

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

(магистерская диссертация)

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В
АНАЛИЗЕ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ И КОНТРОЛЕ
ТЕХНОЛОГИИ ИХ ПРОИЗВОДСТВА НА ПРЕДПРИЯТИИ ОАО
«ТЮМЕНСКИЙ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ЗАВОД»

Автор работы: Крючкова А.С.

Научный руководитель : к.х.
н., доцент,

вед.научный сотрудник
Третьяков Н.Ю

Цель: экспериментальное подтверждение пригодности методик количественного определения ранитидина в таблетках Ранитидин-ЛекТ и эргокальциферола (витамина Д₂) в препарате Эргокальциферол-ЛекТ методом ВЭЖХ.

Задачи:

- ▶ предварительное тестирование методик количественного определения ранитидина и эргокальциферола методом ВЭЖХ;
- ▶ подбор условий анализа;
- ▶ проведение работ по подтверждению пригодности выбранных методик;
- ▶ статистическая обработка полученных данных и занесение результатов исследования в протокол предприятия.

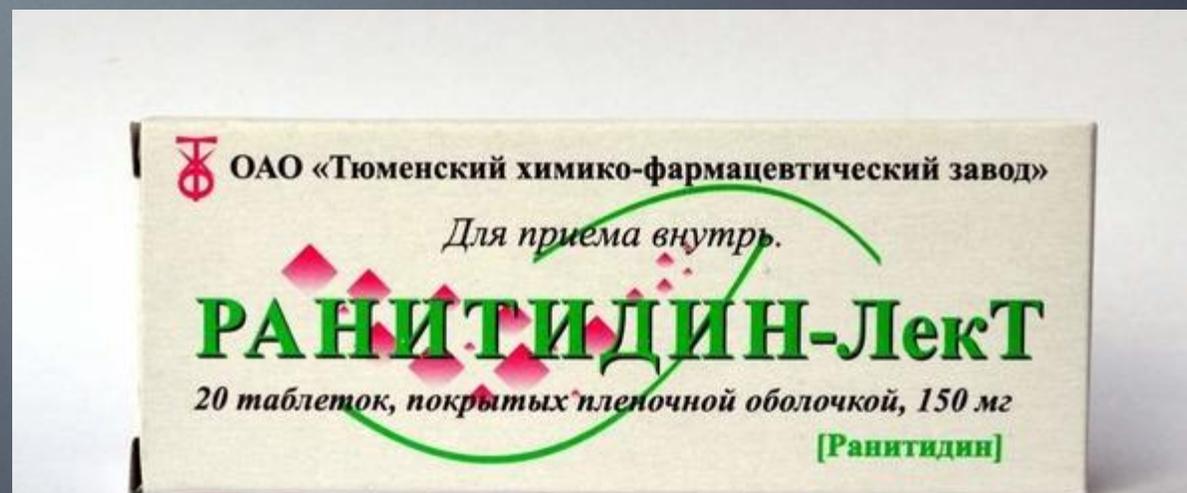
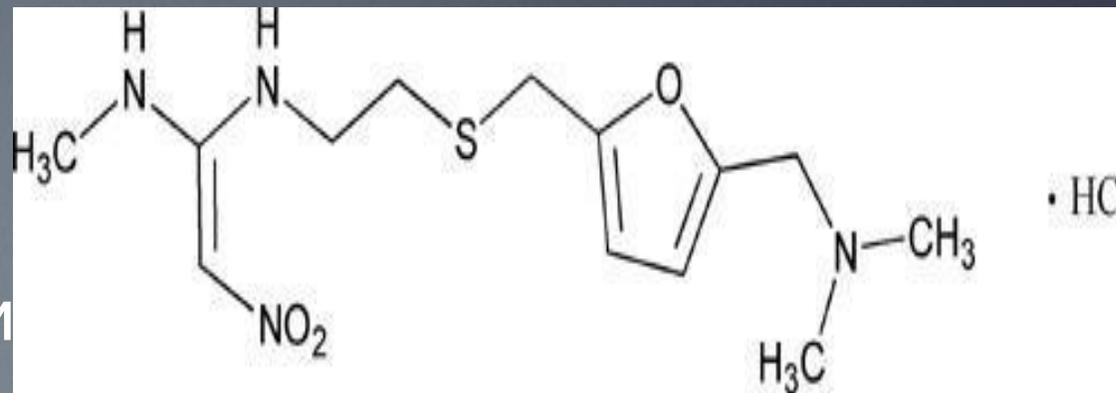
- ▶ **Высокоэффективная жидкостная хроматография** — один из эффективных методов разделения сложных смесей веществ.
- ▶ В обращенно-фазовом варианте хроматографии используют неполярные химически модифицированные сорбенты (например, неполярный алкильный радикал C18) и полярные подвижные фазы (например, метанол, ацетонитрил).

**Подтверждение пригодности
аналитической методики
количественного определения
ранитидина методом ВЭЖХ в
препарате Ранитидин-ЛекТ**

Ранитидина гидрохлорид

5

Препарат применяется для профилактики и лечения язвенной болезни желудка и /или двенадцатиперстной кишки, в том числе связанной с приемом нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП).



Хроматографические условия

6

Колонка	Luna C 18, 4.6x250 мм, 5 мкм
Подвижная фаза	Фосфатный буферный раствор с рН 6,6 – метанол (1:1)
Скорость потока	1 мл/мин
Детектор	УФ, 324 нм
Температура колонки	25 °С
Объем пробы	20 мкл
Режим элюирования	Изократический
Время удерживания пика ранидина	Около 5,3 мин

Краткое изложение методики анализа

- ▶ *Раствор стандартного образца ранитидина гидрохлорида*

Около 55 мг (точная навеска) стандартного образца (BP CRS, USP RS) ранитидина гидрохлорида, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл метанола, доводят объем раствора метанолом до метки и перемешивают.

Затем 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

- ▶ *Испытуемый раствор*

Около 100 мг (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 40 мл подвижной фазы, помещают в ультразвуковую ванну на 15 мин, доводят объем суспензии подвижной фазой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтра.

Затем 1,0 мл фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают.

- ▶ Содержание $C_{13}H_{22}N_4O_3S$ (ранитидина) должно быть от 142 до 158 мг, считая на среднюю массу таблетки.
- ▶ Содержание (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times 0,896 \times 50 \times a_0 \times 25 \times G \times P}{S_0 \times a \times 50 \times 25 \times 100} = \frac{S \times a_0 \times G \times 0,896 \times P}{S_0 \times a \times 100}$$

S – площадь пика ранитидина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика ранитидина на хроматограмме раствора стандартного образца ранитидина гидрохлорида;

a_0 – навеска стандартного образца ранитидина гидрохлорида (мг);

a – навеска порошка растертых таблеток (мг);

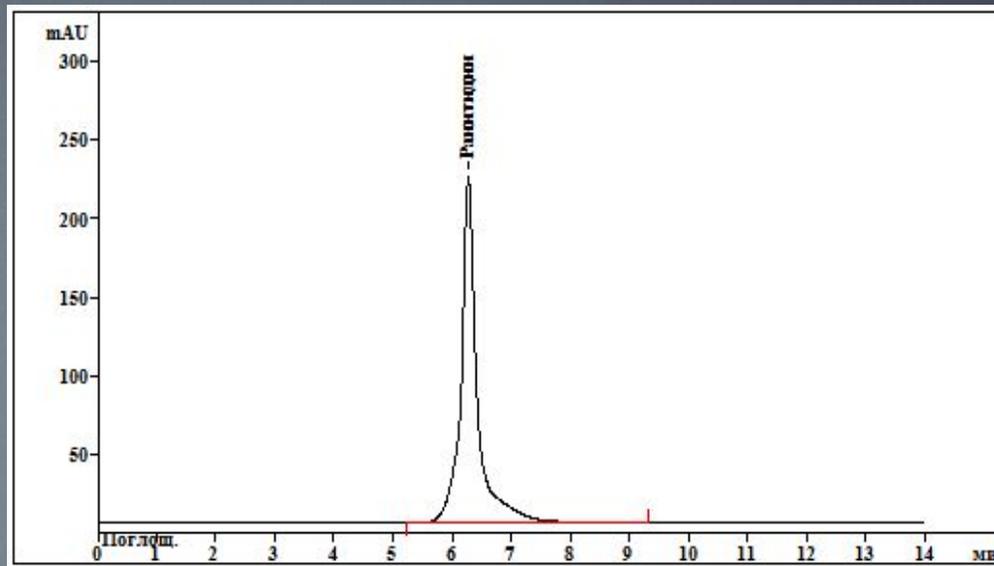
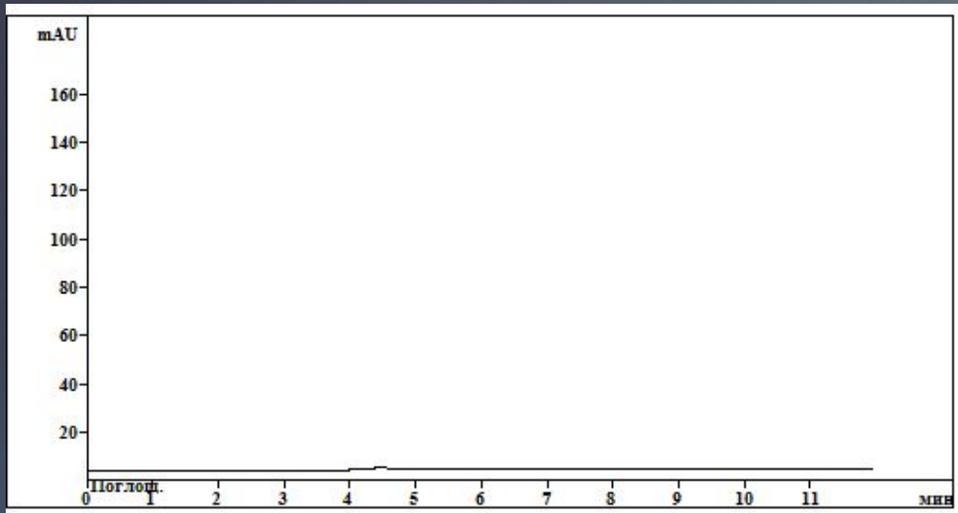
G – средняя масса одной таблетки (мг);

P – содержание ранитидина гидрохлорида в стандартном образце (%);

0,896 – коэффициент пересчета ранитидина гидрохлорида на ранитидин

Проведение проверки методики на соответствие критериям специфичности

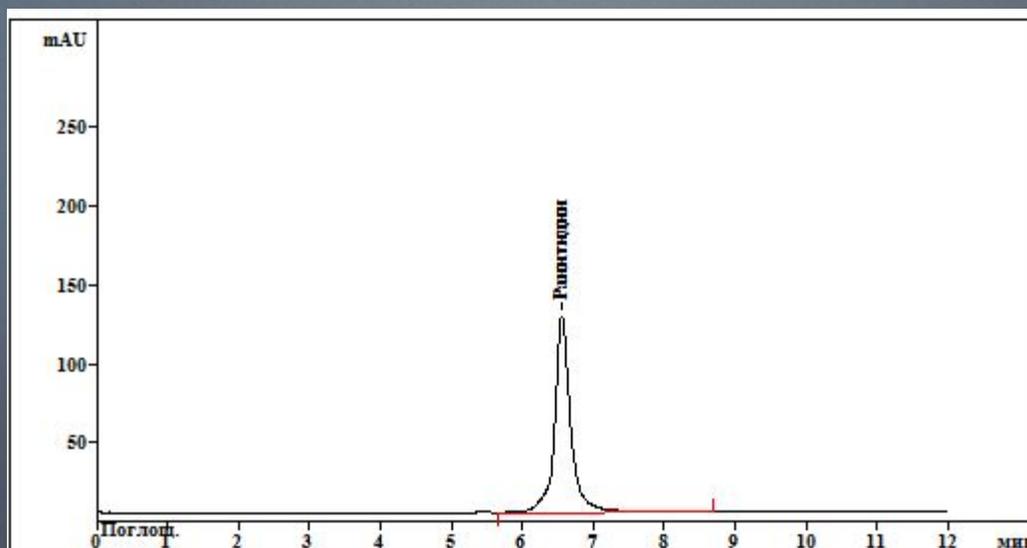
9



С2 - раствор
ранитидина
гидрохлорида
концентрацией
0,08 мг/мл

Р - растворитель, не
содержащий
определяемых
компонентов;

С1 - раствор плацебо;

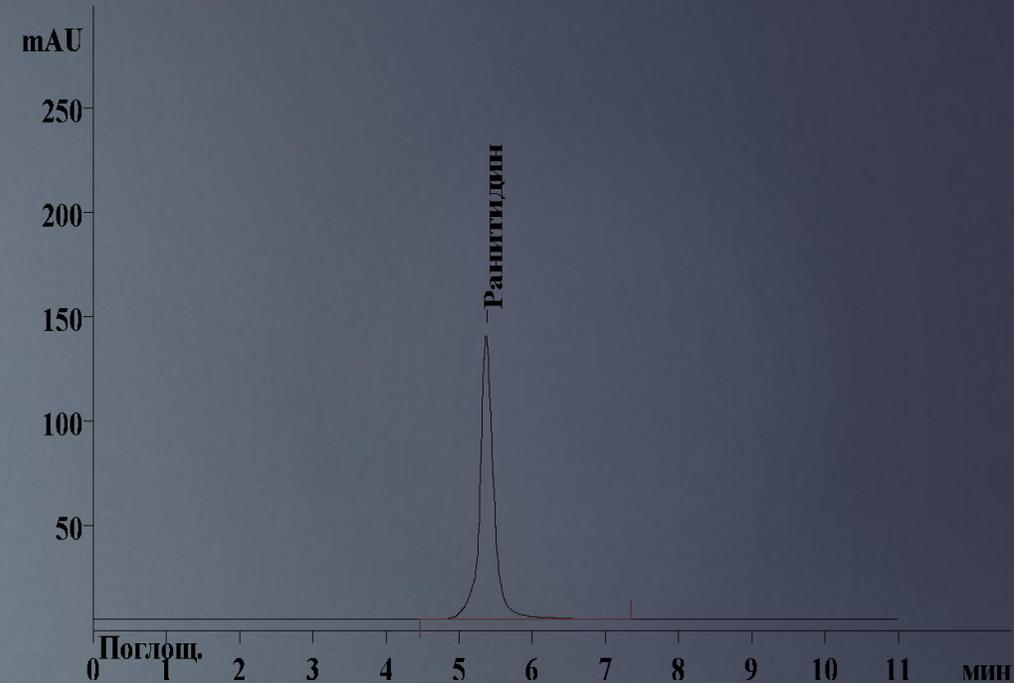


С3 - испытуемый раствор
таблеток Ранитидин – ЛекТ 150
мг.

Проведение проверки методики на соответствие критериям прецизионности (сходимость)

10

Испытуемый раствор	Навеска препарата, мг	Площадь пика по 3 хроматограммам, mAU	Содержание ранитидина, мг/таб (x)
1	98,0	1722,18	157,43
2	102,0	1788,80	157,11
3	109,0	1908,29	156,84
4	104,0	1803,04	155,31
5	102,0	1785,88	156,85
6	108,0	1903,01	157,86
Стандарт	55,0	1738,27	$x_{\text{ср}} = 156,90$



Средняя масса таблетки 316 мг

Стандартное отклонение для 6 определений (n=6) SD = 0,87

Относительное стандартное отклонение RSD = 0,55 %

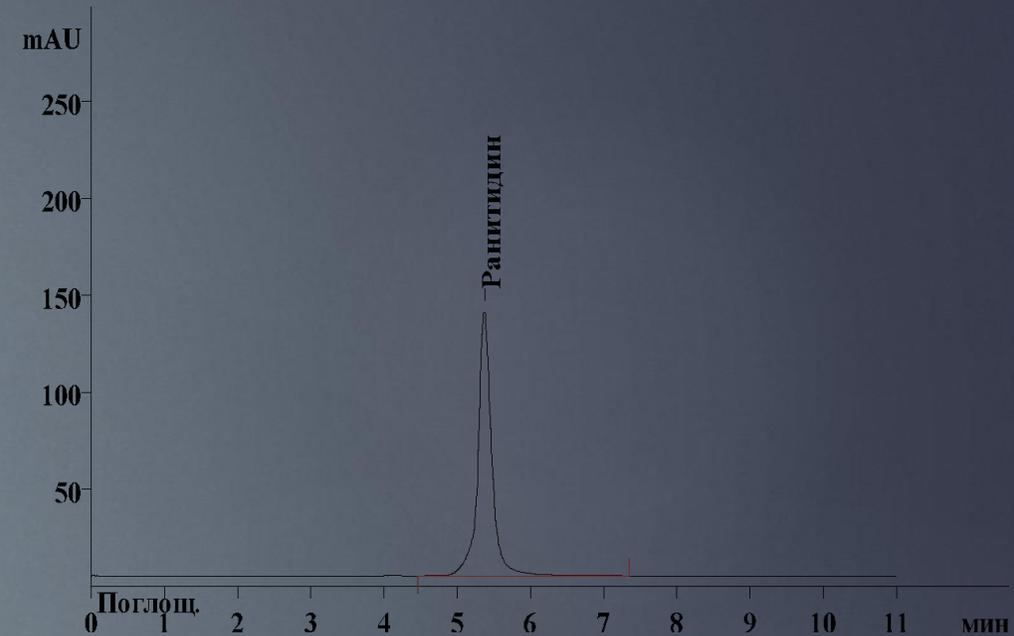
Доверительный интервал $\Delta x = 1,0$ (критерий Стьюдента $t = 2,57$ для $f = 5$ и $P = 95\%$)

Содержание ранитидина в таблетке $x = 156,9 \pm 1,0$ мг

Проведение проверки методики на соответствие критериям прецизионности (воспроизводимость)

11

Испытуемый раствор	Навеска препарата, мг	Площадь пика по 3 хроматограммам, mAU	Содержание ранитидина, мг/таб (x)
1	100,0	1616,11	157,70
2	102,0	1633,04	156,22
3	101,0	1625,94	157,09
4	102,0	1633,70	156,29
5	101,0	1626,92	157,18
6	103,0	1640,16	155,38
Стандарт	55,0	1595,90	$x_{cp} = 156,64$



Средняя масса таблетки 316 мг

Стандартное отклонение для 6 определений (n=6) SD = 0,84

Относительное стандартное отклонение RSD = 0,53 %

Доверительный интервал $\Delta x = 0,96$ (критерий Стьюдента $t = 2,57$ для $f = 5$ и $P = 95\%$)

Содержание ранитидина в таблетке $x = 156,64 \pm 0,96$ мг

Критерий приемлемости: относительное стандартное отклонение серии результатов не превышает 2,0%; результаты, полученные в двух сериях, статистически достоверно идентичны.

Испытуемый раствор	Содержание ранитидина, мг/таб (x_1)	Испытуемый раствор	Содержание ранитидина, мг/таб (x_2)
1	157,43	1	157,70
2	157,11	2	156,22
3	156,84	3	157,09
4	155,31	4	156,29
5	156,85	5	157,18
6	157,86	6	155,38
Среднее содержание, мг	156,90	Среднее содержание, мг	156,64
Относительное стандартное отклонение, %	0,55	Относительное стандартное отклонение, %	0,53
t-критерий	0,53		
$t_{ст}$	2,57		

Относительное стандартное отклонение в серии не превышает 2,0%; t-критерий не превышает критерия Стьюдента, результаты двух серий статистически достоверно идентичны; результат соответствует требованиям прецизионности

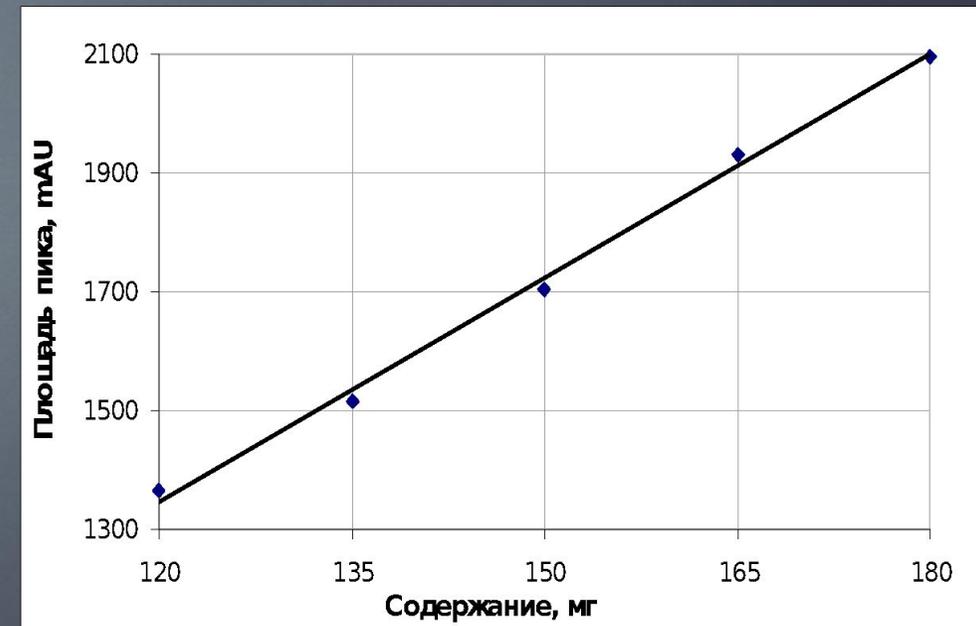
Проведение проверки методики на соответствие критериям линейности

Критерий приемлемости: аналитический сигнал (площадь пика) линейно зависит от содержания ранитидина в диапазоне концентраций от 80% до 120% от номинального содержания ранитидина; степень корреляции не ниже 0,99.

Уравнение площади пика как функции от содержания ранитидина в таблетке имеет вид:
 $S = 12,513 \cdot C - 154$
Степень корреляции $R^2 = 0,998$

Модельная смесь	Содержание ранитидина в % от номинального	Содержание ранитидина, мг/таб	Площадь пика по 3 хроматограммам, mAU	Площадь пика, рассчитанная по уравнению прямой
		x	y	$y' = 12,513x - 154$
1	80	120	1367	1348
2	90	135	1516	1535
3	100	150	1703	1723
4	110	165	1931	1911
5	120	180	2098	2098
n = 5		$x_{cp} = 150,0$	$y_{cp} = 1723$	$y'_{cp} = 1723$

Методика количественного определения таблеток Ранитидин – ЛекТ 150 мг удовлетворяет требованиям линейности; площадь пика линейно зависит от содержания ранитидина в таблетке в заданном диапазоне с высокой степенью корреляции.



Проведение проверки методики на соответствие критериям правильности

Критерий приемлемости: среднее значение правильности определения содержания ранитидина составляет от 98,0 до 102,0% от теоретического содержания.

Модельная смесь	Площадь пика по 3 хроматограммам, mAU	Содержание ранитидина в % от номинального	Теоретическое содержание ранитидина, мг/таб	Найденное содержание ранитидина, мг/таб	Правильность R в % от теоретического значения
П0	1712,81	100			
П1	1367,14	80	120	119,73	99,77
П2	1364,72	80	120	119,52	99,60
П3	1365,72	80	120	119,60	99,67
П4	1721,92	100	150	150,80	100,53
П5	1727,57	100	150	151,29	100,86
П6	1725,33	100	150	151,10	100,73
П7	2060,69	120	180	180,47	100,26
П8	2061,98	120	180	180,58	100,32
П9	2061,21	120	180	180,51	100,28

По результатам 9 определений правильность составляет $100,2 \pm 0,4$ %

Определение диапазона применения

Критерий приемлемости: в заданном диапазоне выполняются условия линейности, правильности, прецизионности.

Параметр	Диапазон исследования
Линейность	120 – 180 мг
Правильность	120 – 180 мг
Прецизионность	150 мг

Диапазон применения методики количественного определения таблеток Ранитидин – ЛекТ 150 мг составляет 120 – 180 мг ранитидина в таблетке

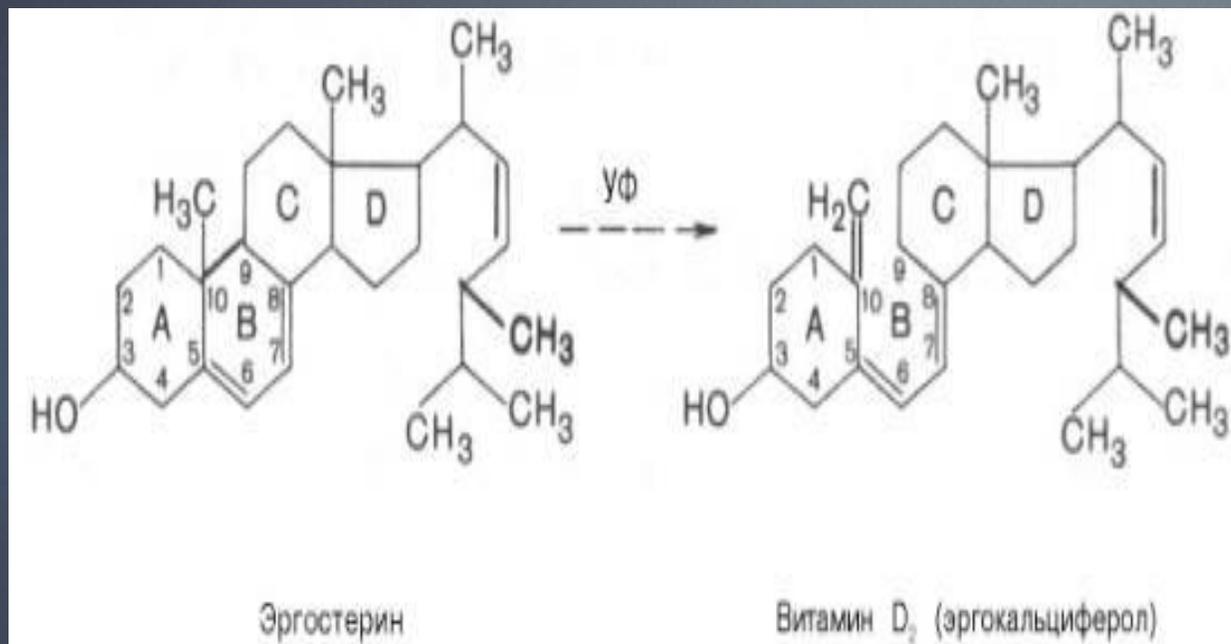
Опробация методики
количественного определения
эргокальциферола (витамин D₂)
раствор [в масле] 0,0625 %
методом ВЭЖХ

Эргокальциферол (Витамин D₂)

17

Одна из форм витамина D, образующаяся при воздействии ультрафиолета на эргостерол.

Неустойчив к влиянию света, высоких температур, кислорода воздуха.
Регулирует обмен кальция и фосфора в организме.



Хроматографические условия и условия пригодности системы (исходная методика)

18

Прибор	Милихром-5
Колонка	Lichrosorb RP-18, размер 2,0x100 мм, зернение 5 мкм
Подвижная фаза	Метанол
Скорость потока	0,1 мл/мин
Детектор	Спектрофотометрический
Длина волны	264 нм
Температура колонки	25 °С
Время удерживания компонента	Около 8 мин

- эффективность колонки, рассчитанная по пику эргокальциферола, должна быть не менее 1500 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение площади пика не должно превышать 1,5 %;
- относительное стандартное отклонение времени удерживания не должно превышать 2 %.

Краткое изложение методики анализа

□ Раствор стандартного образца эргокальциферола:

Около 0,006 г (точная навеска) стандартного образца эргокальциферола (EP, USP, рабочий стандарт фирмы) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливают примерно 10 мл спирта изопропилового, растворяют, затем доводят объем раствора спиртом изопропиловым до метки, перемешивают.

□ Испытуемый раствор:

2,5 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливают спирт изопропиловый примерно 10 мл, растворяют, затем доводят объем раствора спиртом изопропиловым до метки, перемешивают.

- Содержание эргокальциферола 1 мл должно составлять от 0,58 до 0,67 мг.
- Содержания эргокальциферола (X , мг/мл) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a \times P \times 50}{S_0 \times 2,5 \times 50 \times 100} = \frac{S \times a \times P}{S_0 \times 250},$$

S - площадь пика эргокальциферола на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 - площадь пика эргокальциферола на хроматограмме раствора стандартного образца эргокальциферола;

a - навески стандартного образца эргокальциферола, (мг);

P - содержание эргокальциферола в стандартном образце, %.

Подбор хроматографических условий

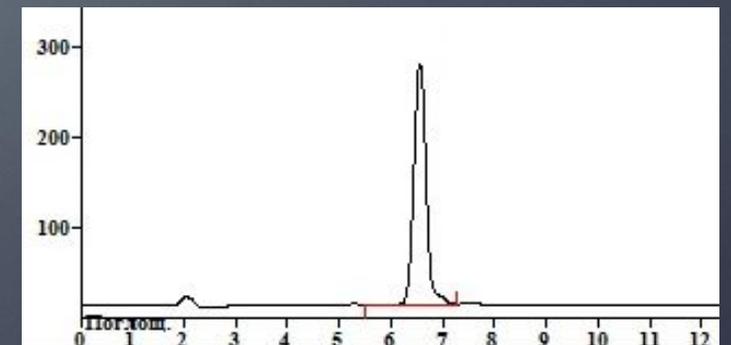
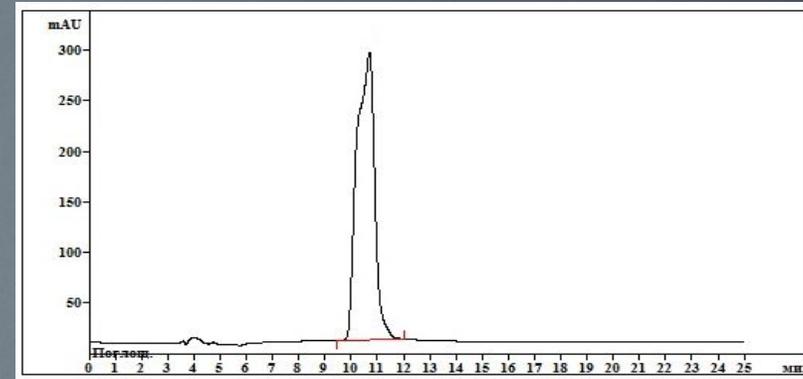
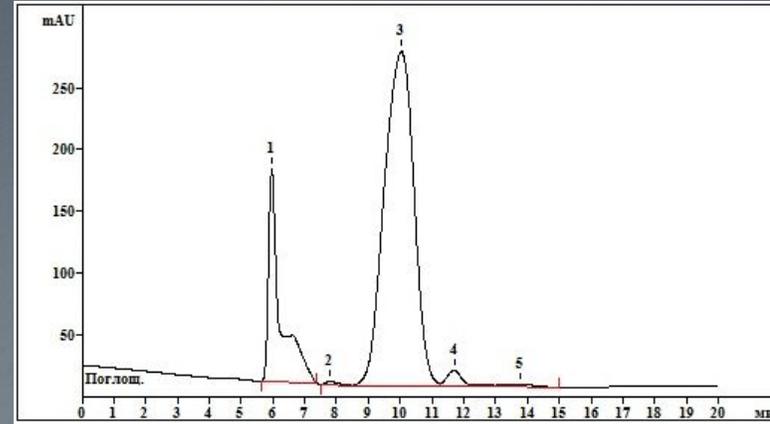
21

Колонка	1.Sonoma C18 (4,6x100 мм, зернение 5 мкм) 2.Equisil C18 (4,0x100 мм, зернение 3 мкм) 3.Luna C 18, (4,6x150 мм, 5 мкм)
Подвижная фаза	Метанол
Скорость потока	1 мл/мин
Детектор	УФ, 265 нм
Температура колонки	25 °С
Объем пробы	20 мкл
Режим элюирования	Изократический
Время удерживания пика эргокальциферола	Около 6 мин

Хроматограмма стандартного раствора эргокальциферола

22

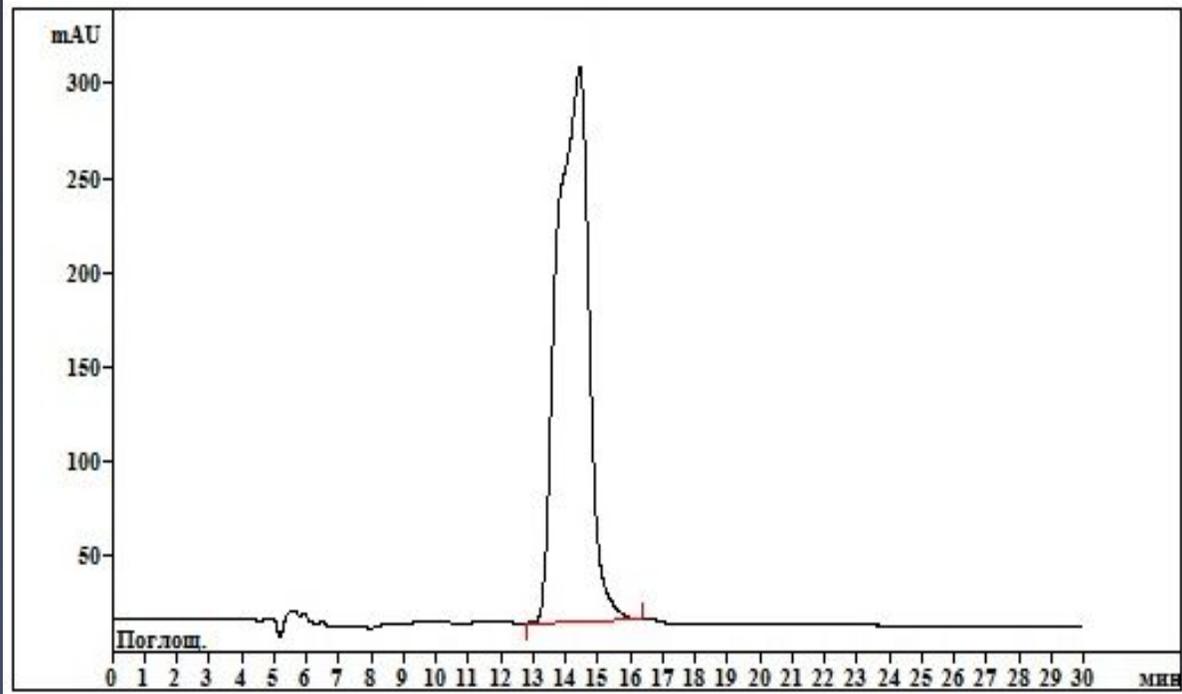
Колонка	Время, мин	Площадь, мAU*сек	Эффективность, ТТ
Sonoma C18 (4,6 x100 мм, зернение 5 мкм)	10,04	17521,73	545
Equisil C18 (4,0 x100 мм, зернение 3 мкм)	6,52	8083,77	1083
Luna C 18, (4,6 x150 мм, 5 мкм)	6,8	4458,60	3522



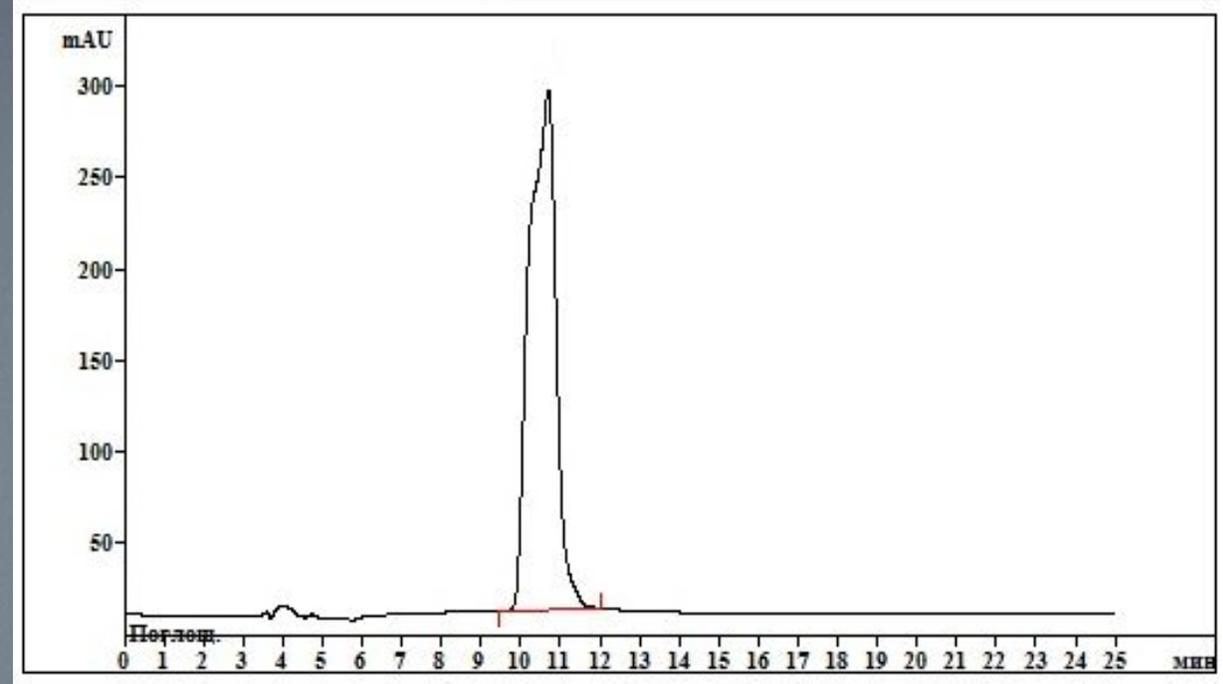
Хроматограмма стандартного раствора эргокальциферола

23

Колонка Equisil C18 (4,0x100 мм, зернение 3 мкм)



№	Время мин	Высота mAU	Площадь mAU*сек	ТТ
1	14.44	292.17	19768.53	1030



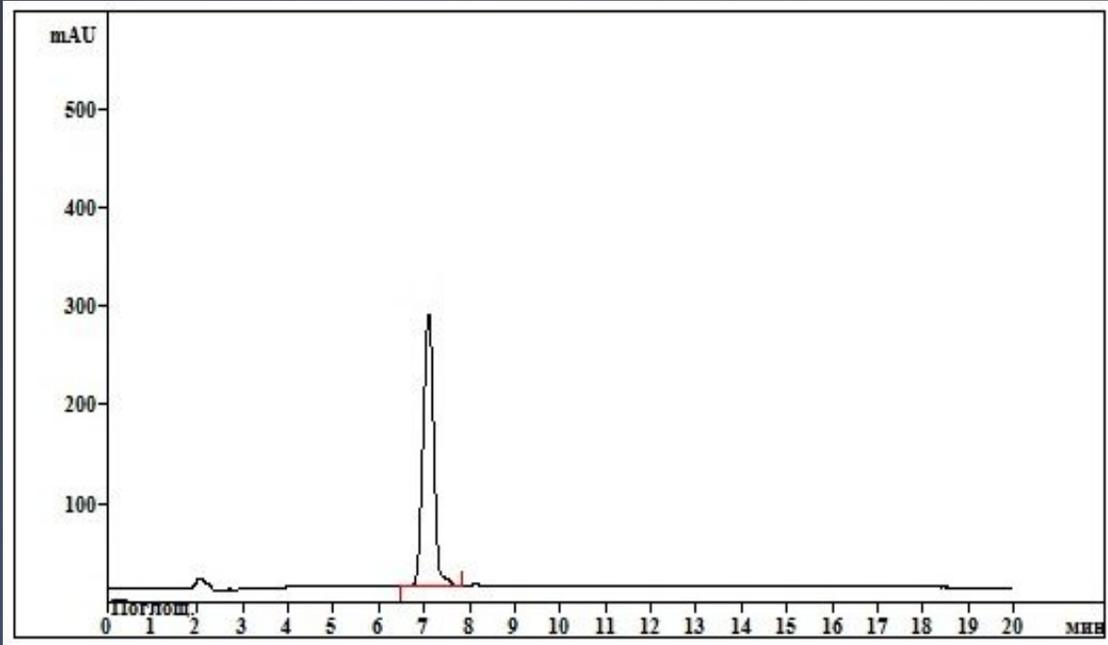
№	Время мин	Высота mAU	Площадь mAU*сек	ТТ
1	10.7	284.34	13350.74	1175

Времена удерживания основного компонента не совпадают между вводом проб, также по параметру эффективность колонка не удовлетворяет условиям анализа.

Хроматограмма стандартного раствора эргокальциферола

24

Колонка Luna C18 (4,6x150 мм, зернение 5 мкм)



Время, мин	Высота, mAU	Площадь, mAU*сек	Коэф. асимметрии	Эффективность, ТТ
6,579	309,01	4489,83	0,90	3702
6,482	316,82	4503,57	0,90	3777
6,641	306,38	4458,60	0,91	3713
6,650	306,41	4463,54	0,91	3723
6,644	307,41	4507,28	0,90	3727

Относительное стандартное отклонение по площади пиков $RSD=0,03\%$ (не более $1,5\%$).

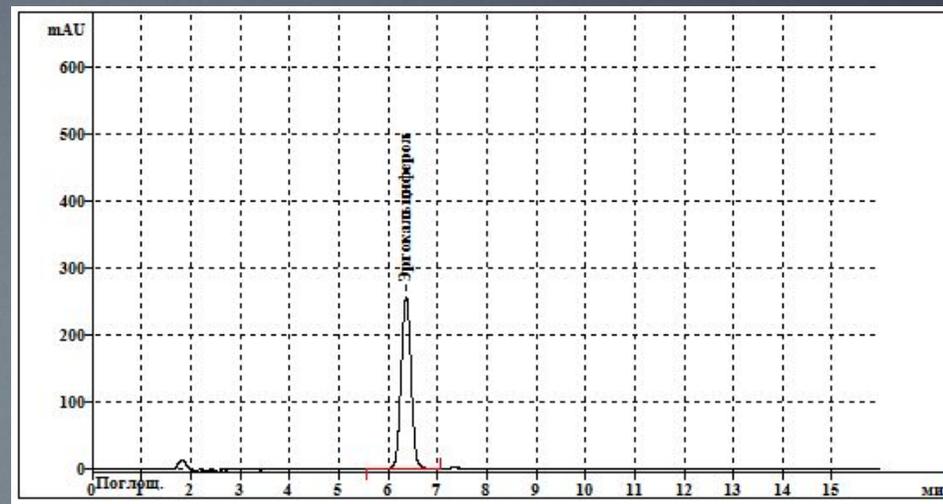
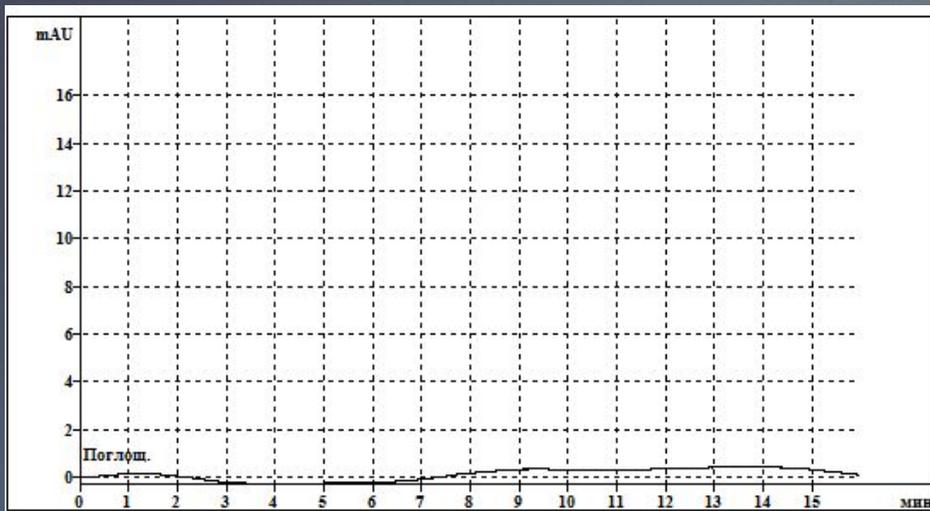
Относительное стандартное отклонение по времени удерживания $RSD=1,08\%$ (не более 2%)

Выбранная колонка удовлетворяет критериям пригодности хроматографической системы.

Проведение проверки методики на соответствие критериям специфичности

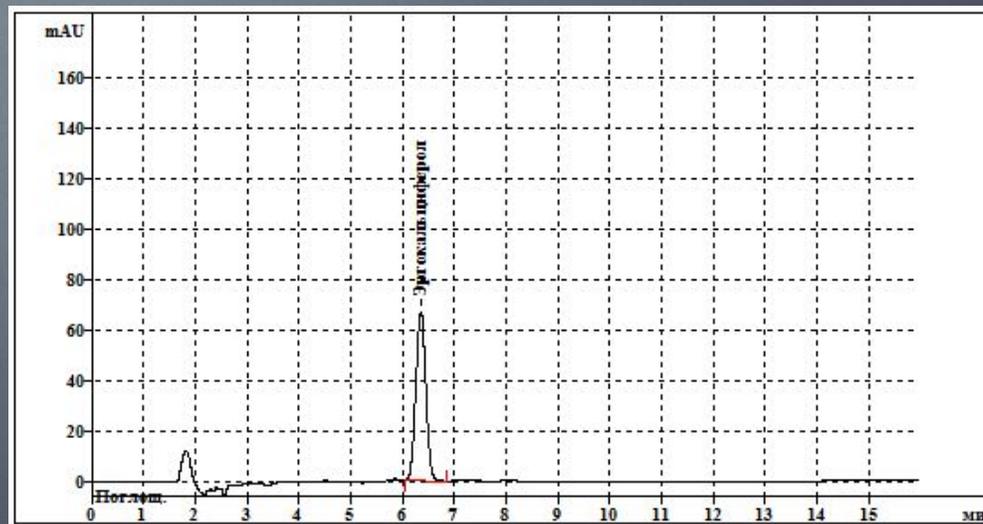
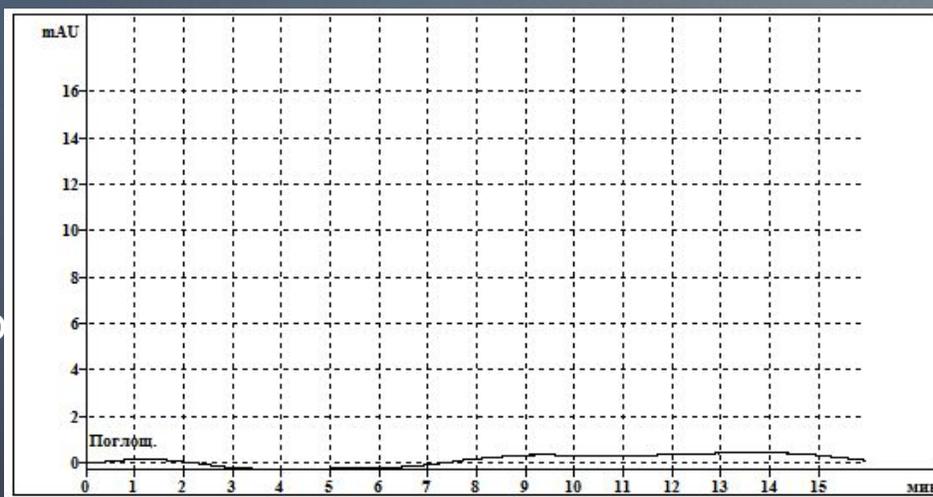
25

Р –
растворитель



С1 –
стандартный
раствор
эргокальци-
ферола

С2 –
раствор
плацебо



С3 –
испытываемый
раствор
готового
лекарственно
го средства
Эргокальциф
ерол-ЛекТ .

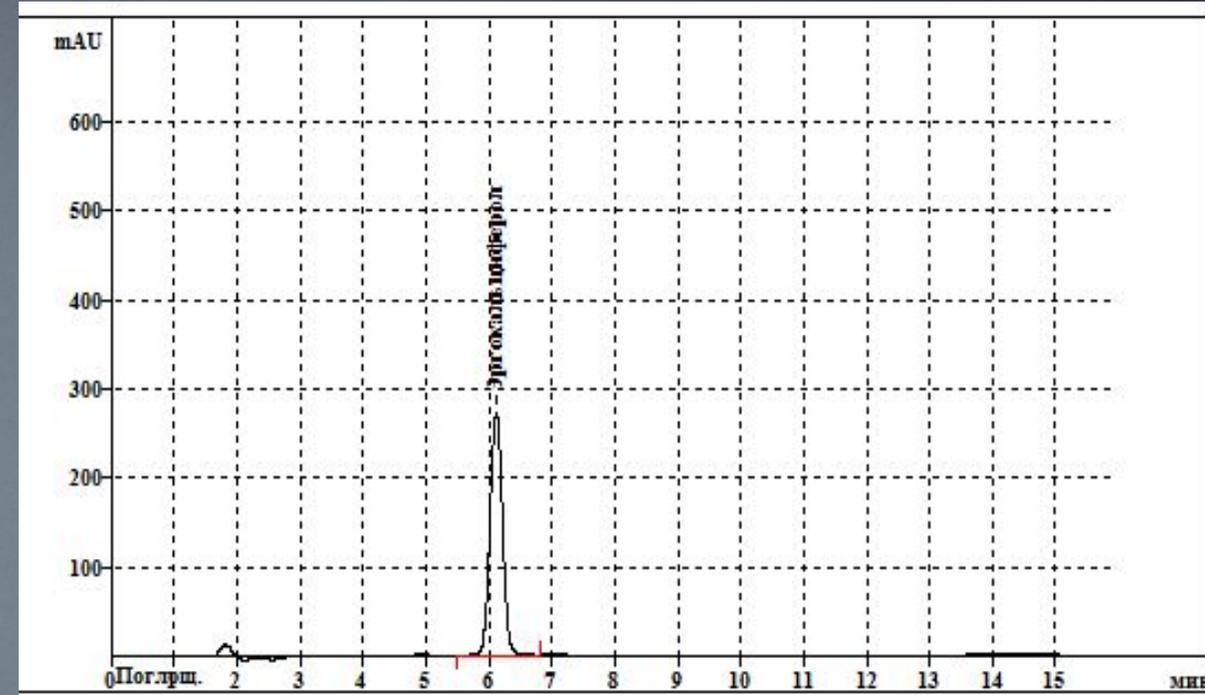
Проведение проверки методики на соответствие критериям специфичности

Модельная смесь	Критерий приемлемости	Результат
P	Нет пиков определяемых веществ	На хроматограмме нет пиков
C1	Пик эргокальциферола	1 пик: время удерживания 6,366 мин, асимметрия 0,97, эффективность колонки 4559 ТТ
C2	Нет пиков определяемых веществ	Нет пиков
C3	Основной пик эргокальциферола. Параметры пика совпадают с соответствующим на хроматограмме C1	1 пик: время удерживания 6,353 мин, асимметрия 1,01, эффективность колонки 4939 ТТ

Проведение проверки методики на соответствие критериям прецизионности (сходимость)

27

Испытуемый раствор	Объем аликвоты, мл	Площадь пика по 3 хроматограммам, mAU	Содержание эргокальциферола, мг/мл (x)
1	2,5	925,88	0,62
2	2,5	955,89	0,62
3	2,5	932,21	0,62
4	2,5	922,06	0,61
5	2,5	935,90	0,62
6	2,5	947,72	0,63
Стандарт	6,2	3720,69	$x_{\text{cp}} = 0,62$

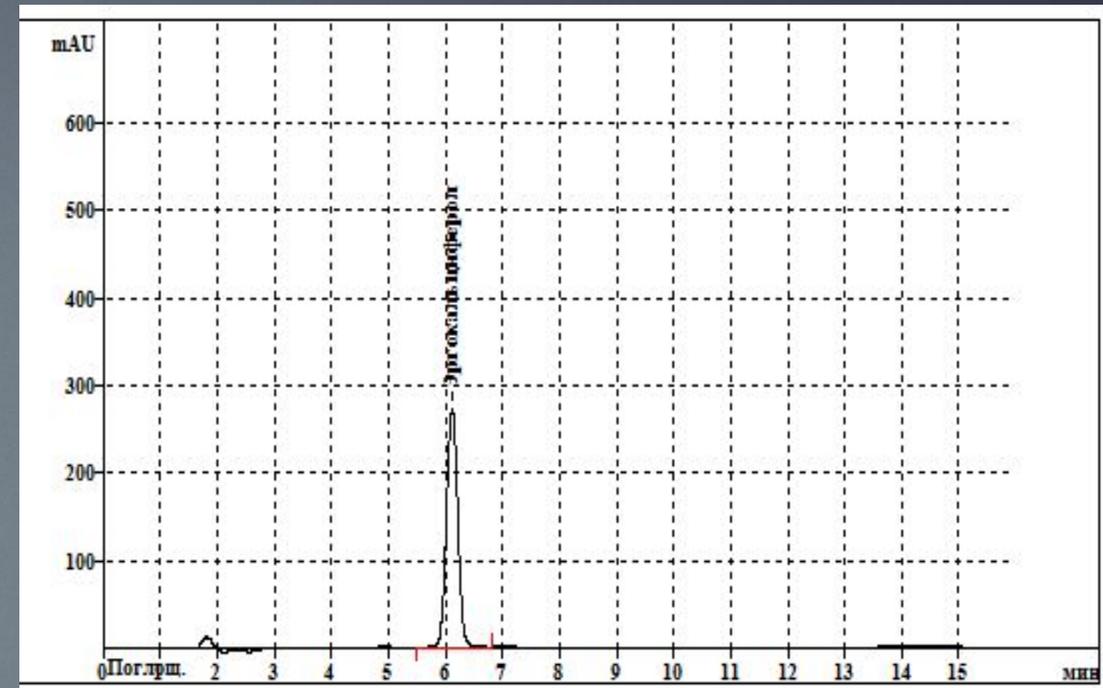


Стандартное отклонение для 6 определений (n=6) $SD = 0,01$
Относительное стандартное отклонение $RSD = 0,96 \%$
Доверительный интервал $\Delta x = 0,01$ (критерий Стьюдента $t = 2,57$
для $f = 5$ и $P = 95\%$)
Содержание эргокальциферола $x = 0,62 \pm 0,01$ мг

Проведение проверки методики на соответствие критериям прецизионности (воспроизводимость)

28

Испытуемый раствор	Объем аликвоты, мл	Площадь пика по 3 хроматограммам, mAU	Содержание эргокальциферола, мг/мл (x)
1	2,5	911,15	0,61
2	2,5	912,18	0,61
3	2,5	914,21	0,62
4	2,5	920,03	0,62
5	2,5	920,80	0,62
6	2,5	921,66	0,62
Стандарт	6,2	3683,42	$x_{cp} = 0,62$



Стандартное отклонение для 6 определений (n=6) $SD = 0,003$

Относительное стандартное отклонение $RSD = 0,51 \%$

Доверительный интервал $\Delta x = 0,003$ (критерий Стьюдента $t = 2,57$ для $f = 5$ и $P = 95\%$)

Содержание эргокальциферола $x = 0,62 \pm 0,003$ мг

Критерий приемлемости: относительное стандартное отклонение серии результатов не превышает 2,0%; результаты, полученные в двух сериях, статистически достоверно идентичны.

Испытуемый раствор	Содержание эргокальциферола, мг в 1 мл препарата (x_1)	Испытуемый раствор	Содержание эргокальциферола, мг в 1 мл препарата (x_2)
1	0,62	1	0,61
2	0,62	2	0,61
3	0,62	3	0,62
4	0,61	4	0,62
5	0,62	5	0,62
6	0,63	6	0,62
Среднее содержание, мг	0,62	Среднее содержание, мг	0,62
Относительное стандартное отклонение, %	0,96	Относительное стандартное отклонение, %	0,51
t-критерий	1,71		

Относительное стандартное отклонение в серии не превышает 2,0%; t-критерий не превышает критерия Стьюдента, результаты двух серий статистически достоверно идентичны; результат соответствует требованиям прецизионности

Проведение проверки методики на соответствие критериям линейности

30

Критерий приемлемости: аналитический сигнал (площадь пика) линейно зависит от содержания витамина Д₂ в диапазоне концентраций от 80% до 120% от номинального содержания; степень корреляции не ниже 0,99.

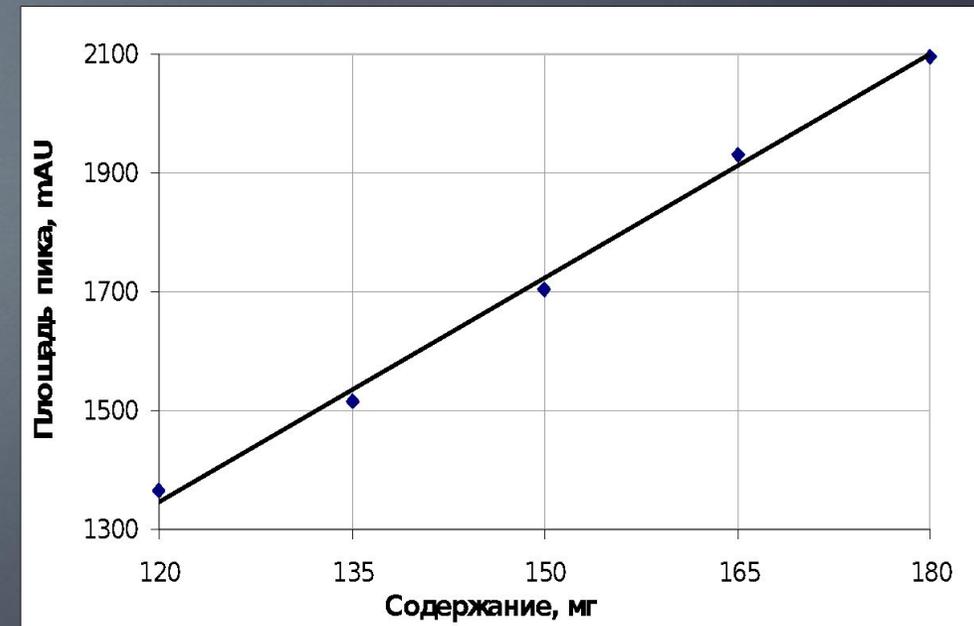
Уравнение площади пика как функции от содержания эргокальциферола в таблетке имеет вид:

$$S = y = 1341 \cdot C + 53,866$$

Степень корреляции $R^2 = 0,999$

Модельная смесь	Содержание эргокальциферола в % от номинального	Содержание эргокальциферола, мг/мл	Площадь пика по 3 хроматограммам, mAU	Площадь пика, рассчитанная по уравнению прямой
		x	y	$y' = y = 1341x + 53,866$
1	80	0,500	727,62	724,37
2	90	0,563	805,65	808,18
3	100	0,625	889,48	891,99
4	110	0,688	975,35	975,80
5	120	0,750	1061,82	1059,62
$n = 5$		$x_{cp} = 0,625$	$y_{cp} = 891,98$	$y'_{cp} = 891,99$

Методика количественного определения Эргокальциферол-ЛекТ удовлетворяет требованиям линейности; площадь пика линейно зависит от содержания эргокальциферола в препарате в заданном диапазоне с высокой степенью корреляции



Проведение проверки методики на соответствие критериям правильности

Критерий приемлемости: среднее значение правильности определения содержания витамина Д₂ составляет от 98,0 до 102,0% от теоретического содержания.

Модельная смесь	Содержание эргокальциферола в % от номинального	Теоретическое содержание эргокальциферола, мг/мл	Найденное содержание эргокальциферола, мг/мл	Правильность R в % от теоретического значения
П0	100			
П1	80	0,500	0,509	101,78
П2	80	0,500	0,506	101,18
П3	80	0,500	0,501	100,10
П4	100	0,625	0,619	99,08
П5	100	0,625	0,617	98,77
П6	100	0,625	0,617	98,68
П7	120	0,750	0,736	98,07
П8	120	0,750	0,737	98,32
П9	120	0,750	0,738	98,41

По результатам 9 определений правильность составляет $99,38 \pm 1,03 \%$

Определение диапазона применения

Критерий приемлемости: в заданном диапазоне выполняются условия линейности, правильности, прецизионности.

Параметр	Диапазон исследования
Линейность	0,50-0,75 мг /мл
Правильность	0,50-0,75 мг /мл
Прецизионность	0,62 мг/мл

диапазон применения методики количественного определения
Эргокальциферол-ЛекТ составляет 0,50-0,75 мг
эргокальциферола в 1 мл препарата

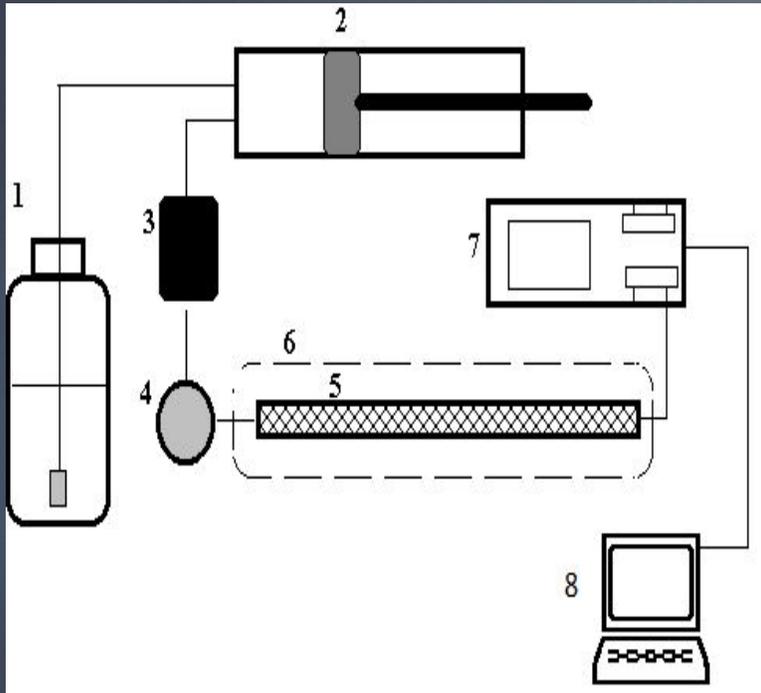
- ▶ В результате проведенной работы были протестированы методики количественного определения ранитидина и эргокальциферола методом ВЭЖХ;
- ▶ Подобраны оптимальные условия анализа;
- ▶ Выполнена проверка аналитических методик по таким критериям как специфичность, прецизионность, правильность, линейность, определен диапазон применения данных методик;
- ▶ Проведена статистическая обработка полученных данных
- ▶ По итогу валидационных работ было сделано заключение о возможности применения данных аналитических методик для дальнейшего анализа препаратов Ранитидин-ЛекТ и Эргокальциферол-ЛекТ на предприятии.

Спасибо за внимание



Устройство жидкостного хроматографа

36



1. узел подготовки подвижной фазы, включая емкость с подвижной фазой (или емкости с отдельными растворителями, входящими в состав подвижной фазы) и систему дегазации подвижной фазы;
2. насосная система предназначена для создания постоянного потока растворителя;
3. смеситель подвижной фазы;
4. система ввода пробы (инжектор), может быть ручным или автоматическим (автосамплер) обеспечивает ввод пробы смеси разделяемых компонентов в колонку с достаточно высокой воспроизводимостью;
5. хроматографическая колонка;
6. термостат обеспечивает постоянство выбранного температурного режима;
7. детектор (один или несколько с разными способами детектирования);
8. система управления хроматографом, сбора и обработки данных.

Проведение проверки методики на соответствие критериям специфичности

Модельная смесь	Критерий приемлемости	Результат
Р	Нет пиков определяемых веществ	На хроматограмме нет пиков
С1	Нет пиков определяемых веществ	Нет пиков
С2	Пик стандартного образца ранитидина	1 пик: время удерживания 5,299 мин, асимметрия 1,04, эффективность колонки 4791 ТТ
С3	Основной пик ранитидина. Параметры пика совпадают с соответствующими на хроматограмме С2	1 пик ранитидина: время удерживания 5,312 мин, асимметрия 0,99, эффективность колонки 5604 ТТ