

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМБРОКСОЛА ГИДРОХЛОРИДА И ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ В СИРОПЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ

© Мцариашвили М.Р.¹, Гармонов С.Ю.¹, Нигматуллина Р.И.², Егорова С.Н.³

¹ Кафедра аналитической химии, сертификации и менеджмента качества Казанского национального исследовательского технологического университета, Казань;
² исследовательский отдел ОАО «Татхимфармпрепараты», Казань;
³ кафедра фармации Казанского государственного медицинского университета, Казань
E-mail: m.r.mtsariashvili@yandex.ru

Разработана методика количественного определения амброксола гидрохлорида в лекарственной форме в виде сиропа с одновременным определением посторонних примесей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием. Установлены условия хроматографического разделения при использовании градиентного режима элюирования. Проведена валидация разработанной методики. Оценена специфичность методики в отношении влияния растворителя, плацебо и натрия бензоата. Предел количественного определения составил 0,072 мкг/мл. Линейность определялась на восьми уровнях концентраций амброксола гидрохлорида в растворе. Оценены показатели: правильность, прецизионность (сходимость, внутрилабораторная прецизионность). Доказана возможность применения методики при контроле качества лекарственного препарата. Разработанная методика включена в проект фармакопейной статьи предприятия.

Ключевые слова: амброксола гидрохлорид, посторонние примеси, сироп, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация, контроль качества.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD OF DETERMINING AMBROXOL HYDROCHLORIDE AND IMPURITIES IN SYRUP WITH HPLC

Mtsariashvili M.R.¹, Garmonov S.Yu.¹, Nigmatullina R.I.², Egorova S.N.³

¹ Department of Analytical Chemistry, Certification and Quality Management of Kazan National Research Technological University, Kazan;

² Research Department of Public Corporation «Tatkhimfarmpreparaty», Kazan;

³ Pharmacy Department of Kazan State Medical University, Kazan

A method is developed for the quantitative analysis of ambroxol hydrochloride in dosage form as syrup with simultaneous determination of impurities by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. Conditions of chromatographic separation in gradient elution mode are established. Validation of the developed method was carried out in terms of specificity with respect to solvent and placebo effects, as well as the influence of sodium benzoate. The limit of detection was 0.072 µg mL⁻¹. Linearity was determined with eight values of concentration of ambroxol hydrochloride in solution. The accuracy and precision (repeatability, in-lab precision) of the method were also evaluated. The applicability of the method for quality control of drugs was demonstrated. The proposed method was included in the Pharmacopeia.

Keywords: ambroxol hydrochloride, impurities, syrup, high-performance liquid chromatography, validation, quality control.

В фармацевтической промышленности с целью обеспечения эффективности и безопасности лекарственных препаратов необходимо разрабатывать и совершенствовать методы, которые применяются для качественного и количественного анализа многокомпонентных смесей. Внедряются современные инструментальные методы анализа, и в первую очередь, хроматографические методы – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газо-жидкостная хроматография (ГЖХ) и высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ). Актуальность разработки и совершенствования методик с применением этих методов обусловлена широким ассортиментом лекарственных препаратов, их многокомпонентностью [1-3].

Для амброксола разработаны методы хроматографического определения в биологических жидкостях [4-6]. Однако при разработке методик количественного определения и определения посторонних примесей в многокомпонентных лекарственных формах необходимо в одну стадию контролировать содержание одного-двух компонентов с сопоставимыми количествами и хроматографическими свойствами. Современный уровень хроматографической техники (насосов высокого давления с точным расходом подвижной фазы (ПФ), высокочувствительных детекторов, эффективных сорбентов новых типов) обеспечивает эффективный анализ многокомпонентных смесей за счет применения градиентного режима и расширения перечня факторов оптимизации. Важной проблемой,

требующей поиска оптимальных решений, является пробоподготовка многокомпонентных аналитов для обеспечения оптимальной нагрузки на колонку и устранения мешающего влияния взаимодействия между компонентами препаратов. Целью исследования являлась разработка методики одновременного определения амброксола гидрохлорида и посторонних примесей методом ВЭЖХ для выпускаемого дженерикового лекарственного препарата в соответствии с требованиями безопасности Федерального закона Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на хроматографе с диодно-матричным детектором SPD-M20A, насосом LC-20AD, термостатом колонок CTO-20AC и автоматическим дозатором проб SIL-20A "Shimadzu", Япония), на колонке Symmetry

Shield™ RP 18 (длина 250 мм, диаметр 4,6 мм, частицы 5 мкм).

При разработке методики количественного определения и определения посторонних примесей использовали образцы лекарственного препарата, модельные смеси из рабочих субстанций и стандартные образцы (СО) (таблица 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено влияние растворителя, плацебо и натрия бензоата, при этом удалось получить разделение компонентов с наиболее приемлемой селективностью. Для разделения посторонние примеси дополнен тест «Проверка пригодности хроматографической системы» приготовлением и хроматографированием раствора, содержащего СО амброксола гидрохлорида в концентрации, соответствующей пределу количественного определения хроматографической системы.

Таблица 1

Используемые материалы

Наименование	Производитель	Нормативный документ
Амброксол сироп 3 мг/мл	ОАО «Татхимфармпрепараты»	
Амброксола гидрохлорид		EP CRS
Натрия бензоат		USP RS
Амброксола гидрохлорид	Корес (Индия) Лимитед, Индия	НД 42-15657-08
Натрия бензоат	Emerald Perfomance Materials	Eur.Ph
Сорбитол	ООО Компания «Сладкий мир», Россия	ТУ 9197-008-72315488-2010
Кислота лимонная моногидрат	«Weifang Ensign Industry CO.Ltd», Китай	Eur.Ph.
Натрия цитрата пентосесквигидрат	ЗАО «Унихим», Россия	ГОСТ 22280-76
Пропиленгликоль	"The Dow Chemical Company", Германия	USP
Рибофлавин	«ДСМ Нутришнл Продактс ГмбХ», Германия	П №013595/01-091111
Ароматизатор фруктовый	ООО «Комбинат химико-пищевой ароматики», Россия	ТУ 9154-008-00334557-96
Вода очищенная	ОАО «Татхимфармпрепараты»	ФС 42-2619-97

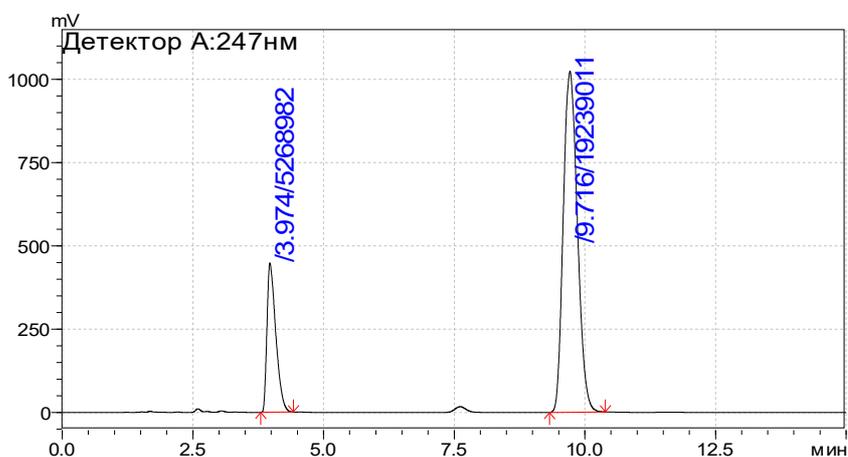


Рис. 1. Хроматограмма испытуемого раствора сиропа амброксола 3 мг/мл серия 50313.

Нормирована величина отношения сигнал/шум, определяемая по хроматограмме раствора СО амброксола гидрохлорида. Разрешающая способность хроматографической системы определена с использованием раствора, содержащего в своем составе СО амброксола гидрохлорида и примеси В. Раствор примеси В получен в соответствии с монографией 01/2011:1489 EP 7.2. Методика дополнена ориентировочными относительными временами удерживания всех пиков компонентов «плацебо», которые не следует учитывать при определении посторонних примесей.

По разделу количественное определение была проведена проверка пригодности хроматографической системы и включены нормы для фактора асимметрии пиков амброксола гидрохлорида и бензоата. Фактически на хроматограмме испытуемого раствора (рис. 1) присутствовал пик с относительным временем удерживания около 0,88 и относительной площадью 1,2%, не полностью разделяющийся с пиком основного вещества, а также несколько пиков с относительным временем удерживания от 0,6 до 0,7.

Методика определения. 2 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл растворителя, доводят объем растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм.

Условия хроматографирования:

- металлическая колонка, заполненная сорбентом C₁₈ с размером частиц 5 мкм (250 мм × 4,6) (например Symmetry Shield™ RP 18 или аналогичная);

- подвижная фаза: ацетонитрил (В) и раствор аммония фосфата с рН 7,0 (А);

- объем пробы – 20 мкл;

- скорость потока – 1 мл/мин;

- детектор – спектрофотометрический, 248 нм;

- температура колонки – 20°C.

Градиентный режим:

Время, мин	ПФ А, %	ПФ В, %
0-4	85	15
4-7	85 → 56	15 → 44
7-24	56	44
24-30	56 → 85	44 → 15
30-40	85	15

Время хроматографирования 40 мин. Возможна корректировка подвижной фазы, чтобы выполнялся тест «Проверка пригодности хроматографической системы». Растворитель, раствор В СО, раствор Д СО, испытуемый раствор и раствор для проверки пригодности хроматографической системы вводят не менее 3 раз. Регистрируют хроматограммы. Содержание неидентифицированной

примеси в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 1 \cdot 3 \cdot 25 \cdot 100}{S_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 3,0} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 0,00005}{S_0},$$

где

S₁ – площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

S₀ – площадь пика амброксола гидрохлорида на хроматограмме раствора В СО;

a₀ – навеска СО амброксола гидрохлорида, в миллиграммах;

3,0 – содержание амброксола гидрохлорида в 1 мл препарата, в миллиграммах;

P – содержание основного вещества в СО амброксола гидрохлорида, в процентах.

Содержание единичной неидентифицированной примеси должно быть не более 0,3%. Сумма неидентифицированных примесей должна быть не более 1%. При этом не учитывают пики площадью менее 0,1 площади основного пика на хроматограмме раствора В СО амброксола гидрохлорида (0,03%). Не учитывают пики ввода до 3,8 мин и около 10,0 мин до 13,0 мин; пик растворителя с относительным временем удерживания около 0,9; пик бензоата с относительным временем удерживания около 0,2; пики рибофлавина с относительными временами удерживания около 0,5 и 0,7; пики ароматизатора фруктового с относительными временами удерживания около 0,6 и 0,85.

Результаты испытания считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Приготовление раствора СО амброксола гидрохлорида. Около 60 мг (точная навеска) амброксола гидрохлорида (BP CRS, EP CRS, FCO ГФУ) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 60 мл растворителя, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (раствор Б). 3 мл раствора Б помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (раствор В). 1 мл раствора В помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают (раствор Д). Растворы используют свежеприготовленными.

Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Около 5 мг (точная навеска) амброксола гидрохлорида (BP CRS, EP CRS, FCO ГФУ) растворяют в 0,2 мл метанола и прибавляют

0,04 мл смеси формальдегид – вода (1:99). Нагревают при температуре 60°C в течение 5 мин. Высушивают досуха воздухом. Остаток растворяют в 5 мл воды и доводят объем раствора растворителем до 20 мл. Перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Раствор готовить непосредственно перед определением.

Приготовление раствора аммония фосфата с рН 7,0. 1,32 г аммония фосфата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл воды, доводят значение рН до 7,0 (потенциометрически) с помощью ортофосфорной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление растворителя. 500 мл ацетонитрила помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят раствором аммония фосфат с рН 7,0 до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если:

- разрешение между пиками амброксола гидрохлорида и примеси В – не менее 4;
- эффективность колонки по пику амброксола гидрохлорида не менее 2000 теоретических тарелок;
- относительные времена удерживания: амброксола гидрохлорида – 1,0, примеси В – около 1,1;
- отношение сигнал/шум для пика амброксола гидрохлорида на хроматограмме раствора Д СО – не менее 3;
- фактор асимметрии пика амброксола гидрохлорида на хроматограмме раствора В СО – не более 2,0.
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное по площади пика амброксола гидрохлорида на пяти хроматограммах раствора В СО амброксола гидрохлорида, – не более 2%.

Количественное определение амброксола гидрохлорида проводят методом ВЭЖХ одновременно с определением посторонних примесей.

Растворитель, раствор СО и испытуемый раствор вводят не менее 3 раз. Регистрируют хроматограммы.

Содержание амброксола гидрохлорида в 1 мл препарата в миллиграммах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 10 \cdot 25}{S_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 2} = \frac{S_1 \cdot a_0 \cdot P \cdot 0,0005}{S_0}, \text{ где}$$

S_1 – площадь пика амброксола гидрохлорида на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика амброксола гидрохлорида на хроматограмме раствора СО;

a_0 – навеска СО амброксола гидрохлорида, в миллиграммах;

P – содержание основного вещества в СО амброксола гидрохлорида, в процентах.

Содержание амброксола гидрохлорида в 1 мл препарата должно быть от 2,7 до 3,3 мг/мл.

Результаты испытания считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Приготовление раствора СО амброксола гидрохлорида. Около 60 мг (точная навеска) амброксола гидрохлорида (BP CRS, EP CRS, FCO ГФУ) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 60 мл растворителя, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление раствора аммония фосфата с рН 7,0. 1,32 г аммония фосфата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл воды, доводят значение рН до 7,0 (потенциометрически) с помощью ортофосфорной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

Приготовление растворителя. 500 мл ацетонитрила помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят раствором аммония фосфата с рН 7,0 до метки. Раствор используют свежеприготовленным.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если:

- эффективность колонки по пику амброксола гидрохлорида – не менее 2000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика амброксола гидрохлорида – не более 2,0;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное по площади пика амброксола гидрохлорида на пяти хроматограммах раствора СО амброксола гидрохлорида – не более 2%.

Количественное содержание амброксола гидрохлорида по разработанной методике (рисунок 2) составило 2,93 мг/мл, примесь В составила 0,12%; единичная неидентифицированная примесь 0,118% и 0,106%; сумма неидентифицированных примесей составила 0,344%.

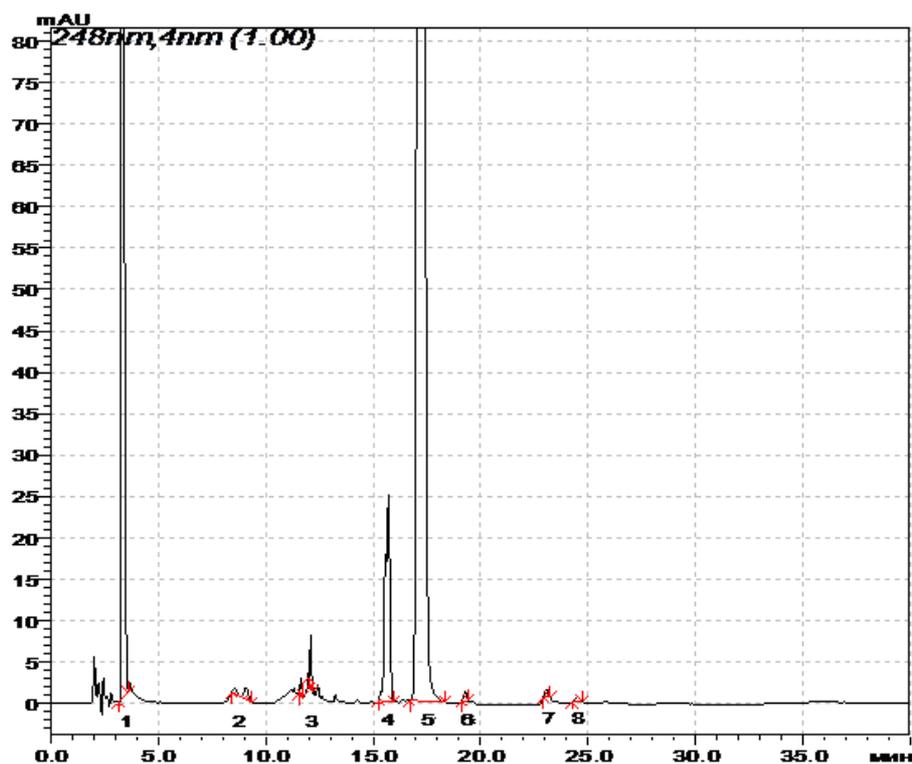


Рис. 2. Хроматограмма испытуемого раствора сиропа амброксола 3 мг/мл серия 50313 (1. Натрия бензоат; 2. Рибофлавин; 3. Ароматизатор фруктовый; 4. Ароматизатор фруктовый; 5. Амброксола гидрохлорид; 6. Примесь В; 7, 8 Единичная неидентифицированная примесь.

Таблица 2

Результаты оценки специфичности методики

Раствор	Время / Площадь пика
Пики ввода	до 3,8 мин; около 10,0 мин до 13,0 мин
Растворитель	15,64 / 1945
Плацебо:	
– рибофлавин	8,847 / 22865; 12,061 / 13381
– ароматизатор фруктовый	11,786 / 6860; 15,564 / 903757
– натрия бензоат	3,260 / 3360278
Амброксола гидрохлорид	17,315 / 19577

Таблица 3

Результаты определения предела количественного обнаружения

№ измерения	Площадь пика	Среднее значение	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации	Сигнал/ шум
1	2149	2403	183,0508	7,61	3,42
2	2569				
3	2342				
4	2621				
5	2473				
6	2264				

Таблица 4

Результаты оценки линейности методики

Концентрация амброксола гидрохлорида		Объем раствора	Площадь пика
мг/мл	%	мл	
0,000072	10	0,6	2397
0,000144	20	1,2	4205
0,000360	50	3,0	9868
0,000540	75	4,5	13849
0,000720	100	6,0	19094
0,000900	125	7,5	23358
0,001080	150	9,0	28065
0,001260	175	10,5	32734
Коэффициент корреляции (r) равен 0,9998			

Таблица 5

Результаты определения правильности методики

Содержание активного вещества в модельной смеси, %	Расчетное содержание активного вещества в модельной смеси, %	% восстановления
80	79,2	99
80	79,4	99,25
80	79,9	99,88
100	100,1	100,1
100	99,9	99,9
100	99,7	99,7
120	119,6	99,6
120	118,9	99,8
120	119,7	99
Средний % восстановления		99,6

Таблица 6

Результаты определения сходимости

№ измерения	Содержание единичной неидентифицированной примеси, %	Содержание суммы примесей, %
1	0,1201	0,344
2	0,1116	0,339
3	0,1213	0,341
4	0,1164	0,305
5	0,1175	0,349
6	0,1192	0,338
7	0,1205	0,342
8	0,1107	0,337
9	0,1203	0,334
10	0,1155	0,345
Среднее значение, %	0,1173	0,337
Стандартное отклонение	0,00375	0,012176
Коэффициент вариации, %	3,20	3,61

Результаты определения внутрилабораторной прецизионности

Первая серия измерений			
Номер образца	1	2	3
Химик № 1	0,1137	0,1144	0,1174
Химик № 2	0,1127	0,1216	0,1215
Среднее значение (n = 6)	0,1169		
Коэффициент вариации	3,37		
Вторая серия измерений			
Номер образца	1	2	3
Химик № 1	0,1206	0,1127	0,1128
Химик № 2	0,1198	0,1196	0,1189
Среднее значение (n = 6)	0,1174		
Коэффициент вариации	3,10		

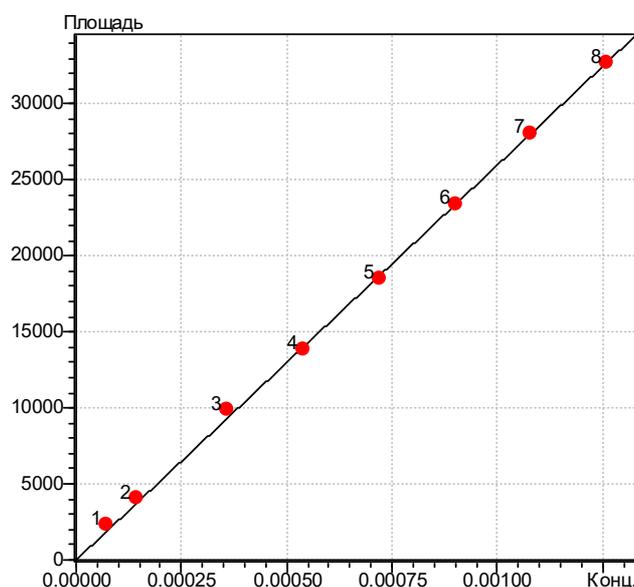


Рис. 3. График зависимости площади пика от концентрации амброксола гидрохлорида ($Y = 2.597987e + 007 * X$ $R^2 = 0.9996358$ $r = 0.9998179$).

С целью экспериментального подтверждения пригодности методики для контроля качества лекарственного препарата провели валидацию разработанной методики по показателям: специфичность, предел количественного определения, линейность, правильность, прецизионность (сходимость, внутрилабораторная прецизионность) [1].

Оценена специфичность методики в отношении влияния растворителя, плацебо и натрия бензоата. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Предел количественного обнаружения определен путем визуальной оценки хроматограммы. Приготовили раствор С (0,144 мкг/мл) и раствор Д (0,072 мкг/мл – предел обнаружения). На хроматограмме раствора, приготовленного для определения предела обнаружения, наблюдается пик амброксола гидрохлорида. Результаты хроматографирования раствора Д представлены в таблице 3.

Аналитическая область методики входит в диапазон экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной зависимости. Определение линейной зависимости проводилось на восьми уровнях концентраций амброксола гидрохлорида в растворе 10%, 20%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%.

Полученные данные приведены в таблице 4. По полученным данным построен график зависимости площади от концентрации амброксола гидрохлорида (рисунок 3).

Правильность методики количественного определения оценивали при помощи модельных смесей с известным содержанием амброксола гидрохлорида, результаты представлены в таблице 5. В качестве критерия приемлемости использовали средний процент восстановления при использовании растворов концентрацией 120%, 100% и 80%, скорректированный на 100%,

который должен находиться в пределах 98,0% до 102,0%.

Сходимость оценивалась по результатам 10 параллельных определений содержания посторонних примесей в одном образце амброксола сиропа. Коэффициент вариации для 10 определений должен быть не более 4,0%. Результаты представлены в таблице 6.

Внутрилабораторная прецизионность оценивалась по результатам трех анализов, выполняемых параллельно двумя химиками в разные дни. Полученные результаты представлены в таблице 7.

В результате проведенных исследований была модифицирована методика определения посторонних примесей одновременно с количественным определением действующего вещества в сиропе методом ВЭЖХ.

Валидация разработанной методики по показателям специфичность, предел количественного определения, линейность, правильность, прецизионность (сходимость, внутрилабораторная прецизионность) подтвердила соответствие критериям приемлемости. Разработанная методика может быть

использована при контроле качества лекарственного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная Фармакопея Российской Федерации, XIII изд. – М. : 2015. – Т. 2. – С. 222-234.
2. Закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [Электронный ресурс] // Гарант.ру. – Режим доступа: <http://ivo.garant.ru/#/document/12174909/paragraph/25019:2>, свободный (27.04.2016)
3. Фармацевтический анализ: монография / Под редакцией Г.К. Будникова и С.Ю. Гармонова. – М. : АГРАМАК - МЕДИА, 2013. – 778 с.
4. Kim H., Yoo J.Y., Han S.B. Determination of ambroxol in human plasma using LC-MS/MS // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2003. – Vol. 32, N 2. – P. 209-216.
5. Nobilis M., Pastera J., Svoboda D. High-performance liquid chromatographic determination of ambroxol in human plasma // J. Chromatogr. – 1992. – Vol. 581, N 2. – P. 251-255.
6. Schmid J. Assay of ambroxol in biological fluids by capillary gas-liquid chromatography // J. Chromatogr. – 1987. – Vol. 414, N 1. – P. 65-75.