

УДК 615.225.2:54.062:543.544.5.068.7

ВЕРИФІКАЦІЯ ВЕРХ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АМЛОДИПІНУ В ТАБЛЕТКАХ

Ханін¹ В. А., Комарицький І. Л., Бевз Н. Ю.,
Георгіянц В. А.

¹ВАТ Фармкомпанія «Здоров'я», м. Харків
Національний фармацевтичний університет, м.
Харків

Була проведена верифікація методики кількісного вмісту амлодипіну бесилату в таблетках методом ВЕРХ. В процесі верифікації методики кількісного визначення амлодипіну бесилату в таблетках були вивчені деякі валідаційні характеристики: правильність, лінійність, прецизійність, специфічність та внутрішньолабораторну прецизійність. Валідаційні характеристики методики не перевищують критичного значення похибки (1,6%) і характеризуються якісними аналітичними показниками. Дана методика може бути коректно відтворена в умовах лабораторій.

Амлодипін ((±)-2-[(2-аміноетокси)метил]-4-(2-хлорфеніл)-1,4-дигідро-6-метил-3,5-піридин дикарбонової кислоти 3-етил 5-метиловий ефір) у вигляді бесилату та малеату належить до групи пролонгованих вибіркового блокаторів кальцієвих каналів, похідних дигідропіридину. У медичній практиці застосовується як антиангінальний та гіпотензивний засіб для лікування серцево-судинних захворювань. Його випускають у вигляді порошку-субстанції, а також готових лікарських форм (таблетки по 2,5, 5 та 10 мг) [4].

У науковій літературі описані методики кількісного визначення препарату методом спектрофотометрії – за власним світлопоглинанням [1, 14, 16] та за продуктом реакції з алоксаном [7, 8], методами хроматографії [6, 9, 14, 15], кінетико-спектрофотометричним методом у субстанції та лікарських препаратах [12], а також методами хроматомас-спектрометрії [5] та інверсійної вольтамперометрії [13]. Для кількісного визначення амлодипіну бесилату фармакопея Великобританії [10] та Європейська фармакопея [11] рекомендують використовувати метод рідинної хроматографії.

У зв'язку зі створенням другого видання ДФУ і включенням до його складу статей на готові

лікарські засоби, ми поставили собі за мету проаналізувати валідаційні характеристики кількісного хроматографічного визначення амлодипіну бесилату в таблетках та провести верифікацію аналітичної методики.

Матеріали та методи

При проведенні досліджень використовували субстанцію амлодипіну бесилату серія № АВ0401013. Аналізу підлягали таблетки «Амлодипін-Здоров'я» серія № 20113 виробник ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я».

Застосовували таке аналітичне обладнання: хроматограф 2695 з діодноматричним детектором 2996 фірми Waters Corp. USA з використанням колонки Nova-Pak C18 300 x 3,9 мм з розміром часток 4µm, ваги ER-182 фірми AND Japan, мірний посуд класу А.

Приготування випробовуваного розчину. До точної наважки порошку таблеток, еквівалентної 50 мг амлодипіну, додають 30 мл метанолу, струшують протягом 30 хв, доводять об'єм розчину метанолом до 50,0 мл і фільтрують. 5 мл одержаного розчину доводять метанолом до об'єму 100,0 мл.

Приготування розчину стандартного зразку (СЗ) амлодипіну бесилату. 50,0 мг СЗ амлодипіну розчиняють у метанолі і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл. 5,0 мл одержаного розчину доводять метанолом до об'єму 100,0 мл.

Перед проведенням основних валідаційних випробувань контролювали наявність документів, що засвідчують придатність використаного обладнання, сировини та реактивів.

Валідація методики здійснювалась відповідно до вимог ДФУ [2, 3].

Результати та їх обговорення

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- рухома фаза: ацетонітрил для хроматографії – метанол – розчин триетиламіну (15:35:50), дегазована УЗ методом;
- детектування за довжини хвилі 237 нм;
- швидкість рухомої фази 1,0 мл/хв.

Для опрацювання методу нами було одержано та проаналізовано хроматограми стандартного розчину амлодипіну бесилату (рис. 1) та досліджуваного розчину амлодипіну бесилату (рис. 2), характер залежності інтенсивності піків від часу утримання.

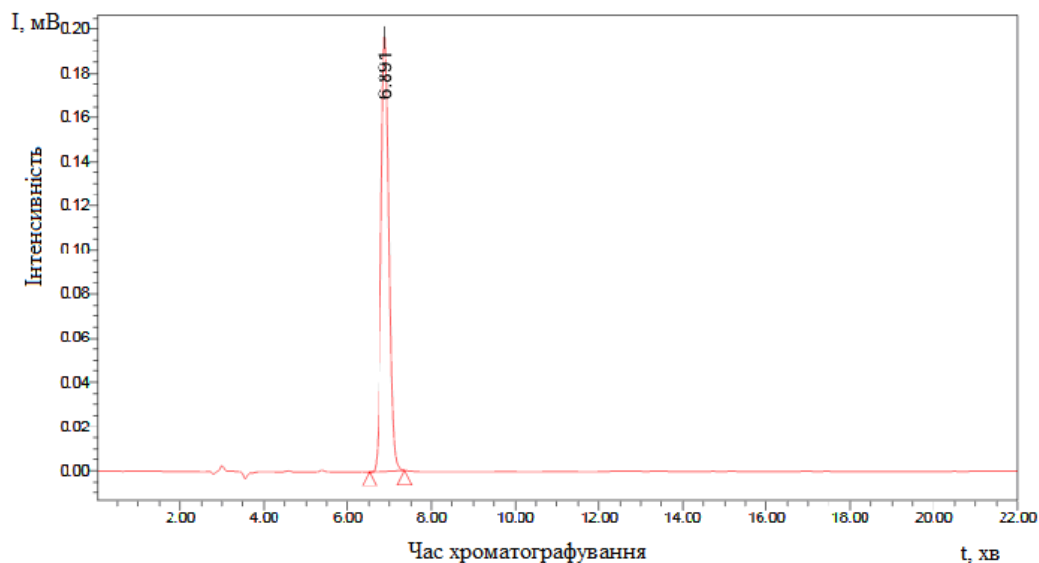


Рис.1. Хроматограма стандартного розчину амлодипіну бесилату

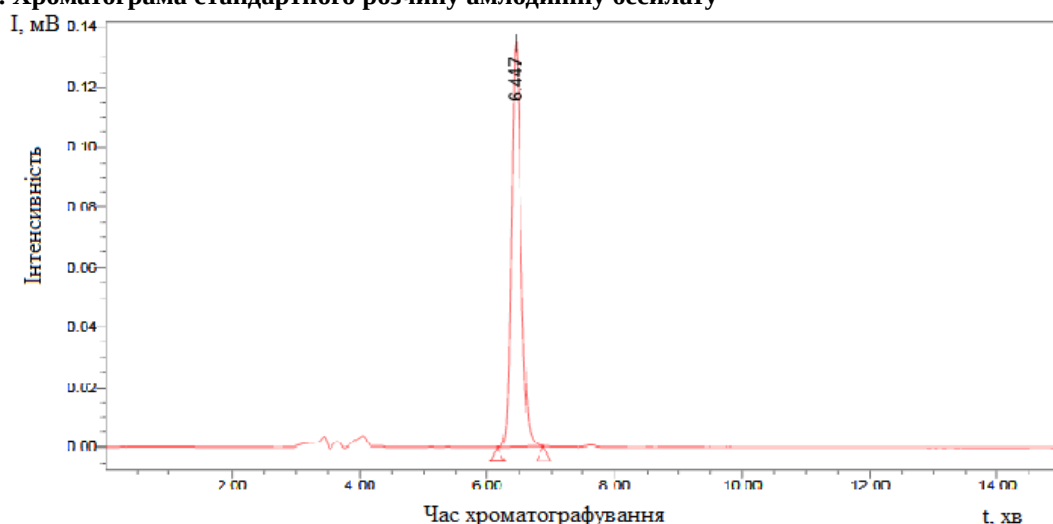


Рис.2. Хроматограма досліджуваного розчину амлодипіну бесилату

Результати аналізу вважаються вірогідними, якщо виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи». Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови:

- коефіцієнт розподілу, розрахований за піком амлодипіну бесилату на хроматограмі СЗ амлодипіну бесилату, має бути не менше 1,0;
- коефіцієнт симетрії піку, розрахований за піком амлодипіну бесилату на хроматограмі СЗ амлодипіну бесилату, має бути від 0,8 до 1,5.

Отримані нами результати свідчать про відтворюваність методики, оскільки поглинання допоміжних речовин не впливає на результати аналізу.

Верифікація методики кількісного визначення амлодипіну бесилату в таблетках проводилась за окремими валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, збіжність, прецизійність, правильність та внутрішньолабораторна прецизійність.

Для оцінки похибки прободготовки випробовуваного розчину та розчину стандарту, були

розраховані теоретичні значення невизначеності аналітичної операції, яка склала $\Delta_{sp}=1,06 \% \leq B \cdot 0,32 = 1,6 \%$. Отже, розрахована невизначеність прободготовки й аналізу в цілому мають забезпечити достатню точність вимірювань.

Оскільки використовуваний у методиці метод вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) є специфічним, для доказу того, що методика є специфічною достатньо щоб виконувались усі вимоги до критеріїв лінійності, правильності, прецизійності та внутрішньолабораторної прецизійності.

Розчини для хроматографування готували за наведеною аналітичною методикою.

Оцінку лінійності проводили на всьому діапазоні застосування методики за методом стандарту. Вивчення характеру залежності оптичної густини від концентрації проводили, використовуючи 9 модельних розчинів для аналізу з точними наважками концентрацій: 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 і 120%.

Одержані результати були статистично оброблені методом найменших квадратів згідно з

вимогами ДФУ. Побудову калібрувального графіка проводили в нормалізованих координатах (рис. 2). Для кожного з дев'яти розчинів зразка розраховували середні значення площі піку (S_i). Одержані результати обробляли методом найменших квадратів для прямої $Y = b \cdot x + a$ (рис. 3). Розраховані статистичні величини

b , S_b , a , S_a , S_r (остаточне стандартне відхилення) та r (коефіцієнт кореляції) наведені на рис. 3 та в табл. 1.

Вимоги до параметрів лінійної залежності в нашому випадку виконуються на всьому діапазоні застосування методики (80 – 120%).

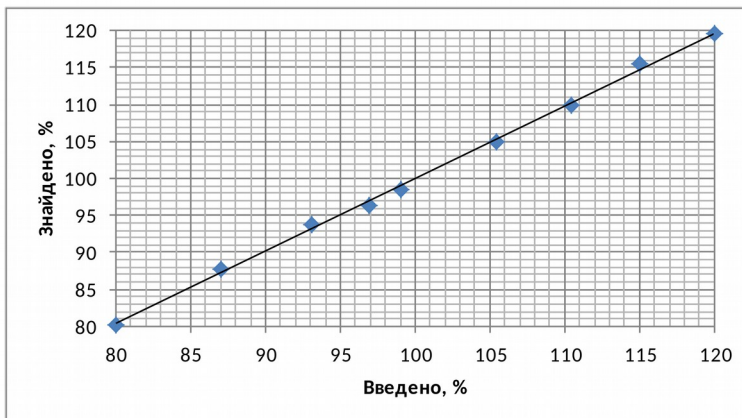


Рис.3. Лінійна залежність площі піку від концентрації амлодипіну бесилату в нормалізованих координатах

Таблиця 1 – Характеристики лінійної залежності

Величина	Значення	Критерій (для допусків від 95 % до 105 %, $g = 9$)	Висновок
b	0,9845	-	-
S_b	0,01473	-	-
a	1,5282	1) $\leq 1895 S_a = 2,83$, 2) якщо не виконується 1), то $\leq 2,6$	Відповідає
S_a	1,4956	-	-
S_0	0,5486	$< 0,84$	Відповідає
r	0,9992	$\geq 0,9981$	Відповідає

Для проведення вимірів та розрахунку метрологічної оцінки збіжності і правильності методики було одержано три значення площ піків для розчину порівняння та 27 значень площ піків для модельних розчинів. Розраховували фактичні величини ($X_{i\text{факт}}$), відношення середніх значень площ піків для кожного з 27 розчинів до середнього

значення площі піку розчину порівняння, одержуючи величини $X_i = (C_i/C_{st}) \cdot 100\%$, $Y_i = (S_i/S_{st}) \cdot 100\%$, а також величину $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$, яка є знайденою концентрацією у відсотках до введеної. Результати розрахунків наведені в табл. 2.

Таблиця 2 – Результати аналізу модельних розчинів та їх статистична обробка

№ модельного розчину	Введено, у % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Середні площі піків (S_i) ($S_{st} = 1395946$)	Знайдено, у % до концентрації розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	Знайдено, у % до введеного ($Z_i = Y_i/X_i$, %)
1	80,00	1117874	80,08	100,10
2	86,99	1223965	87,68	100,78
3	93,05	1309677	93,82	100,82
4	96,96	1346390	96,45	99,48
5	99,00	1375007	98,50	99,50
6	105,45	1465743	105,00	99,57
7	110,50	1535541	110,00	100,46
8	115,00	1612457	115,51	100,45
9	120,00	1669691	119,61	99,67
Середнє, Z , %				100,09
Відносне стандартне відхилення, RSD_z , %				0,55

Відносний довірчий інтервал, $\Delta Z(\%) = t(95\%, n-1) \times RSD_z = 1,860 \times RSD_z, \%$	1,03
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta A_s, \%$ (допустима невизначеність)	1,6
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $	0,09
Критерій незначущості систематичної похибки 1) статистична незначущість: $\delta \% \leq 1,03/3 = 0,34 (0,09 < 0,348)$ якщо не виконується вимога до критерію 1), то: 2) практична незначущість: $\delta \% \leq 0,32 \times 1,6 = 0,51 \% (0,09 < 0,51)$	виконується
Загальний висновок про методику	коректна

Для оцінки внутрішньолaboratorної прецизійності використовували відносний довірчий інтервал для 5 паралельних визначень кількісного вмісту речовин, що має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta_z \leq 1,6 \%$. Випробування проводили із використанням однієї серії препарату різними аналітиками на одному хроматографі у різні дні із використанням різного мірного посуду

Внутрішньолaboratorну прецизійність підтверджено тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату задовольняє критерію прийнятності ($\Delta_z = 0,22 \% \leq 1,6 \%$).

Висновки

- У процесі верифікації методики кількісного визначення амлодипіну бесилату в таблетках були вивчені валідаційні характеристики ВЕРХ методики: правильність, лінійність, прецизійність, специфічність та внутрішньолaboratorну прецизійність.
- Валідаційні характеристики методики не перевищують критичного значення похибки (1,6 %) і характеризуються якісними аналітичними показниками. Дана методика може бути коректно відтворена в умовах лабораторій, і не залежить від допоміжних речовин.

Література

- Burlaka Yu.V. Amlodipine besylate Spectrophotometric determination of substance / Yu.V.Burlaka and others. // Zaporozhye honey. Zh. - 2011 - T.13, №2. - P. 50-52.
- Grizodub, AI Standard validation procedures of quality control methods drugs / AI Grizodub // Farmakom. - 2006. - № 1/2. - P. 35-44.
- State Pharmacopoeia of Ukraine / State Enterprise "Scientific and Expert Pharmacopoeial Centre." - 1st ed. - H. : State Enterprise "Scientific-Expert Pharmacopoeial Centre", 2008 - 620 p.
- Compendium 2009 - Pharmaceuticals Preparations. In 2 vols. / Ed. V.N.Kovalenko, A.P.Vyktorova. - K. : MORYON, 2009 - 2224s.
- Definition amlodipine content in plasma by gas chromatography-tandemnoy spektrometriyu / I. I. Miroschnichenko et al. // HFZH. - 2008. - №8. - P. 54-56.
- Tymoshyk, V. Aloxan application as detecting reagent for amlodipine besylate / UV Tymoshyk, V. Petrenko // Farm. Zh. - 2009. - №5. - S. 104-106.
- Tymoshyk, UV method development and validation of quantitative determination of amlodipine besylate tablets /

UV Tymoshyk, V. Petrenko // Farm. Zh. - 2006. - №6. - P. 62-68.

8. Tymoshyk, UV method development and validation of quantitative determination of amlodipine besylate tablets / UV Tymoshyk, V. Petrenko // Farm. Zh. - 2006. - №6. - P. 62-68.

9. Argekar, A. P. Simultaneous determination of atenolol and amlodipine in tablets by high-performance thin-layer chromatography / A. P. Argekar, S. G. Powar // J. Pharm. Biomed. Anal. - 2000. - V.21. - P. 1137-1142.

10. British Pharmacopoeia. - London: The Stationary Office, 2009. - Vol. 1, 2. - 6481 p.

11. European Pharmacopoeia. - 6th ed. - Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines. - 2008. - 2416 p.

12. Hemmateenejad, B. A kinetic spectrophotometric method for determination of amlodipine and nifedipine in pharmaceutical preparations / B. Hemmateenejad, R. Miri, R. Kamali // J. Iran. Chem. Soc. - 2009. - №1 (6). - P. 113-120.

13. Kazemipour, M. Use of adsorptive square-wave anodic stripping voltammetry at carbon paste electrode for the determination of amlodipine besylate in the pharmaceutical preparations / M. Kazemipour // Журнал аналит. химии. - 2009. - Т.64, №1. - С. 74-79.

14. Determination of amlodipine in pharmaceutical dosage forms by liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry / M. D. Malesuik et al. // J. Pharm. Biomed. Anal. - 2005. - V.89, №2. - P. 359-364.

15. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of amlodipine and benazepril hydrochloride from their combination drug product / K.Raghu Naidu et al. // J. Pharm. Biomed. Anal. - 2005. - V.39. - P. 147-155.

16. Simultaneous estimation of amlodipine besilate and olmesartan medoxomil in pharmaceutical dosage form / S.B.Wankhede et al. // Indian J. Pharm. Sci. - 2009. - V.71, №5. - P. 563-567.

UDC 615.225.2:54.062:543.544.5.068.7

VERIFICATION HPLC METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMLODIPINE IN TABLETS

Khanin V. A., Komarytsky I. L., Bezv N. Yu., Georgiyants V. A.

Introduction. Amlodipine ((±)-2-[(2-aminoetoksi)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-1,4-dihydro-6-methyl-3,5-pyridine dicarboxylic acid 3-ethyl 5-methyl ester) as besylate and small tally belongs to the group of selective long-acting calcium channel blockers,

dihydropyridine derivatives. In clinical practice, as antianginal and antihypertensive agent for the treatment of cardiovascular diseases. It is produced in powder form, substance and finished dosage forms (tablets of 2.5, 5 and 10 mg). The scientific literature describes methods of quantitative determination of the drug by spectrophotometry – by his own light absorption and by reaction product with aloksan, chromatography techniques, kinetic-spectrophotometric method in substances and preparations and methods chromatomass spectrometry and stripping voltammetry. For the quantitative determination of amlodipine besylate British Pharmacopoeia and European Pharmacopoeia recommend the use of liquid chromatography method. In connection with the establishment of the second edition of SPhU and when it is comprised of articles on the finished product, we set out to analyze the characteristics of the validation of chromatographic quantitative determination of amlodipine besylate tablets and to verify the analytical procedure.

Material & methods. In conducting research using substance amlodipine besylate series number AB0401013. Analysis subject pill “Amlodipine” series number 20113 manufacturer of “Pharmaceutical company “Zdorovye”. Analytical equipment used is: 2695 chromatograph with diode array detector 2996 firms Waters Corp. USA using column Nova-Pak C18 300 x 3,9 mm with a particle size of 4 μm , weight ER-182 company AND Japan, measuring vessel class A. Preparation of the test solution. To accurately sample powder tablets equivalent to 50 mg amlodipine, add 30 ml of methanol, shake for 30 minutes, dilute the solution to 50.0 ml with methanol and filtered. 5 ml of methanol solution adjusted to a volume of 100.0 ml. Preparation of the working standard solution sample amlodipine besylate. 50.0 mg of amlodipine RCC dissolved in methanol and dilute with the same solvent to 50.0 ml. 5.0 ml of this solution argue with methanol to volume 100.0 ml. Before the major controlled trials validated the existence of documents certifying the suitability vykorystovanoho equipment, raw materials and chemicals. Validation of the methodology was carried out in accordance with the requirements of SPhU.

Results & discussion. Linearity methods defined within 80-120% of nominal concentrations. The linearity of the methods supported by the entire range of concentrations studied ($b=0.9845$, $S_b=0,01473$, $a=1.5282$, $S_a=1.4956$, $S_0=0.5486$, $r=0.9992$). It is proved that the validated method characterized by sufficient convergence and accuracy over the entire range of concentrations ($\Delta Z=1.03$, $\delta\%=0.09$).

Conclusion. During verification methods of quantitative determination of amlodipine besylate tablets were studied characteristics validated HPLC method: accuracy, linearity, precision, specificity, and internal laboratory precision. Validation technique characteristics do not exceed the critical value of error (1.6%) and characterized by qualitative analytical indicators. This technique can be correctly reproduced in the laboratory conditions, and is independent of the excipients.