

1 – ЗАО «БИОКАД»,
Россия, 198515,
г. Санкт-Петербург,
Петродворцовый район,
п. Стрельна, ул. Связи, 34,
лит. А

2 – ГБОУ ВПО
«Санкт-Петербургская
государственная
химико-фармацевтическая
академия» Министерства
здравоохранения
Российской Федерации,
Россия, 197376,
г. Санкт-Петербург,
ул. Профессора Попова, 14,
лит. А

1 – CJSC «BIOCAD»,
lit. A, 34, Svyazi str., Strelna,
Petrodvortsoviy district,
Saint-Petersburg, 198515,
Russia

2 – State Budgetary
Educational
Institution of Higher
Professional Education
«Saint-Petersburg state
chemical-pharmaceutical
Academy» of the Ministry
of health of the Russian
Federation, lit. A, 14,
Professor Popov str.,
Saint-Petersburg, 197376,
Russia

* адресат для переписки:
E-mail: Zajtsev@biocad.ru

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В ИННОВАЦИОННОЙ АКТИВНОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ МЕТОДОМ ГЖХ ПИД

Е.В. Бутина¹, С.А. Зайцев^{1*}, А.В. Басевич²

Резюме. Целью исследования являлась разработка и валидация новой методики количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции А с применением ГЖХ. Исследования проведены на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором и отбором проб из паровой фазы. Исследовано влияние полярности стационарной фазы на хроматографическое разделение пиков органических растворителей: хлороформа, этанола, метилхлорида, циклогексана, этилацетата, метанола, N,N-диметилформамида, 2-пропанола. Хроматографическое разделение этанола, метанола, 2-пропанола, этилацетата, метилхлорида и циклогексана осуществлено на кварцевой капиллярной колонке DB-624, 30 м × 0,320 мм, 1,8 мкм; хлороформа и N,N-диметилформамида – на колонке DB-WAX, 30 м × 0,250 мм, 0,25 мкм. Определены показатели пригодности хроматографической системы и критерии валидности методики. Методика обладает высокой специфичностью, точностью, линейностью, надежностью и чувствительностью.

Ключевые слова: остаточные органические растворители, валидация, разработка методики, активная фармацевтическая субстанция.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF RESIDUAL ORGANIC SOLVENTS IN INNOVATIVE ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT WITH GC-FID

E.V. Butina¹, S.A. Zaitsev^{1*}, A.V. Basevich²

Abstract. The aim of the study was to develop and validate a new method of quantitative determination of residual organic solvents in a substance A using GLC. Studies were carried out with gas chromatography with a flame ionization detector and sampling from the vapor phase. The effect of the polarity of the stationary phase for the chromatographic separation of the organic solvents peaks: Chloroform, Ethanol, Methylene Chloride, Cyclohexane, Ethyl Acetate, Methanol, N, N- dimethylformamide, 2-propanol was investigated. Chromatographic separation of Ethanol, Methanol, 2-propanol, Ethyl Acetate, Methylene Chloride and Cyclohexane was performed with quartz capillary column DB-624, 30 m × 0.20 mm, 1.8 micron; Chloroform and N, N-dimethylformamide – DB-WAX, 30 m × 0.50 mm, 0.25 mm. System suitability criteria and the validity of method were determined. Method has high specificity, precision, linearity, sensitivity and reliability.

Keywords: residual organic solvents, validation, development of method, active pharmaceutical ingredient.

ВВЕДЕНИЕ

Для минимизации рисков фармацевтические компании включают двух и более производителей активной фармацевтической субстанции (АФС) одного наименования в регистрационные документы на готовый лекарственный препарат.

В соответствии с политикой компании ЗАО «Биокад» информация по МНН и названию производителей АФС является конфиденциальной, поэтому в настоящей работе приняты следующие условные обозначения объектов исследования: А – МНН субстанции.

Активная фармацевтическая субстанция А представляет собой химико-фарма-

цевтическую субстанцию и предполагается к закупке у нескольких производителей для производства лекарственного препарата в ЗАО «Биокад».

В соответствии с федеральным законом № 61-ФЗ при производстве лекарственного препарата должна быть использована АФС, внесенная в государственный реестр лекарственных средств (ГРЛС) [1]. В рамках подачи заявки на внесение производителя АФС в ГРЛС должно быть предоставлено подтверждение, что методика контроля качества АФС прошла этап валидации и обладает необходимой селективностью, правильностью, надежностью, сходимостью, воспроизводимостью и высокой чувствительностью.

В ЗАО «Биокад» на этапе выбора, согласования и квалификации производителя субстанции А у поставщика АФС были запрошены методики для характеристики полученного образца субстанции А.

При апробации методики количественного определения остаточных органических растворителей, предложенной производителем, было установлено, что параметры анализа не позволяют добиться хроматографического разделения метиленхлорида, 2-пропанола и этанола, нормируемых в АФС.

Таким образом, главной целью настоящей работы была разработка новой селективной методики количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции А с применением метода ГЖХ-ПВД.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на образце субстанции А, предоставленной поставщиком для оценки качества и принятия решения о включении производителя в ГРЛС.

Исходя из схемы синтеза АФС, производителем были заявлены следующие остаточные органические растворители для контроля в субстанции А: хлороформ, этанол, метиленхлорид, циклогексан, этилацетат, метанол, N,N-диметилформамид, 2-пропанол.

В качестве стандартных образцов (СО) были использованы реактивы с качеством для ГЖХ (чистотой не менее 99,9%) фирмы Panreac, Испания.

Разработка и валидация методик количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции А проводилась на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором (Agilent 6890N, Agilent Technologies, США) и автодозатором паровой фазы (Agilent G1888, Agilent Technologies, Италия). Обработку сигнала и полученных результатов осуществляли при помощи программы Chem Station Rev. B.04.03(16), Agilent Technologies, США.



Газовый хроматограф Agilent 6890N



Автодозатор паровой фазы Agilent G1888

Хроматографический анализ проведен на следующих колонках:

1. Кварцевая капиллярная колонка DB-624, 30 м × 0,320 мм, 1,8 мкм, Agilent Technologies, США (колонка 1);
2. Кварцевая капиллярная колонка DB-WAX, 30 м × 0,250 мм, 0,25 мкм, Agilent Technologies, США (колонка 2).
3. Кварцевая капиллярная колонка DB-1, 30 м × 0,250 мм, 0,25 мкм, Agilent Technologies, США (колонка 3).

В качестве растворителя для подготовки проб был выбран N,N-диметилацетамид для ГЖХ (Panreac, Испания).

Статистическая обработка результатов проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате апробации методики производителя на колонке 2 были получены хроматограммы стандартного раствора – смеси растворителей хлороформа (0,03 мг/мл), этанола (2,5 мг/мл), метиленхлорида (0,3 мг/мл), циклогексана (1,94 мг/мл), этилацетата (2,5 мг/мл), метанола (1,5 мг/мл), N,N-диметилформамида (0,44 мг/мл), 2-пропанола (2,5 мг/мл) в N,N-диметилацетамиде.

На рисунке 1 представлена типичная хроматограмма стандартного раствора методики производителя.

В таблице 1 представлены времена удерживания, критерии разделения и пригодности хроматографической системы.

На основании анализа полученных данных был сделан вывод, что методика производителя не позволяет добиться хроматографического разделения метиленхлорида, 2-пропанола и этанола, поскольку пики нормируемых растворителей перекрывают друг друга и не поддаются количественному определению.

Таблица 1.

Значения времен удерживания и критериев пригодности хроматографической системы, полученные по методике производителя

Соединение	Время удерживания, мин	Фактор асимметрии пиков	Разрешение соседних пиков	Число теоретических тарелок
Циклогексан	1,829±0,037	0,90±0,02	–	51323±25
Этилацетат	2,879±0,053	0,88±0,04	26,36±0,11	59493±35
Метанол	3,037±0,027	0,92±0,02	3,49±0,21	78235±22
Метиленхлорид	3,480±0,025	0,65±0,05	10,11±0,17	99986±37
2-пропанол	3,534±0,033	0,86±0,03	1,03±0,12	52065±36
Этанол	3,640±0,024	0,82±0,05	1,81±0,15	71941±29
Хлороформ	4,997±0,043	1,01±0,03	28,15±0,20	226327±23
N,N-диметилформамид	7,687±0,055	1,16±0,04	80,22±0,18	1521441±127

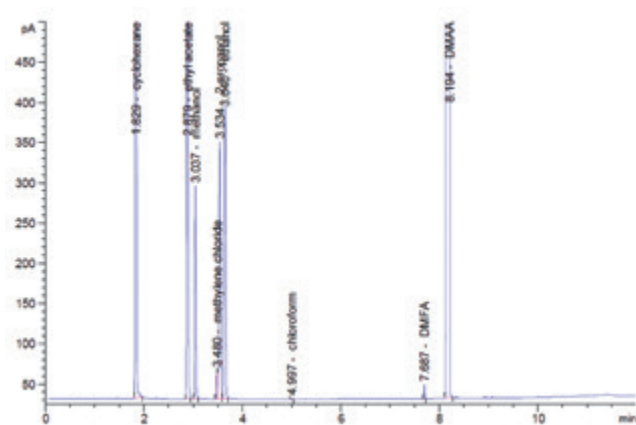


Рисунок 1. Типичная хроматограмма стандартного раствора методики производителя

В исследованиях были использованы колонки 1, 2, 3. Изменение скорости газа-носителя, температурных режимов испарителя и термостатана на колонке 2 не привело к улучшению разрешения пиков метиленхлорида и 2-пропанола.

На колонке 3 наблюдалось неудовлетворительное разрешение пиков хлороформа и этилацетата в разных условиях хроматографического анализа.

Удовлетворительного разделения пиков метиленхлорида, 2-пропанола и этанола удалось добиться на колонке 1 без ухудшения разделения пиков метанола, этилацетата и циклогексана.

На колонке 1 не удалось определить хлороформ и N,N-диметилформамид. Для нормирования этих соединений была оставлена методика производителя на колонке 2 с оптимизацией имеющихся условий анализа, что не является объектом данного исследования.

Для оптимизации условий разделения метиленхлорида, 2-пропанола, этанола, метанола, этилацетата и циклогексана было изучено влияние скорости газаносителя, температурных режимов испарителя и термостата на разделение исследуемых соединений.

В результате проведенных исследований были выбраны следующие условия проведения анали-

Таблица 2.

Значения времен удерживания и критериев пригодности хроматографической системы, полученные по разработанной методике

Соединение	Время удерживания, мин	Относительное стандартное отклонение, %	Фактор асимметрии пиков	Разрешение соседних пиков	Число теоретических тарелок
Метанол	4,427±0,013	4,42	1,22±0,01	–	49042±39
Этанол	5,795±0,025	4,33	1,11±0,04	17,46±0,51	92004±29
2-пропанол	6,658±0,013	4,39	1,03±0,03	11,65±0,31	138818±56
Метиленхлорид	7,106±0,010	3,29	0,98±0,02	6,75±0,21	218106 ± 44
Этилацетат	8,640±0,011	3,10	1,01±0,02	26,68±0,71	412646±51
Циклогексан	9,159±0,014	3,13	1,03±0,01	9,14±0,21	379522±135

за: кварцевая капиллярная колонка DB-624, 30 м × 0,320 мм, 1,8 мкм, температура испарителя – 230 °С, газ-носитель – азот, линейная скорость – 19 см/с, температура термостата начальная – 40 °С, время выдержки при начальной температуре термостата – 5 мин, скорость изменения температуры термостата – 20 °С/мин, температура термостата конечная – 220 °С, время выдержки при конечной температуре термостата – 6 мин, температура детектора – 240 °С, скорость водорода – 40 мл/мин, скорость воздуха – 400 мл/мин, скорость газа-поддува (азот) – 25 мл/мин, коэффициент деления потока – 1:10, температура термостата автодозатора паровой фазы – 85 °С, время термостатирования образцов – 30 мин, объем петли дозатора – 1 мл.

На рисунке 2 представлена типичная хроматограмма исследуемого раствора метиленхлорида (0,06 мг/мл), 2-пропанола (0,5 мг/мл), этанола (0,5 мг/мл), метанола (0,3 мг/мл), этилацетата (0,5 мг/мл) и циклогексана (0,388 мг/мл) в N,N-диметилацетамиде. Концентрации в растворе были выбраны с учетом ожидаемого содержания остаточных органических растворителей в субстанции А и требований ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» [3].

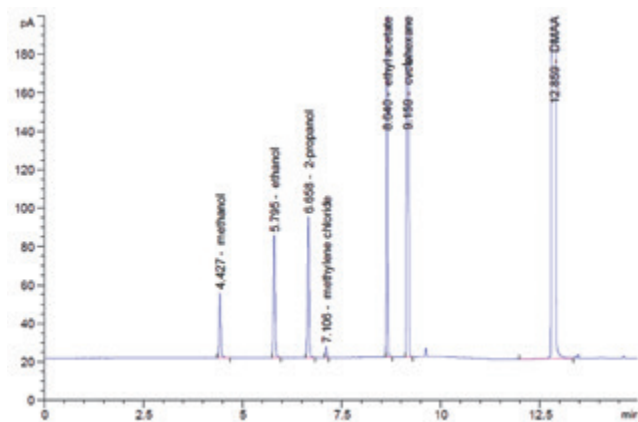


Рисунок 2. Типичная хроматограмма исследуемого раствора

В таблице 2 представлены времена удерживания, относительные стандартные отклонения площадей пиков, критерии разделения и пригодности хроматографической системы.

В установленных при исследовании условиях наблюдалось полное разделение метиленхлорида, 2-пропанола, этанола, метанола, этилацетата и циклогексана.

На основании представленных в таблице 2 данных выбраны следующие критерии пригодности хроматографической системы: разрешение между двумя соседними пиками нормируемых растворителей – не

менее 1,5; относительное стандартное отклонение площадей пиков каждого нормируемого растворителя – не более 5,0%; факторы асимметрии для пиков каждого нормируемого растворителя – не более 1,5; эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам нормируемых растворителей, – не менее 10000 теоретических тарелок.

В рамках проведенных исследований было установлено, что присутствие субстанции А в растворе в концентрации 10–150 мг/мл не влияло на хроматографическое разделение исследуемых соединений. Была выбрана рабочая концентрация раствора субстанции А в N,N-диметилацетамиде – 100 мг/мл.

В результате проведенных исследований разработана следующая методика.

100,0 мг (точная навеска) субстанции А помещают во флакон вместимостью 10 мл, прибавляют 1,0 мл N,N-диметилацетамиде, закрывают прокладкой из политетрафторэтилена и обжимают алюминиевым колпачком, перемешивают до полного растворения навески и термостатируют при 85 °С в течение 30 мин (испытываемый раствор).

150,0 мг (точная навеска) метанола, 250,0 мг (точная навеска) этанола, 250,0 мг (точная навеска) 2-пропанола, 30,0 мг (точная навеска) метиленхлорида, 250,0 мг (точная навеска) этилацетата, 194,0 мг (точная навеска) циклогексана помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, содержащую около 30 мл N,N-диметилацетамиде, перемешивают, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают во флакон вместимостью 10 мл, закрывают прокладкой из политетра-фторэтилена и обжимают алюминиевым колпачком, термостатируют при 85 °С в течение 30 мин (стандартный раствор).

Последовательно хроматографируют по 1 мл стандартного раствора, регистрируют 6 хроматограмм, затем – по 1 мл испытуемого раствора, регистрируют 3 хроматограммы.

Идентификацию примесей и пригодность хроматографической системы оценивают по стандартному раствору.

Последовательность выхода пиков растворителей на хроматограммах стандартного раствора: метанол, этанол, 2-пропанол, метиленхлорид, этилацетат, циклогексан.

Содержание каждого остаточного органического растворителя в субстанции (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot 500},$$

где S – площадь пика органического растворителя на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика органического растворителя на хроматограмме стандартного раствора; a – навеска субстанции, мг; a_0 – навеска СО органического растворителя, мг; P – содержание основного вещества органического растворителя в СО, %.

Валидация методики проведена по следующим критериям: специфичность, предел количественного определения (ПКО), линейность, правильность, точность (сходимость), диапазон применения [4].

Специфичность методики была доказана на исследуемых растворах в присутствии основного вещества субстанции А. Результаты испытаний подтвердили способность разработанной методики разделять пики нормируемых остаточных органических растворителей (см. рисунок 2, таблицу 2).

Пределы количественного определения для нормируемых остаточных органических растворителей составили следующие значения: 0,0034 мг/мл для метанола, 0,0023 мг/мл для этанола, 0,00097 мг/мл 2-пропанола, 0,0028 мг/мл для метилхлорида, 0,00059 мг/мл для этилацетата, 0,0001 мг/мл для циклогексана.

Результаты исследования критерия «линейность» показали, что между концентрациями остаточных органических растворителей и площадями их пиков существует линейная зависимость в концентрациях от ПКО до 0,45 мг/мл для метанола, 0,75 мг/мл для этанола, 0,75 мг/мл для 2-пропанола, 0,09 мг/мл для метилхлорида, 0,75 мг/мл для этилацетата, 0,582 мг/мл для циклогексана.

Правильность разработанной методики определяли путем сопоставления результатов эксперимента и истинных значений. Исследуемые растворы для критерия «правильность» готовили путем растворения точной навески субстанции А в растворе ПКО, стандартном растворе и растворе с содержанием растворителей в концентрациях 150% от их концентраций в стандартном растворе. Относительная ошибка количественного определения остаточных органических растворителей не превышала 4%.

Сходимость результатов была показана на серии независимо приготовленных исследуемых растворов. Относительное стандартное отклонение площадей пиков нормируемых остаточных органических растворителей не превышало 5 % (см. таблицу 2).

Критерии «линейность», «правильность» и «точность» соответствуют предписанным требованиям в

диапазоне концентраций для этанола – от 0,0034 мг/мл до 0,45 мг/мл, этанола – от 0,0023 мг/мл до 0,75 мг/мл, для 2-пропанола – от 0,00097 мг/мл до 0,75 мг/мл, для метилхлорида – от 0,0028 мг/мл до 0,09 мг/мл, для этилацетата – от 0,00059 мг/мл до 0,75 мг/мл, для циклогексана – 0,00010 мг/мл до 0,582 мг/мл. Указанные диапазоны являются диапазонами применения разрабатываемой методики.

Разработанная методика была использована для анализа остаточных органических растворителей в образцах трех серий субстанции А. Во всех исследуемых образцах был обнаружен 2-пропанол в содержании до 0,5%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработана методика количественного определения остаточных органических растворителей в субстанции А с помощью газожидкостной хроматографии. Разработанная методика валидирована в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [4]. Определены показатели пригодности системы и критерии надежности методики. Разработанная методика была использована для анализа образцов трех серий субстанции А. В исследуемых образцах был обнаружен 2-пропанол с содержанием его на уровне до 0,5%. Других остаточных органических растворителей обнаружено не было.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный закон от 12.04.2010 №61-ФЗ (ред. от 29.12.2015) «Об обращении лекарственных средств». URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/702a172c82a752194880a43d24a9c3c323343da5/ (дата обращения 20.05.2016).
2. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. I. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#235/z (дата обращения 20.05.2016).
3. ОФС.1.1.0008.15. Остаточные органические растворители // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. I. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#187/z (дата обращения 20.05.2016).
4. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII изд. Том I. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/#222/z (дата обращения 20.05.2016).