908	–	5,916	–	5,892	–
Ближайшая справа примесь	–	–	7,607	3,31	7,432	4,95	7,619	3,39

Результаты испытания специфичности приведены в табл. 2.

Линейность исследовали на растворах субстанции с концентрациями от 0,8 до 1,2 мг/мл, которые находятся в пределах от 80 до 120% от номинального содержания действующего вещества в испытуемых растворах препарата (рис. 3). Аналитический сигнал стандартного раствора (A_{st}) составляет 22,8182. Количество аналита в стандартном растворе (C_{st}) составляет 1,0018 мг/мл. Значение коэффициента

корреляции составляет 0,9996 при $y = 1,033x - 1,5023$, где x = концентрация (мг/мл), y – площадь пика.

Целью испытания на правильность и прецизионность является оценка способности методики выразить пропорциональную зависимость между найденными результатами и концентрацией анализируемого вещества в пробе. Правильность и повторяемость методики были проверены методом «введено – найдено». Оценка внутрилабораторной

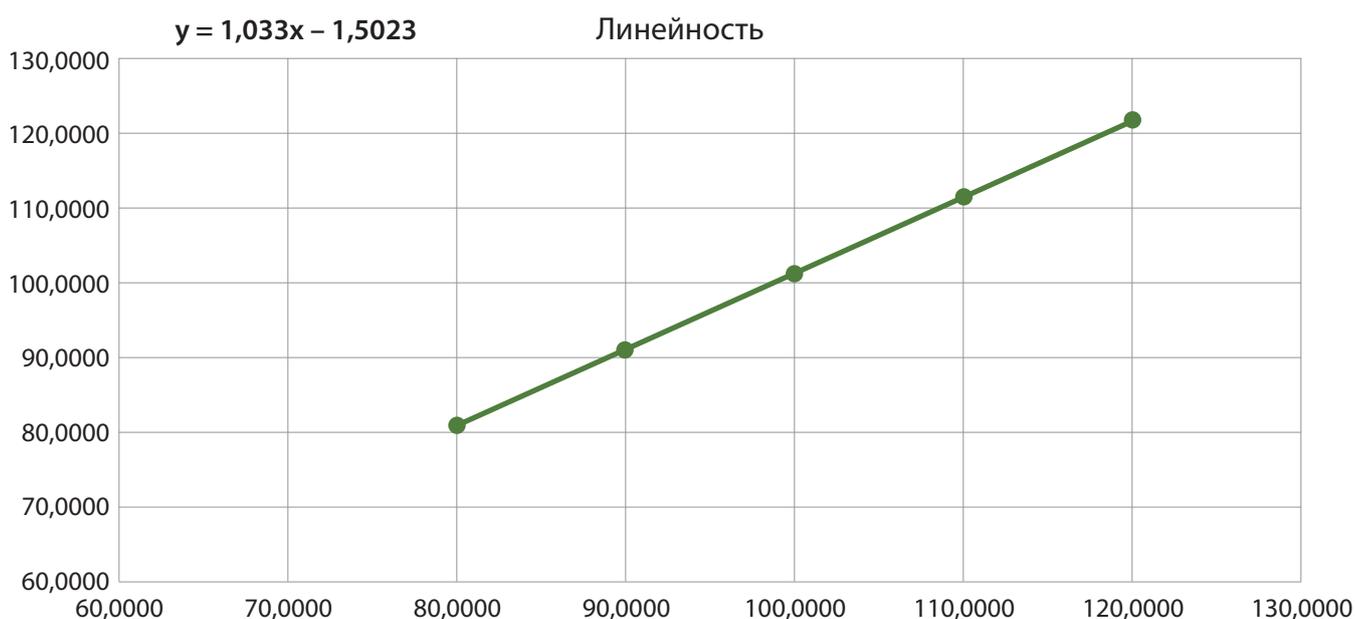


РИС. 3. График линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации в модельном растворе

прецизионности методики «Количественное определение» была проведена на девяти растворах испытуемого образца препарата, выполненных тремя исполнителями.

Результаты расчетов метрологических характеристик и их оценка по сравнению с критериями приемлемости представлены в табл. 3.

Стабильность стандартного раствора в течение 24 часов подтверждена отклонением аналитического сигнала, составившим 0,07%, сохранением времени удерживания пика и его соответствующим фактором асимметрии.

В соответствии с требованиями теста «Проверка пригодности хроматографической системы» [6], результаты анализа родственных примесей считаются достоверными, если выполняются следующие условия:

- отношение сигнал/шум, рассчитанное для основного пика на хроматограмме раствора для проверки чувствительности, должно быть не менее 10;
- разрешение между основным пиком и пиком примеси С на хроматограмме раствора для проверки пригодности системы, должно быть не менее 2,0;
- фактор асимметрии, рассчитанный по основному пику на хроматограмме раствора для проверки пригодности системы, должен быть не более 3,5.
- Для методики количественного определения выбраны следующие критерии пригодности хроматографической системы:
- относительные стандартные отклонения, рассчитанные из 5 заколов для площадей

Таблица 3

РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И ИХ ОЦЕНКА ПО СРАВНЕНИЮ С КРИТЕРИЯМИ ПРИЕМЛЕМОСТИ

№ р-ра	Введено в % от концентрации раствора сравнения (X_i , факт., %)	Найдено в % к концентрации раствора сравнения (Y_i , %)	Найдено в % к введенному $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$	
1	99,8283	101,1824	101,3564	
2	99,8283	100,3585	100,5311	
3	99,8283	100,8669	101,0403	
4	99,8283	99,7011	99,8726	
5	99,8283	100,0649	100,2370	
6	99,8283	99,8589	100,0306	
7	99,8283	99,3067	99,4775	
8	99,8283	99,7055	99,8770	
9	99,8283	100,3234	100,4960	
Оценка прецизионности (повторяемости)				
Параметры	Значения	Оптимальное требование	Минимальное требование	Заключение
RSD	0,5965	2	5	Соответствует по оптимальному требованию

- и времен удерживания основного пика, должны не превышать 2,0%;
- фактор асимметрии, рассчитанный по основному пику, должен быть от 0,8 до 2,0;
 - эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по основному пику, должна быть не менее 3000 теоретических тарелок.

ВЫВОДЫ

Разработанная методика удовлетворяет требованиям ОФС 1.1.0012.15 ГФ XIV «Валидация аналитической методики» и «Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств», утвержденных решением коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018 г. №113 по показателям: «специфичность», «линейность», «правильность», «внутрилабораторная прецизионность».

Методика пригодна для определения ризатриптана и его родственных примесей в лекарственных препаратах и может быть внесена в нормативную документацию для проведения контроля качества лекарственных препаратов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Азимова Ю.Э. Клинические рекомендации «Мигрень» / Ю.Э. Азимова, А.В. Амелин, В.В. Алферова, А.Р. Артеменко, Л.Р. Ахмадеева, В.А. Головачева, А.Б. Данилов, Е.В. Екушева, Э.Д. Исагулян, М.И. Корешкина, О.В. Курушина, Н.В. Латышева, Е.Р. Лебедева, М.В. Наприенко, В.В. Осипова, Н.А. Павлов, В.А. Парфенов, А.П. Рачин, А.В. Сергеев, К.В. Скоробогатых, Г.Р. Табеева, Е.Г. Филатова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2022. – 122(1–3). – С. 4–36.
2. Yang C.-P. Comparison of New Pharmacologic Agents with Triptans for Treatment of Migraine / C.-P. Yang, C.-S. Liang, C.-M. Chang, C.-C. Yang, P.-H. Shih, Y.-C. Yau, K.-T. Tang, S.-J. Wang // JAMA Netw. Open. 2021 Oct; 4(10): e2128544.
3. Rizatriptan Benzoate / European Pharmacopoeia 11.2. – 2022.
4. Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств, утверждено решением коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 №113. [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/550738945> (дата обращения 24.09.2023).
5. ICH guideline Q2 (R2) on validation of analytical procedures 31 March 2022 EMA/CHMP/ICH/82072/2006 Committee for Medicinal Products for Human Use [Электронный ресурс]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf (дата обращения 24.09.2023).
6. Евразийская экономическая комиссия // Фармакопея Евразийского экономического союза, том I, часть 1, ОФС 2.1.2.36 Хроматографические методы разделения. – Москва. – 2020 – С. 113–123.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHODS FOR ASSAY AND RELATED SUBSTANCES OF RIZATRIPTAN IN MEDICINAL PRODUCTS

Yu.V. Vlasenko¹, N.V. Men'shutina²

¹ Ferring Production LLC, Moscow, Russia

² Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, Russia

This research is devoted to the development and validation of a method for the determination of rizatriptan assay and related substances for the determination of rizatriptan in medicinal products for their quality control for the further development of regulatory documentation in the Russian Federation. Chromatographic separation conditions were selected for the optimal determination of active component and its degradation products by high performance liquid chromatography (HPLC) using an ultraviolet detector (UV). The specificity, linearity and accuracy of method are confirmed; total uncertainty of the analysis confirming the correctness of the analytical method when used in other laboratories does not exceed 1.6% ($\Delta_{A_s} \max\% = 1,1850\%$), relative standard deviation (RSD) is less than 1% (0.5027%), intralaboratory precision is conducted (RSD 0,5965%), correlation coefficient is $r = 0,9996$, stability of solutions for 24 at the temperature not exceeding 25°C is confirmed. Method has sufficient accuracy, precision, linearity, specificity, there is no systematic error. Therefore, method is suitable for the following use and inclusion in the regulatory documents.

Keywords: rizatriptan, medicinal products, HPLC-UV, validation, quality control, assay, related substances