

УДК 615.21

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭТОРИКОКСИБА В ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМАХ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Т.Л. Баталова^{1*}, О.А. Остапюк¹, К.Р. Савельева¹, Т.Ю. Андреевичева¹, Л.В. Персанова¹, С.В. Поляков¹, В.Н. Шестаков¹

Резюме. Разработана и проведена валидация методики количественного определения эторикоксиба в твердой лекарственной форме методом ВЭЖХ. Данная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, аналитический диапазон. Приведены результаты валидации данной методики и апробации на выбранных объектах. По результатам исследования основные валидационные характеристики метода соответствуют критериям приемлемости. При использовании метода ВЭЖХ относительная погрешность составила 0,253%. Аналитический диапазон методики – от 25 до 85 мкг/мл.

Ключевые слова: валидация, эторикоксиб, высокоэффективная жидкостная хроматография.

DEVELOPMENT AND VALIDATION THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF ETORICOXIB IN SOLID PHARMACEUTICAL FORMS BY HPLC

T.L. Batalova^{1*}, O.A. Ostapyuk¹, K.R. Saveleva¹, T.Y. Andreevicheva¹, L.V. Persanova¹, S.V. Polyakov¹, V.N. Shestakov¹

Abstract. A sensitive and developed the validation method for quantification by using the chromatograph for Etoricoxib. The method was validated in terms of specificity, linearity, accuracy, precision and analytical range. The results of validation method and approbation at selected sites are given. It was shown that main validation characteristics meet the requirements. Using the HPLC method the dispersion was 0,253%. The analytical range of method is 25–85 µg/ml for HPLC.

Keywords: validation, etoricoxib, HPLC.

1 – ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Минпромторга России, 109044, Россия, г. Москва, Лавров пер., д. 6

1 – State Institute of Drugs and Good Practices, the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation, 6, Lavrov lane, Moscow, 109044, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: batalova@gilsinp.ru

Тел.: 8 (495) 676 43 60, доб. 2–24

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время нестероидные противовоспалительные препараты занимают одно из первых мест по частоте клинического применения. Среди широкого спектра лекарственных препаратов выделяют группу коксибов, характеризующуюся меньшей частотой развития осложнений и нежелательных реакций в сравнении с другими НПВП. Эторикоксиб (5-хлор-6-метил-3-[4-(метилсульфонил)фенил]-2,3-бипиридин) (рисунок 1) принадлежит к классу коксибов, но существенно отличается по химической структуре от других представителей этого класса НПВП [1].

Структура определяет физические свойства вещества. Эторикоксиб практически нерастворим в воде и относится к соединениям липофильной природы. Для повышения растворимости используются различные физико-химические способы: получение полиморфных систем, образование твердых дисперсий или уменьшение

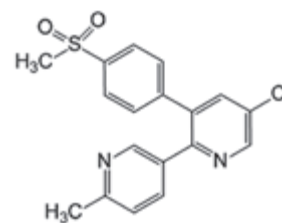


Рисунок 1. Структурная формула эторикоксиба

размеров частиц. Следует отметить, что для разработки и изготовления твердых лекарственных форм на основе эторикоксиба используется фармацевтическая субстанция только кристаллической формы, поскольку аморфная форма эторикоксиба является нестабильной [2].

Особенности эторикоксиба обусловлены его фармакокинетическими свойствами: быстротой наступления эффекта и его длительностью. При действии изучаемого лекарственного средства

наблюдается селективное угнетение ЦОГ-2, которая отвечает за формирование боли и воспаления и, как следствие, характеризуется снижением клинических симптомов, зависящих от воспалительных процессов, без влияния на ЦОГ-1 [3, 4].

ФБУ «ГИЛС и НП» была разработана пероральная форма на основе субстанции эторикоксиба – «Эторикоксиб», таблетки, покрытые пленочной оболочкой. При исследовании твердых лекарственных форм одним из важнейших показателей является определение активного компонента в лекарственной форме. Для количественного определения эторикоксиба в разработанной лекарственной форме предложен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Целью данного исследования является разработка методики количественного определения эторикоксиба в твердой лекарственной форме методом ВЭЖХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Для анализа использовались препарат – таблетки, покрытые пленочной оболочкой, и модельная смесь. Состав препарата на одну таблетку и состав модельной смеси представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Состав препарата «Эторикоксиб», таблетки 60 мг и модельной смеси

Компоненты	Содержание в таблетке, мг	Модельная смесь, мг
Эторикоксиб	60	–
Кальция гидрофосфат	60	428
Целлюлоза микроскопическая	74	529
Кроскармеллоза натрия	4,0	29
Магния стеарат	2,0	14
Масса ядра таблетки	200	1000
Оболочка опадрай, мг	8,0	–

Оборудование

При определении количественного содержания в препарате «Эторикоксиб, таблетки, покрытые оболочкой» методом ВЭЖХ хроматографическое разделение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Hitachi LaChrom Elite (Китай), оснащенном градиентным насосом, термостатом колонок и диодной матрицей.

Взвешивание образцов проводили на весах Secura 225D-10RU (Sartorius Lab Instruments GmbH, Германия).

Используемые реактивы

Стандартный образец – эторикоксиб (Kekule Pharma Limited, Индия, серия ACE-3 WS001/15, годен до 11.2018); эторикоксиб, субстанция-порошок (Kekule



Весы Secura 225D-10RU, Sartorius

Pharma LTC, серия ACE-0111G/ACE 1011G, годен до 10.2021); ацетонитрил (gradientgrade, ACS, Panreac, Германия, серия 361881.1611); вода очищенная.

Метод ВЭЖХ

Приготовление стандартного раствора эторикоксиба. Около 0,100 г стандартного образца эторикоксиба (предварительно высушенного при температуре 105 °С в течение 4 ч) помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в 40 мл подвижной фазы. Раствор доводят до метки тем же растворителем. Отбирают аликвоту исходного раствора 5 мл, помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в подвижной фазе, раствор доводят до метки тем же растворителем. Раствор фильтруют через мембранный фильтр Millex-PVDF с размером пор 0,45 мкм или аналогичный, отбрасывая первые порции фильтрата.

Приготовление рабочего раствора эторикоксиба. Около 0,100 г субстанции эторикоксиба (предварительно высушенного при температуре 105 °С в течение 4 ч) помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в 40 мл подвижной фазы. Раствор доводят до метки тем же растворителем. Отбирают аликвоту исходного раствора 5 мл, помещают в мерную колбу объемом 100 мл, растворяют в подвижной фазе, раствор доводят до метки тем же растворителем. Раствор фильтруют через мембранный фильтр Millex-PVDF с размером пор 0,45 мкм или аналогичный, отбрасывая первые порции фильтрата.

Приготовление испытуемого раствора препарата. Около 0,15 г (точная навеска) порошка измельченных таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 40 мл подвижной фазы. Раствор доводят до метки тем же растворителем. Отбирают аликвоту исходного испытуемого раствора 5 мл, помещают в мерную колбу объемом 50 мл, растворяют в подвижной фазе, раствор доводят до метки тем же растворителем. Раствор фильтруют через

мембрану Millex–PVDF с размером пор 0,45 мкм или аналогичную.

Приготовление раствора модельной смеси. Около 0,15 г (точная навеска) модельной смеси помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 40 мл подвижной фазы. Раствор доводят до метки тем же растворителем. Отбирают аликвоту исходного испытуемого раствора 5 мл, помещают в мерную колбу объемом 50 мл, растворяют в подвижной фазе, раствор доводят до метки тем же растворителем. Раствор фильтруют через мембрану Millex–PVDF с размером пор 0,45 мкм или аналогичную.

Приготовление подвижной фазы. Состав подвижной фазы: ацетонитрил – 0,05 М буферный раствор дигидрофосфата калия pH=4,2 (46:54). Подвижную фазу дегазируют, фильтруют через мембранный фильтр 0,45 мкм.

Условия хроматографирования

Для исследования были подобраны следующие хроматографические условия.

Колонка: Kromasil C8 250x4,6 мм, 10 мкм.

Температура колонки: 25±1 °С.

Детектор: УФ-спектрофотометрический, длина волны – 235 нм.

Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Подвижная фаза: Ацетонитрил – 0,05 М буфер дигидрофосфата калия pH = 4,2 (46:54).

Объем пробы: 25 мкл.

Время удерживания: 8,3 мин.

Время хроматографирования: 15 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидацию хроматографической методики определения эторикоксиба проводили по таким характеристикам, как специфичность, линейность, правильность, прецизионность [5].

Для установления специфичности анализировали стандартный образец, модельную смесь, субстанцию эторикоксиба, таблетки на основе эторикоксиба, покрытые пленочной оболочкой. Состав модельной смеси приведен в таблице 1. На полученных хроматограммах время удерживания раствора испытуемого препарата и рабочего раствора совпало со временем удерживания стандартного раствора и составляло 8,3 мин. На хроматограмме модельной смеси пика не наблюдалось. На рисунках 2–5 приведены хроматограммы испытуемых образцов. Испытуемые образцы и результаты представлены в таблице 2.

Линейность методики характеризуется наличием линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Для оценки линейности были использованы стандартные растворы с номинальными концентрациями от 50 до 150% от номинального значения 50 мкг/мл (таблица 3).

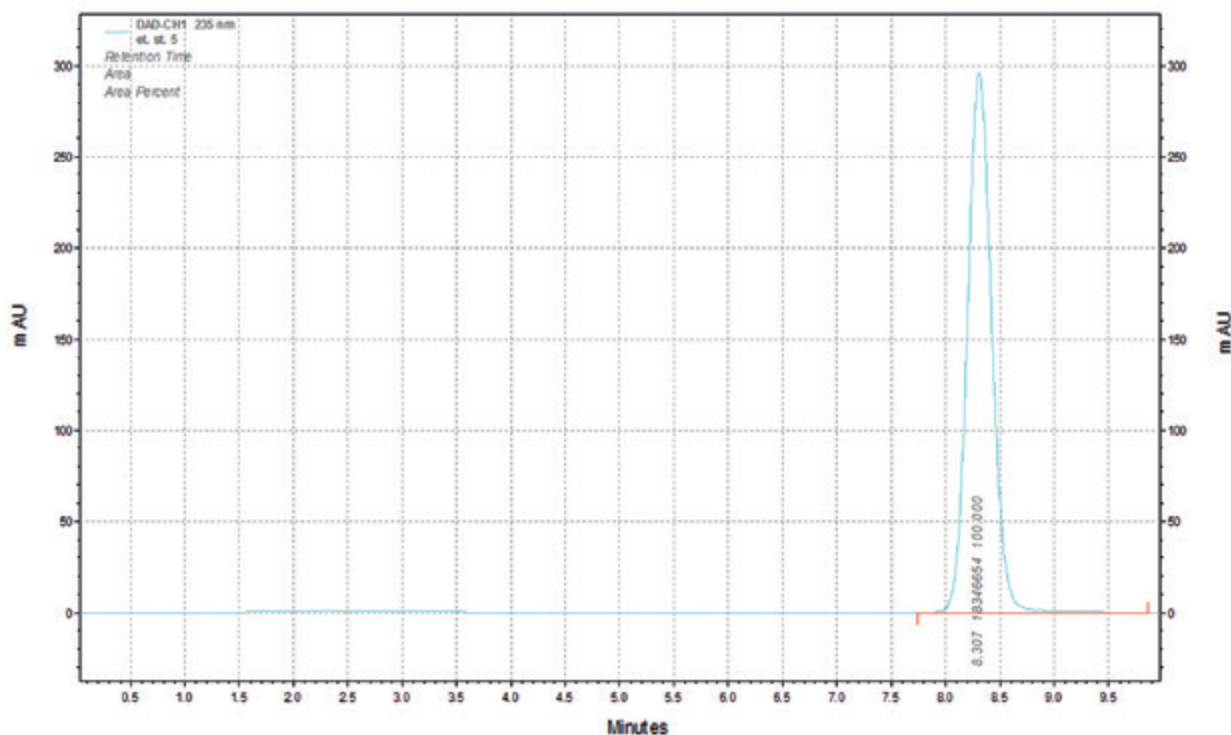


Рисунок 2. Хроматограмма стандартного образца эторикоксиба

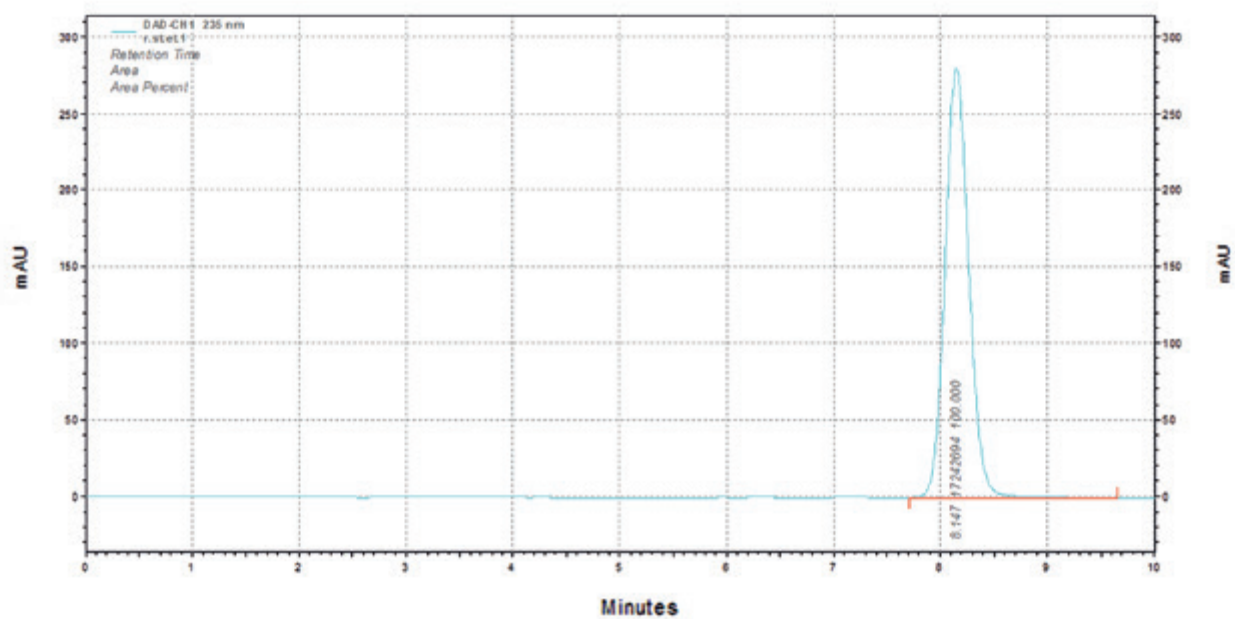


Рисунок 3. Хроматограмма субстанции эторикокиб

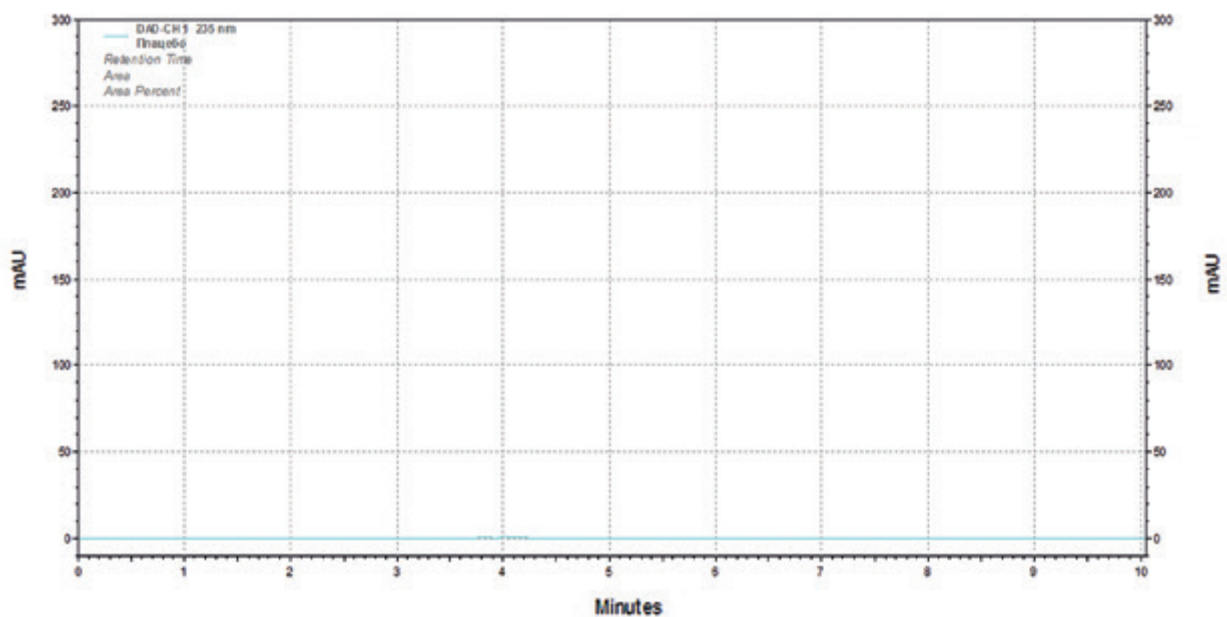


Рисунок 4. Хроматограмма модельной смеси

Таблица 2.

Данные для определения специфичности

№	Наименование образца	С, мкг/мл	Площадь пика, AU×с							Коэф. вариации
			A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{ср}	
1	Стандартный образец (стандартный раствор)	50,1	16,393	16,482	16,237	16,532	16,518	16,371	16,422	0,681
2	Субстанция (рабочий раствор)	52,1	17,993	17,917	17,993	17,930	17,894	17,872	17,993	0,281
3	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой		15,194	15,280	15,243	15,219	15,326	15,310	15,262	0,341
4	Модельная смесь	–	–	–	–	–	–	–	–	–

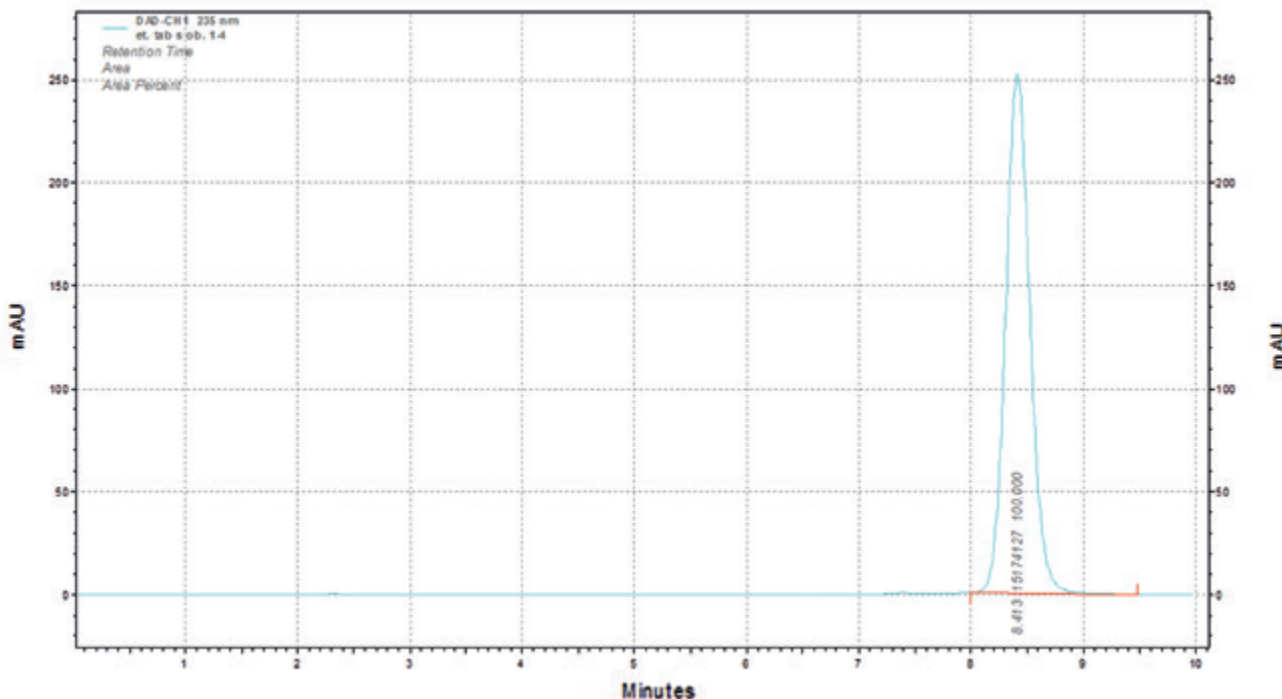


Рисунок 5. Хроматограмма препарата в форме таблеток, покрытых пленочной оболочкой

Таблица 3.

Данные для определения линейности графика зависимости концентрации эторикоксиба от площади пика

C, мкг/мл	Площадь пика, AU×с							Ст. откл	Коэф. вариации
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆	A _{ср}		
28,4	9,734	9,729	9,716	9,694	9,676	9,725	9,712	0,023	0,234
45,4	15,491	15,390	15,423	15,314	15,410	15,452	15,413	0,060	0,389
50,1	16,794	16,907	16,843	16,920	16,748	17,079	16,882	0,117	0,691
68,2	22,572	22,827	23,051	23,135	23,076	23,240	22,984	0,243	1,058
85,2	28,568	28,882	28,883	28,932	28,910	29,018	28,866	0,154	0,534

Установлено, что график зависимости имеет линейный характер в исследуемом диапазоне концентраций и описывается уравнением $y=0,337x+0,0691$. Полученные данные представлены на рисунке 6 в виде градуировочного графика с линией тренда, уравнения и коэффициента корреляции.

Повторяемость методики характеризует прецизионность методики при выполнении повторных испытаний в одинаковых рабочих условиях в пределах короткого промежутка времени. Сходимость была доказана при помощи испытаний субстанции эторикоксиба. Оценка проводилась путем расчета процента известной концентрации, стандартного отклонения, относительного стандартного отклонения, относительной погрешности и доверительного интервала. Результаты определения сходимости представлены в таблице 4.

Относительное стандартное отклонение параллельных определений для 6 измерений составило 0,253%.

Промежуточная прецизионность характеризует влияние вариаций внутри лаборатории на результаты идентичных образцов, отобранных из одной и той же серии. Оценка проводилась путем расчета процен-

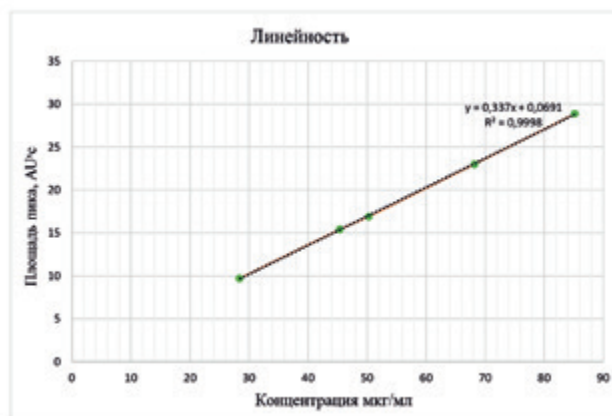


Рисунок 6. График зависимости концентрации от площади пика для эторикоксиба

та известной концентрации, стандартного отклонения, относительного стандартного отклонения, относительной погрешности и доверительного интервала. Результаты определения внутрилабораторной прецизионности двух аналитиков в разные дни представлены в таблице 5.

Таблица 4.

Повторяемость

№	A, АУХс	C, мкг/мл	Среднее, X _{ср}	σ	ε, %	Доверительный интервал	RSD [%]
1	17,049	50,38	50,42	0,050	0,25	50,42±0,11	0,253
2	17,075	50,46					
3	17,050	50,39					
4	17,083	50,49					
5	17,063	50,43					
6	17,041	50,36					

Таблица 5.

Промежуточная прецизионность

	№	A, АУХс	C, мкг/мл	Среднее	σ	ε, %	Доверительный интервал	RSD [%]
Первый химик	1	17,049	50,38	50,42	0,050	0,25	50,42±0,11	0,253
	2	17,075	50,46					
	3	17,050	50,39					
	4	17,083	50,49					
	5	17,063	50,43					
	6	17,041	50,36					
Второй химик	1	16,871	49,86	49,90	0,162	2,16	49,90±0,33	0,325
	2	16,847	49,78					
	3	16,825	49,72					
	4	16,963	50,13					
	5	16,872	49,86					
	6	16,941	50,07					

Относительное стандартное отклонение при определении внутрилабораторной прецизионности составило не более 2%.

Правильность аналитической методики выражает близость между принятым истинным и полученным значением. Правильность выражают величиной открываемости – соотношением между полученным средним и истинным значением с учетом соответствующих доверительных интервалов.

Проводили анализ путем разбавления стандартного раствора. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6.

Процент открываемости эторикоксиба (правильность)

Уровень концентрации	A, АУХс	Найдено C, мкг/мл	Среднее	RSD [%]	Процент открываемости
80%	14,900	40,60	40,65	0,844	101,625
	14,971	40,84			
	14,727	40,52			
100%	18,462	50,75	50,82	0,487	101,640
	18,579	51,05			
	18,402	50,65			
120%	22,086	60,90	60,98	0,136	101,633
	22,091	61,26			
	22,037	60,78			

Процент открываемости составляет от 101,625% до 101,640%.

Аналитический диапазон методики соответствует диапазону линейности и составляет от 25 до 85 мкг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика определения эторикоксиба в таблетках методом ВЭЖХ. Проведена валидация разработанной аналитической методики, по результатам которой показана возможность ее применения для контроля качества твердой лекарственной формы эторикоксиба по показателю «количественное определение», что соответствует поставленной задаче. Методика обладает достаточной точностью и селективностью, диапазон концентраций составляет от 50 до 150% от номинального значения 50 мкг/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. A.M. Kaushal, A.K. Chakraborti, A.K. Bansal. FTIR Studies on Differential Intermolecular Association in Crystalline and Amorphous States of Structurally Related Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19434918> (дата обращения 10.01.2018).
2. P.S. Gangane, S.M. Bagde, S.G. Mujbaile, K.D. Niranjane. Development and Validation of HPLC Assay Method for Etoricoxib in Bulk Drug and Tablet Formulation. URL: <http://www.ijser.in/archives/v2i6/SjIwMTMzMDk=.pdf> (дата обращения 10.01.2018).
3. B. Hinz, K. Brune. Cyclooxygenase-2 – 10 years later // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002. № 300(2). P. 367–375.
4. H. Vanegas, H. Schaible. Prostaglandins and cyclooxygenases [correction of cycloxygenases] in the spinal cord // Prog. Neurobiol. 2001. № 64(4). P. 327–363.
5. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик / Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1. С. 222.