



УДК 615.015.23:543.2

А.В. Бабьяк¹, Е.В. Компанцева²

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРАПАМИЛА ГИДРОХЛОРИДА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ МЕТОДОМ ВЭЖХ

¹Дальневосточный государственный медицинский университет, 680000, ул. Муравьева-Амурского 35,
тел. 8-(4212)-32-63-93, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru, г. Хабаровск;

²Пятигорский медико-фармацевтический институт, 357532, пр. Калинина, 11,
тел. 8-(793)-32-33-37, e-mail: canpgfa84@mail.ru, г. Пятигорск

Резюме

В настоящей статье описана методика определения верапамила гидрохлорида в фармацевтической композиции гипотензивного действия, куда он входит в составе таблеток пролонгированного действия. Цель представленной работы заключается в разработке и валидационной оценке аналитической методики количественного определения верапамила в лекарственной форме методом ВЭЖХ. В ходе работы обоснован экстрагент для извлечения исследуемого вещества из таблеточной массы, разработаны условия ВЭЖХ определения. Валидация методики была проведена по параметрам: специфичность, линейность, правильность и повторяемость. Установлено, что по всем представленным параметрам методика отвечает требованиям нормативных документов.

Ключевые слова: верапамил гидрохлорид, ВЭЖХ, валидация.

A.V. Babyak¹, E.V. Kompanceva²

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF VERAPAMIL HYDROCHLORIDE DETERMINATION IN A PHARMACEUTICAL COMPOSITION BY HPLC

¹Far Eastern State Medical University, Khabarovsk;

²Pyatigorsk branch of the State Budgetary Educational Establishment of Higher Professional Education «Volograd State Medical University» of the Ministry of Public Health Services of the Russian Federation, Pyatigorsk

Summary

This article describes the method of determination of verapamil hydrochloride in a pharmaceutical composition with a hypotensive action, where it is included as a part of prolonged action tablets. The purpose of the presented work is development and validation of analytical technique of quantitative determination of verapamil in pharmaceutical composition by HPLC-method. During the experiment, the extractant is selected for extraction of an analyte from the tablet mass, HPLC determination conditions were determined. Validation methodology was carried out based on the parameters: specificity, linearity, accuracy and precision. The authors revealed that all the parameters of the presented technique meet the requirements of normative documents.

Key words: verapamil hydrochloride, HPLC, validation.

Верапамил гидрохлорид является представителем группы антагонистов кальция. Помимо гипотензивного эффекта, он обладает выраженным антиаритмическим и антиатерогенным действием, метаболической нейтральностью, что делает его одним из препаратов выбора для комбинированной лекарственной терапии [1].

В ходе ранее проведенных исследований нами была разработана фармацевтическая композиция, в состав одной капсулы которой верапамил гидрохлорид

входит в виде 4 таблеток пролонгированного действия и лизиноприл в виде гранул [2].

Цель настоящей работы заключается в разработке и валидации ВЭЖХ методики для количественного определения верапамила гидрохлорида в фармацевтической композиции гипотензивного действия.

В статье представлены результаты валидации разработанной методики по параметрам: специфичность, линейность, правильность и повторяемость.

Материалы и методы

В работе использовались приборы: жидкостный хроматограф Agilent 1260 Infinity с колонкой Luna 5u длиной 25 мм с сорбентом Силасорб C_{18} ; pH-метр иономер 410; аналитические весы марки Т-А-13.

Верапамила гидрохлорида в одной капсуле содержится в дозе 100 мг в виде 4 таблеток по 25 мг. В связи с этим, состав таблеток продленного действия (в пересчете на 1 таблетку):

Верапамила гидрохлорид	– 25 мг;
Натрия альгината	– 50 мг;
Микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ)	– 15 мг;
Магния стеарат	– 0,6 мг;
Plasdone K-90	– 7,5 мг.

Определение валидационных параметров методики проводили на модельных смесях таблеток верапамила гидрохлорида в пересчете на одну дозу вещества (100 мг).

Растворы модельных смесей таблеток верапамила гидрохлорида и стандартного образца (СО) верапамила гидрохлорида для измерения площади пиков готовили в концентрации 0,1 мг/мл.

Методика. Около 0,4 г (точная навеска) порошка модельной смеси растертых таблеток верапамила гидрохлорида помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, встряхивали с 3 мл метанола в течение 10 мин., раствор доводили до метки этим же растворителем. Осадок отфильтровывали с помощью фильтра типа «синяя лента». 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в воде и доводили этим же растворителем до метки. Раствор фильтровали через фильтр типа «синяя лента», измеряли площади пиков.

В качестве подвижной фазы (ПФ) была выбрана система растворителей: фосфатный буферный раствор (рН=3,0) – ацетонитрил – изопропанол в соотношении 30:35:35, режим элюирования изократический. Скорость потока ПФ 0,8 мл/мин., объем пробы 20 мкл, температура термостата колонки 40 °С. Детектирование осуществляли с помощью УФ-детектора при длине волны 278 нм. В колонку хроматографа попеременно вводили равные объемы раствора СО верапамила гидрохлорида и растворы испытуемых модельных таблеток, измеряли площади пиков.

Результаты и обсуждение

На первом этапе для проведения анализа необходимо было подобрать растворитель для извлечения верапамила гидрохлорида из таблеточной массы. Использование водных растворителей не представлялось возможным, т. к. входящий в состав таблеток натрия альгинат медленно растворяется в воде, образуя вязкий гель. Учитывая растворимость верапамила гидрохлорида и вспомогательных веществ, нами было предложено использовать метанол, который эффективнее, чем этанол извлекает действующее вещество и в котором нерастворим натрия альгинат.

В качестве подвижной фазы нами была выбрана система: фосфатный буферный раствор (от 10 до 90) –

ацетонитрил (от 10 до 90), без включения аминов и их производных, изократический режим элюирования и детектирование при 278 нм [5, 6]. В предложенных условиях на хроматограммах модельных смесей таблеток верапамила гидрохлорида фактор асимметрии пика верапамила и разрешение между пиком исследуемого вещества и пиком вспомогательных веществ не соответствовали требованиям НД [3]. Оптимальные результаты мы получили при введении в ПФ в качестве третьего компонента раствора изопропилового спирта. Соотношение растворителей фосфатный буферный раствор (рН 3,0) – ацетонитрил – изопропанол при этом составило 30:35:35.

Валидацию разработанной методики проводили в соответствии с проектом ОФС 42-0113-09 «Валидация аналитических методик».

Специфичность разработанной методики определяли путем сравнения хроматограмм модельных таблеток верапамила и плацебо-смеси. Время удерживания (t_R) исследуемого вещества на хроматограмме СО верапамила составляет 3,29 минуты. На хроматограммах модельных таблеток верапамила помимо пика основного вещества с $t_R=3,29$ мин. зафиксирован пик с $t_R=2,20$ мин. На хроматограмме плацебо-смеси обнаружен пик, время удерживания которого также составляет 2,20 мин, а пик исследуемого вещества отсутствует (рисунок).

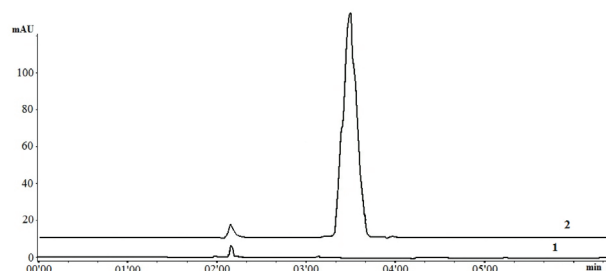


Рис. Хроматограмма модельных таблеток верапамила гидрохлорида (2) и плацебо-смеси (1)

Согласно растворимости вспомогательных веществ, пик на хроматограмме смеси «плацебо» соответствует PlasdoneK-90. В соответствии с полученными результатами установлено, что присутствие вспомогательных веществ не мешает определению верапамила гидрохлорида в таблетках.

Линейность определяли путем измерения площади пиков извлечений из 5 образцов модельных смесей таблеток верапамила гидрохлорида с содержанием действующего вещества 80, 90, 100, 110 и 120 %. Установлено, что аналитическая область методики, находящаяся в диапазоне 0,8–1,2 мг/мл, входит в пределы линейной зависимости и описывается уравнением $y=14\,959x-269,6$ с коэффициентом корреляции $r=0,999$.

Правильность предлагаемой методики определяли на 6 образцах модельных смесей таблеток с известным содержанием верапамила гидрохлорида.

С целью проверки повторяемости методики проводили трехуровневый эксперимент по 3 опыта на каждом уровне. Диапазон измерения был выбран исходя

**Результаты валидационной оценки ВЭЖХ методики
определения верапамила гидрохлорида**

Наименование показателя	Оптимальное значение (НД)	Результат определения	Соответствие требованиям НД [3, 4]
Специфичность	однородность пика	пик определяемого вещества четко отделяется от пиков вспомогательных веществ	+
Аналитическая область	результаты должны иметь приемлемый уровень правильности и повторяемости	методика применима в интервале от 80 до 120 % от номинального значения содержания вещества в модельных таблетках	+
Линейность (коэффициент корреляции r)	$ r \geq 0,99$	0,999	+
Правильность (критерий Стьюдента)	$\leq 2,57$	0,82	+
Повторяемость (относительное стандартное отклонение RSD)	$\leq 3 \%$	1,63 %	+

Выводы

В ходе экспериментальной работы предложена методика количественного определения верапамила гидрохлорида в фармацевтической композиции методом ВЭЖХ. При помощи валидационной оценки установлено, что разработанная методика ВЭЖХ валидна по показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, повторяемость.

Литература

1. Диагностика и лечение артериальной гипертензии: Российские рекомендации (четвертый пересмотр) // Системные гипертензии. – 2010. – № 3. – С. 5-26.
2. Компанцева Е.В. Разработка состава и технологии таблеток верапамила с контролируемым высвобождением действующего вещества // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 3. – С. 17-20.
3. Сапрыкин Л.В. Практика и методические основы ВЭЖХ. – М., 2006. – 151 с.
4. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) //

Химико-фармацевтический журн. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 40-56.

5. HPLC method for determination of verapamil in human plasma after solid-phase extraction // Journal of Biochemical and Biophysical Methods. – 2008. – Vol. 70, № 6. – P. 1297-1303.
6. Ho P.C. Simultaneous HPLC analysis of S- and R-verapamil and metabolites, S- and R-norverapamil in human plasma // J. Liq. Chromatogr. and Relat. Technol. – 2000. – Vol. 23, № 11. – P. 1711-1723.

Literature

1. Diagnosis and treatment of hypertension: Russian recommendations (fourth revision) // System hypertension. – 2010. – № 3. – P. 5-26.
2. Kompantseva E.V. Development of composition and technology of verapamil sustained release tablets // Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry. – 2013. – № 3. – P. 17-20.
3. Saprykin L.V. Practice and methodological foundations HPLC. – M., 2006. – 151 p.
4. Epstein N.A. Validation (validation) HPLC methods in pharmaceutical analysis (review) // Pharmaceutical Chemistry J. – 2004. – Vol. 38, № 4. – P. 40-56.

5. Ivanova V. HPLC method for determination of verapamil in human plasma after solid-phase extraction // Journal of Biochemical and Biophysical Methods. – 2008. – Vol. 70, № 6. – P. 1297-1303.

6. Ho P.C. Simultaneous HPLC analysis of S- and R-verapamil and metabolites, S- and R-norverapamil in human plasma // J. Liq. Chromatogr. and Relat. Technol. – 2000. – Vol. 23, № 11. – P. 1711-1723.

Координаты для связи с авторами: Бабык Анна Валерьевна – старший преподаватель кафедры фармацевтической и аналитической химии ДВГМУ, тел. +7-914-549-55-55, e-mail: annav.babyak@gmail.com; Компанцева Евгения Владимировна – профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолГМУ, тел. 8-(8793)-39-10-87, e-mail: skompanceva@mail.ru.

