

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ХИМИИ
Кафедра органической и экологической химии

РЕКОМЕНДОВАНО К ЗАЩИТЕ
В ГЭК И ПРОВЕРЕНО НА ОБЪЕМ
ЗАИМСТВОВАНИЯ

Заведующий кафедрой

к.т.н., доцент

 Шигабаева Г.Н.

18 июня 2018 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
(магистерская диссертация)

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

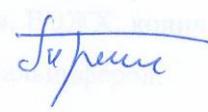
04.04.01 Химия

Магистерская программа «Химия нефти и экологическая безопасность»

Выполнила работу
Студентка 2 курса
очной формы обучения

 Крючкова
Анастасия
Сергеевна

Научный руководитель
канд. хим. наук, доцент,

 Третьяков
Николай
Юрьевич

Рецензент
к. х. н, доцент кафедры
неорганической и физической
химии ТюмГУ

 Мониная
Монина
Людмила
Николаевна

г. Тюмень, 2018

Реферат

Целью данной работы являлось экспериментальное подтверждение пригодности методик количественного определения ранитидина в таблетках Ранитидин-ЛекТ и эргокальциферола (витамина Д₂) в препарате Эргокальциферол-ЛекТ методом ВЭЖХ.

Для выполнения работы необходимо было решить следующие задачи: предварительное тестирование методик количественного определения ранитидина и эргокальциферола методом ВЭЖХ; осуществление подбор условий анализа; проведение работ по подтверждению пригодности выбранных методик; статистическая обработка полученных данных и занесение результатов исследования в протокол предприятия.

В ходе работы использованы: методы ОФ-ВЭЖХ анализа.

В результате было проведено предварительное тестирование методик количественного определения ранитидина и эргокальциферола методом ВЭЖХ, осуществлен подбор условий проведения анализа, в результате которого удалось создать хроматографическую систему, удовлетворяющую условиям пригодности, проведены работы по подтверждению пригодности выбранных методик. Результаты статистической обработки полученных данных подтвердили возможность дальнейшего использования аналитических методик для контроля качества продукции на производстве. Результаты испытаний занесены в протокол предприятия.

Ключевые слова: хроматография, ВЭЖХ, количественное определение, оценка пригодности, ранитидин, эргокальциферол.

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	6
1.1 Хроматография.....	6
1.1.1 Хроматография как метод анализа.....	6
1.1.2 Классификация хроматографических методов.....	7
1.1.3 Аппаратура для жидкостной хроматографии.....	15
1.2 Валидация и верификация аналитических методик.....	19
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	20
2.1. Оборудование и реактивы.....	20
2.2. Описание устройства жидкостного хроматографа «Стайер».....	20
2.3 Аналитическая методика количественного определения ранитидина в препарате Ранитидин-ЛекТ, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 150 мг.....	22
2.4 Аналитическая методика количественного определения эргокальциферола в препарате Эргокальциферол-ЛекТ (витамин D ₂) раствор [в масле] 0,0625 % методом ВЭЖХ.....	23
2.5 Порядок оценки пригодности аналитической методики количественного определения.....	25
2.6 Математическая обработка данных.....	26
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ.....	27
3.1 Подтверждение пригодности методики количественного определения ранитидина в таблетках Ранитидин-Лект.....	27
3.2 Проведение количественного определения эргокальциферола (витамин D ₂) раствор [в масле] 0,0625 %.....	28
3.3 Подтверждение пригодности методики количественного определения витамина D ₂ в масляном растворе Эргокальциферол-Лект.....	32
ВЫВОДЫ.....	32
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	34
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	38

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ИЮПАК - международный союз теоретической и прикладной химии (рус. аббр. ИЮПАК, англ. International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC)

НФ – неподвижная фаза

ОФ-ВЭЖХ – обращено-фазовая высокоэффективная хроматография

ПФ – подвижная фаза

СО – стандартный образец

СКО - среднее квадратическое отклонение

ТТ – теоретические тарелки

С18 - октадецил

Введение

В системе обеспечения качества фармацевтической продукции значительное внимание уделяется аналитическому контролю сырья, промежуточной продукции и готовых лекарственных средств. Аналитические методы анализа применяются на всех стадиях процесса производства, начиная от разработки новых препаратов и заканчивая серийном выпуске фармацевтической продукции.

Анализ лекарственных средств оцениваются по многим показателям качества. Например, определяется подлинность лекарственного средства, анализируется его чистота и проводится количественное определение активных веществ и примесей.

Для того, чтобы аналитическая методика определения вышеперечисленных параметров заняла достойное место в системе обеспечения качества продукции, соответствовала своему назначению, то есть гарантировала достоверные и точные результаты анализа, предусмотрена процедура подтверждения пригодности аналитических методик.

Целью данной работы является экспериментальное подтверждение пригодности методик количественного определения ранитидина в таблетках Ранитидин-ЛекТ и эргокальциферола (витамина D_2) в препарате Эргокальциферол-ЛекТ методом ВЭЖХ.

Для выполнения работы необходимо было решить следующие **задачи**: предварительное тестирование методик количественного определения ранитидина и эргокальциферола методом ВЭЖХ; осуществить подбор условий анализа; проведение работ по подтверждению пригодности выбранных методик; статистическая обработка полученных данных и занесение результатов исследования в протокол предприятия.

Глава 1. Литературный обзор

1.1 Хроматография

1.1.1 Хроматография как метод анализа.

Хроматография — это метод разделения, анализа и очистки смесей веществ, а также изучения физико-химических свойств веществ, таких как, относительные времена удерживания, разделяющая способность данной колонки для анализа конкретного вещества или его смеси [1]. Это возможно благодаря различию веществ по химическому сродству, т.е. распределяться между двумя фазами — неподвижной (твёрдая фаза или жидкость, связанная на инертном носителе) и подвижной (газовая или жидкая фаза, элюент).

Впервые данный метод описал М. Цвет в своей работе, в ходе которых ему удалось разделить яркоокрашенные растительные пигменты с применением колонки, наполненной карбонатом кальция.

Основные определения, относящиеся к хроматографическому методу анализа были систематизированы и унифицированы специальной комиссией ИЮПАК [4]. В соответствии с рекомендациями, термин «хроматография» имеет три значения и обозначает специальный раздел химической науки, процесса, а также метода анализа.

Подвижная фаза (элюент) - поток жидкости, флюида или газа, перемещающий компоненты разделяемой смеси вдоль неподвижной фазы [5].

Неподвижная фаза (сорбент) – твердое вещество или несмешивающаяся с подвижной фазой жидкость, на которых осуществляется разделение компонентов анализируемой смеси [5].

Адсорбент – твердое вещество, концентрирующее на своей поверхности газы, пары или растворенные вещества [5].

Абсорбент - твердый или жидкий сорбент растворяющий в своем объеме газы, пары или компоненты жидких смесей.

Сорбат - вещество, удерживаемое сорбентом (в хроматографии - компонент разделяемой смеси) [5].

Элюат - выходящий из колонки поток подвижной фазы с компонентами разделяемой смеси веществ.

Колонка - элемент хроматографической системы, содержащий сорбент, служит для разделения смеси на индивидуальные компоненты.

Хроматограмма – отражение зависимости концентрации компонентов на выходе из колонки от времени [5].

Детектор - устройство регистрирующее процесс хроматографирования.

Хроматограф — прибор для проведения хроматографического анализа.

1.1.3 Классификация хроматографических методов

На данный момент в источниках отсутствует единая и общепринятая классификация хроматографических методов. Согласно [6] хроматографические методы различают по ряду признаков.

По цели назначения выделяют следующие разделы:

- аналитическая хроматография, служит для качественной и количественной оценки состава смесей;

- препаративная, применяется для выделения вещества в чистом и особо чистом виде;

- промышленная, применяется для выпуска индивидуальных веществ и для контроля лекарственных препаратов в больших количествах [7].

По физической природе неподвижной и подвижной фаз различают жидкостную (ПФ жидкая) и газовую (ПФ газообразная) хроматографию.

В зависимости от способа перемещения сорбатов вдоль слоя сорбента:

- элюентный — проба анализируемой смеси вводят в начальной точке (на входе в колонку) в разделительную насадку (сорбент). Под действием подвижной фазы зона пробы перемещается вдоль колонки, причём скорости перемещения отдельных компонентов определяются константами распределения;

- при фронтальном перемещении элюента разделяемая смесь фактически играет роль подвижной фазы и непрерывно поступает на сорбирующий слой [7].

Разделение вытеснительным и проявительным способами имеют общую методику, но отличаются перемещением хроматографических зон, которое обусловлено вытеснением компонентов анализируемой смеси веществом, взаимодействие которого с НФ наиболее сильное [6].

Электрохроматография — это хроматографический процесс, в котором движение заряженных частиц обусловлено приложением к ним электрического поля. В этом случае скорость их движения зависит от массы и заряда частиц.

Элюентный (проявительный) метод хроматографии получил наибольшее распространение для аналитических целей.

По природе взаимодействия сорбатов с ПФ и НФ выделяют следующие типы хроматографии:

- адсорбционная хроматография;
- распределительная хроматография;
- ионообменная хроматография;
- осадочная хроматография;
- аффинной хроматография;
- эксклюзионная хроматография [6].

По рабочему давлению:

- хроматография низкого давления (FPLC) - разделение компонентов смеси происходит в хроматографической колонке при нормальном (гидростатическом) или немного повышенном давлении. Этим способом разделяют разнообразные смеси веществ — от низкомолекулярных соединений до сложных биополимеров и их комплексов. Этот вид хроматографии применяется для переработки больших объемов жидкости, когда не ставится задача достижения высокого разрешения и нет ограничений по продолжительности эксперимента [8];

- хроматография высокого давления (HPLC) – данный метод широко используется при разделении смеси сложных веществ (среднее время анализа от 2 до 25 минут). Отличительной особенностью ВЭЖХ является использование высокого давления (до $4 \cdot 10^2$ МПа) и мелкозернистых сорбентов (обычно диаметр зерен около 3—5 мкм, в современной технике возможно использование сорбентов с размеров частиц до 1,8 мкм) [6];

- хроматография ультравысокого давления (UHPLC) представляет собой вариант ЖХ, характеризуется высокой эффективностью по сравнению с классической ВЭЖХ. Отличительной особенностью метода UHPLC является более высокое давление, которое может достигать 800 – 1200 бар, что обуславливается за счет применения сорбентов с меньшим размером частиц (1,5 до 3 мкм). Длина хроматографических колонок обычно составляют 50 – 250 мм в длину и от 1 до 4 мм в диаметре, но для специфических анализов могут использовать и колонки не стандартных размеров. Хроматографическое оборудование и колонки, используемые в ультраэффективной жидкостной хроматографии специально адаптированы для выполнения требований этого вида хроматографии, однако может использоваться и в классическом варианте высокоэффективной жидкостной хроматографии [9].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – это метод колоночной хроматографии, в основе которого жидкость перемещается по хроматографической колонке, заполненной НФ [9].

В зависимости от процесса разделения веществ различают следующие подтипы ВЭЖХ: адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную, хиральную и другие [7].

Многомерная хроматография (GCXGC)

Газовая хроматография является одним из наиболее широко используемых методов в аналитической области благодаря следующим характеристикам: универсальность, быстрота, мощность разрешения, чрезвычайно маленькие образцы, автоматизация, использование капиллярных колонок и все более эффективные и современные приборы. Кроме того, этот метод имеет

низкую относительную погрешность и дает очень согласованные и реплицируемые анализы. При анализе нефтепродуктов газовая хроматография в сочетании с различными системами детектирования широко используется для различных определений. Существуют различные аналитические методы, которые могут обеспечить качественную и количественную информацию о соединениях, присутствующих в различных фракциях компонентов или в готовом бензине. Однако информация, полученная с использованием этих методов, является лишь частичной и, следовательно, не позволяет определять все различные классы углеводородов в одном анализе.

Преимущества метода GCXGC включали: полное разрешение всех ароматических компонентов из матрицы сложных смесей, группировку связанных ароматических компонентов для быстрой идентификации и интеграции, пиковое сжатие теплового модулятора для улучшения сигнала с шумом и компонентами и надежное количественное определение с использованием внутренних стандартов, и пламенно-ионизационный детектор. Еще одно преимущество – универсальность инструментария GCXGC.

Использование GC × GC для анализа фальсифицированных лекарственных средств было недавно рассмотрено Mitrevski et al.¹⁴⁸. Эта же группа также использовала GC × GC для характеристики летучих соединений, найденных в таблетках. Их целью было найти химические «отпечатки пальцев», которые могли бы быть используется для идентификации происхождения лекарственных таблеток. Сначала они проверили эффективность нескольких комбинаций колонок и обнаружили, что BPX5 × BP20 (то есть полиэтиленгликоль) обеспечивает наилучшее разделение. Они провели анализ свободного пространства в 25 различных списках с помощью SPME-GC × GC. PCA использовался для демонстрации того, что летучие профили отдельных планшетов могут успешно идентифицировать страну происхождения.

Gao и соавт.¹⁵³⁻¹⁵⁴⁻¹⁵⁵ использовали сочетание твердофазной экстракции с GC × GC-TOFMS для изучения летучих соединений, полученных

из сушёных корней, применяемых в традиционной китайской медицине. Они экспериментировали с различными комбинациями колонок и обнаружили, что наилучшие пиковые формы и наименьшее число уровней были обнаружены при использовании стационарной фазы SLB-5MS \times BP20. Они смогли идентифицировать 294 летучих соединений, включая алкены, карбонилы и терпеноиды. Cao et al. провели аналогичные исследования, в которых профили летучих органических веществ двух китайских лекарственных трав были проанализированы GC \times GC-TOFMS. В первом исследовании 163 летучих соединения идентифицировали из свежей мяты (*Mentha haplocalyx*) и обнаружили, что они содержат высококипящие кетоны и терпены, включая ментол и ментон. Во втором исследовании изучался профиль летучих органических веществ из растительного лекарственного материала из хризантемы *morifolium* до и после фумигации серы, общий метод стерилизации. Результаты показали, что значительная потеря этих активных компонентов в фумигированных образцах серы. Оба этих исследования демонстрируют, что GC \times GC является эффективным подходом для анализа летучих компонентов в лекарственных препаратах.

Модуляция является основным процессом при любом всестороннем двухмерном хроматографическом разделении. Модулятор последовательно и систематически собирает аналиты, поскольку они элюируются и поступают из первой колонки их во вторую колонку. Существует много возможностей модуляции для комплексной двумерной газовой хроматографии (GC \times GC): резистивный нагрев окрашенных зон капилляра модулятора, вращательное движение щелевого нагревателя, продольное движение холодной ловушки, криогенные струи с комбинацией или без комбинации горячей струей и резистивным нагревом с или без криогенной ловушки и т. д. Напротив, комплексная двумерная жидкостная хроматография (LC \times LC) не была продемонстрирована в онлайн-режиме без использования переключающих клапанов. LC \times LC с использованием переключающих клапанов может выполняться с или без ловушек. Колонка-ловушка предлагает механизм фокусировки,

однако повторное уравнивание ловушки не всегда достигается, и эффективность сжатия полосы уменьшается во время анализа, если только подвижная фаза второго градиента по размеру значительно превышает уровень первой градиента размера или если в период модуляции учитывается шаг уравнивания. Кроме того, переключающие клапаны оказывают отрицательное влияние на двумерную систему, например, импульсы давления (<10% рабочего давления для отдельного клапана разделяющего поток на две части), вызванные переключением, что также влияет на колонку второго измерения и уменьшает ее срок службы.

Высокие температуры обычно используются в LC для достижения более быстрого разделения, улучшения избирательности и разрешения и уменьшения противодавления, хотя обычно проводятся в изотермических условиях. Поскольку адаптация резистивного нагрева с низкой тепловой массой (LTM) от GC5 до LC31 была проведена серия исследований элюирования теплового градиента и пульсации температуры для управления дискретными участками разделения.

Температуру можно также использовать для пиковой фокусировки, индуцируя эффект сжатия - использование изменения удерживания с температурой и переход от низкой температуры для захвата до более высоких температур для высвобождения. Температуры окружающей среды используются для инъекций большого объема, когда в головке колонны создается холодная зона, а остальная часть колонны поддерживается либо при температуре окружающей среды, либо при повышенных температурах. Реабилитация зоны впрыска большого объема осуществляется путем перемещения колонны в горячую зону или путем вспомогательного нагрева. Аналогичным образом, температура окружающей среды была использована для максимального сжатия перед обнаружением, когда чередующаяся холодная и горячая зона создается путем затопления резервуара, окружающего колонну. Постепенное и сегментированное регулирование температуры для обработки разрешения

также было достигнуто с помощью нескольких элементов, где каждый блок контролировался индивидуально.

Важным условием успешного сжатия путем модуляции является относительное удержание ловушки модулятора в стационарной фазе первого измерения. Кроме того, важными параметрами являются быстрые и большие изменения удержания анализируемого вещества и скорости миграции на ловушке модулятора при улавливании (низкой) и ремобилизации (высоких) температурах. Продольный тепловой модулятор на колонке проложил новый путь для комплексной двумерной жидкостной хроматографии. Признание двухступенчатого активного модулятора имеет первостепенное значение для работы LC × LC. Пиковая пропускная способность имеет решающее значение, и сокращение двумерной пиковой ширины является одной из возможностей для достижения этой цели. Разделение LC × LC красного вина с использованием продольного теплового модулятора на колонке достигало до 60% более узких полос дискретных пиков во втором измерении по сравнению с модулем на основе клапана при других идентичных условиях. Кроме того, отношение сигнал-шум на порядок превышало продольный тепловой.

HPLC является наиболее используемым диагностическим устройством в качестве части исследования лекарств. ВЭЖХ-масс-спектрометрия [МС] и газовая хроматография-масс-спектрометрия [ГХ-МС]. Несмотря на то, что эти процедуры, использующие MS-искатели, более конкретны и деликатны, чем меры ВЭЖХ-УФ, и дают низкие точки удержания открытия, ключевое оборудование может быть недоступно в многочисленных исследовательских учреждениях. Большая часть ВЭЖХ-УФ-систем испытывает вредные последствия различных препятствий, в том числе отсутствие осознанности; использование дорогостоящих сильных картриджей для экстракции сцены, длительное время работы или полная трудоемкость универсальной стадии [1].

Третичная смесь SS, ВН и ЕТ еще не является официальной в любой фармакопее. В качестве стандартной записи для проведения исследований

SS, ВН и ЕТ в их консолидированных формах измерений не может быть применена методика ВПЖ и ВЭЖХ. Таким образом, была необходима простая, быстрая, умеренная и твердая методика ОФ-ВЭЖХ для оценки этих лекарств в смеси. Все научные системы и системы утверждения, приведенные в настоящем исследовании, соответствовали правилам ICH [2]. Они имеют решающее значение при анализе лекарств. Испытательное исследование в этом исследовании использует метод HPL-MS / MS. Контрастная и прошедшая прямолинейная эмиссионная жидкостная хроматография, она не только обладает способностью к исследованию стадии разделения жидкости, но также обладает массой обильных узнаваемых доказательств и структурной экспертизы. Интенсивность ВЭЖХ-МС / МС имеет благоприятные условия для тестирования идентификационных качеств, повторяющихся количественных исследований, адекватной аффективности и селективности, быстрого изучения и полезности. Он дополнительно может исследовать сложную атомную структуру жидкости организма [3].

Стероидные сапонины из *Dioscorea zingiberensis* CHWright были выделены интересным образом с использованием двух хроматографических процедур для исследования: противоточная хроматография (CCC) в сочетании с испарительным рассеивающим рассеивателем (ELSD) и препаративная повернутая на поверхности высокоэффективная жидкостная хроматография (RP-HPLC) с ярким локатором [4-8]. При попытке бороться с цепкой проблемой жизненного цикла белков, особенно среди детей, в Африке было создано несколько методов для создания прочной питательной среды, богатой белками, для поддержания ребенка; Композиции из риса, сои и арахиса дали планы контроля веса с улучшенной диетической частью. Солодовые зерна, соевые бобы и композиты из арахиса дали методологии приема пищи, богатые белками и минералами. ВЭЖХ чрезвычайно полезна

Был разработан метод ВЭЖХ для определения и идентификации содержания берберины в *Coptidis Radix*, *Phellodendri Cortex* и связанной с ним коммерчески приготовленной традиционной китайской медицине Хуан-

Лиан-Цзе-Ду-Тан. Берберин разделяли фенилсодержащей колонкой с двумя видами подвижных фаз ацетонитрила: метанол: 20 мМ фосфат. Ацетонитрил: 20 мМ фосфат (30: 70 об. / Об.) для одиночной травы и растительного препарата, соответственно. Обе подвижные фазы доводили до рН 3,0 с помощью H_3PO_4 и легировали 0,1 мМ 1-октансульфоновой кислотой. Использовали скорость потока 1 мл / мин. УФ-детектирование было установлено на уровне 346 нм. В обеих системах ВЭЖХ интра-анализ и интер-анализ точности и точности берберина составляли менее $\pm 10\%$ в диапазонах концентраций 0,5-50 мкг / мл. Были проведены различные оптимизации для изучения содержания берберина в лекарственных препаратах и их препаратах, включая время удерживания, аутентичный стандарт шипа, изменение длины волны, изменение состава подвижной фазы и пустого теста. Наши результаты показывают, что содержание берберина в травяном препарате Хуан-Лиан-Джие-Ду-Тан ($8,15 \pm 0,39$ мг / г) было меньше, чем у единственной травы *Coptidis Radix* ($53,63 \pm 2,45$ мг / г), но выше, чем в *Phellodendri Cortex* ($3,02 \pm 0,22$ мг / г) при экстрагировании водой, что говорит о том, что эффекты травяных матриц были задействованы в множественных композициях растительного препарата, что дает некоторую ценную информацию для клинического применения лекарственных трав.

1.2.2 Аппаратура для жидкостной хроматографии

В современной жидкостной хроматографии используют приборы различной степени сложности: от наиболее простых систем, до хроматографов высокого класса, снабженных различными дополнительными устройствами.

На рис. 1.5 представлена блок-схема жидкостного хроматографа, содержащая минимально необходимый набор составных частей, в том или ином виде, присутствующих в любой хроматографической системе.

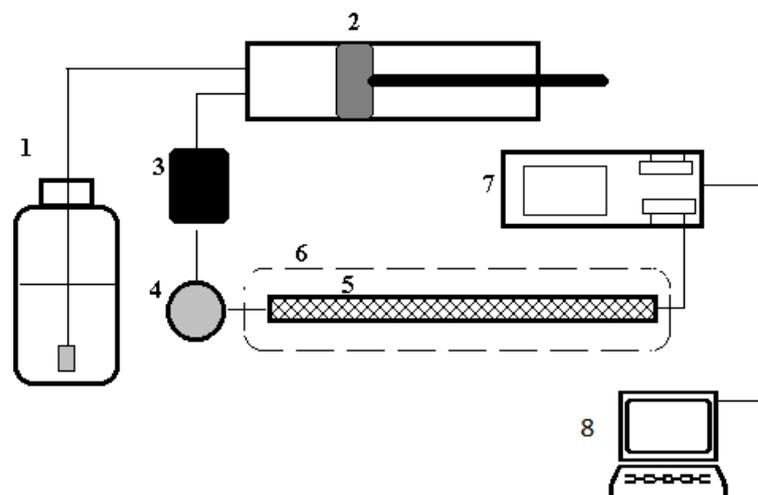


Рис. 1.5. Блок-схема жидкостного хроматографа.

В состав прибора обычно входят следующие основные узлы:

- узел подготовки подвижной фазы (1);
- насосная система (2), предназначенная для создания постоянного потока растворителя;
- смеситель подвижной фазы (3);
- система ввода пробы (инжектор), может быть ручным или автоматическим (автосамплер) (4), обеспечивает ввод пробы смеси разделяемых компонентов в колонку с достаточно высокой воспроизводимостью;
- хроматографическая колонка (5);
- термостат (6), поддерживающий выбранный температурный режим;
- детектор (один или несколько с разными способами детектирования) (7);
- система управления хроматографом, сбора и обработки данных (8).

Помимо этого в состав хроматографа могут входить: система пробоподготовки и предколоночный реактор, система переключения колонок, постколоночный реактор и другое оборудование.

В смесителе происходит образование единой подвижной фазы из отдельных растворителей, подаваемых насосами при градиентном режиме элюирования. Смешение компонентов элюента может происходить как при низком давлении (до насосов), так и при высоком давлении (после насосов).

Смеситель можно использовать для подготовки подвижной фазы и при изократическом режиме элюирования [9].

Инжектор - система для ввода проб могут быть универсальными, с возможностью изменения объема пробы, или дискретными - только определенного объема. Оба типа могут быть автоматическими («автосэмплеры»). Инжектор расположен непосредственно перед хроматографической колонкой. Его конструкция предусматривает возможное изменение направления потока подвижной фазы, в связи с чем появляется возможность осуществлять предварительное введение пробы в петлю-дозатор определенного объема (обычно от 10 до 100 мкл) или в специальное дозирующее устройство переменного объема. Объем петли указан на ее маркировке. Конструкция дискретного инжектора, как правило, позволяет осуществлять замену петли. Современные автоматические инжекторы могут обладать дополнительными опциями, например, выполнять функцию станции пробоподготовки: осуществлять смешение и разбавление анализируемых образцов, проводить реакцию предколоночной дериватизации [9].

Хроматографические колонки обычно представляют собой трубки из нержавеющей стали, стекла или пластика, заполненные сорбентом и закрытые с обеих сторон фильтрами с диаметром пор 2–5 мкм. Длина аналитической колонки может находиться в диапазоне от 5 до 60 см и более, внутренний диаметр – от 2 до 10 мм. Колонки с внутренним диаметром менее 2 мм применяются в микроколоночной хроматографии. Существуют также капиллярные колонки с внутренним диаметром около 0,3–0,7 мм. Колонки для препаративной хроматографии могут иметь внутренний диаметр 50 мм и более [9].

Перед аналитической колонкой могут устанавливаться короткие колонки (предколонки), выполняющие вспомогательные функции, основная из которых — защита аналитической колонки. Обычно анализ проводят при комнатной температуре, однако для увеличения эффективности разделения и

сокращения продолжительности анализа может быть использовано термоста-
тирование колонок при температурах от 30 до 100 °С. Возможность исполь-
зования повышенной температуры при разделении ограничивается стабиль-
ностью неподвижной фазы, поскольку при повышенных температурах воз-
можно ее разрушение [12].

Для хроматографических испытаний используются различные детекти-
ры (таб.1).

Таблица 1

Характеристики детекторов для ВЭЖХ

Детектор	Измеряемое физическое свойство	Чувствительность, мг в пробе	Селективность
Фотометрический	Оптическая плотность при фиксированной длине волны	10^{-10}	высокая
Спектрофотометрический	Оптическая плотность при выбираемой длине волны	10^{-9}	высокая
Рефрактометрический	Разность показателей преломления в сравнительной и измерительной ячейках	10^{-5}	малая
Флуориметрический	Интенсивность флуоресценции исследуемых веществ в подвижной фазе	10^{-11}	очень высокая
Амперометрический	Ток окисления или восстановления электрохимически активных соединений	$10^{-9} - 10^{-10}$	очень высокая

Современная система обработки данных представляет собой сопря-
женный с хроматографом персональный компьютер с установленным про-
граммным обеспечением, позволяющим регистрировать и обрабатывать хро-
матограмму, а также управлять работой хроматографа и следить за основны-
ми параметрами хроматографической системы [12].

1.4 Валидация и верификация аналитических методик

Валидация аналитической методики – это экспериментальное подтвер-
ждение того, что новая разработанная методика пригодна для решения пред-

полагаемых задач [19]. Валидации подлежат методики количественного определения, в том числе методики определения примесей и методики определения предела содержания. Методики проверки подлинности подвергаются валидации при необходимости подтвердить их специфичность [20].

Верификация – предоставление объективных свидетельств того, что данный объект полностью удовлетворяет установленным требованиям [20]. Верификацией методик измерений занимается ее пользователь (лаборатория) при внедрении методики в свою практику [21]. В данном случае пользователь должен привести доказательства, что методика измерений в лаборатории реализуется согласно установленных для нее требований:

- специфичности;
- правильности;
- линейности;
- прецизионности;
- диапазон применения.

Подробное описание критериев оценки пригодности аналитических методик указывается в [19]. Данные испытаний обрабатываются по [22] и заносятся в протокол, разработанный в соответствии с [22].

Глава 2. Экспериментальная часть

В данной работе проводится оценка пригодности аналитических методик количественного определения ранитидина и эргокальциферола в готовых

лекарственных средствах методом ВЭЖХ с целью дальнейшего использования данных методик для контроля качества соответствующих препаратов Ранитидин-ЛекТ и Эргокальциферол-ЛекТ (витамин Д₂) на фармацевтическом предприятии ОАО «Тюменский химико-фармацевтический завод».

2.1. Оборудование и реактивы

Таблица 2

Реактивы и оборудование для проведения аналитических испытаний

1. Хроматограф жидкостной «Стайер» со спектрофотометрическим детектором;	
2. Весы лабораторные, 2-ой класс точности, с верхним пределом взвешивания 200 г;	ГОСТ 24104
3. Метанол для ВЭЖХ;	ГОСТ 1770
4. Изопропиловый спирт для ВЭЖХ;	
5. Стандартный образец Ранитидина гидрохлорида	USP RS
6. Таблетки Ранитидина-ЛекТ, 150 мг	
7. Стандартный образец Эргокальциферола	EP CRS
8. Эргокальциферол-ЛекТ (витамин Д ₂) капли для приёма внутрь [в масле] 0,0625 %	

2.2. Описание устройства жидкостного хроматографа «Стайер»

В лаборатории отдела контроля качества (ОАО «Тюменский химико-фармацевтический завод») для анализов лекарственных веществ и препаратов методом ВЭЖХ используется жидкостный хроматограф "Стайер" со спектрофотометрическим детектором (рис. 2.1).

Принцип действия хроматографа "Стайер" основан на разделении анализируемой смеси на составляющие компоненты в хроматографической колонке и последующем измерении их содержания спектрофотометрическим детектором.

Данный хроматограф состоит из дегазатора, насосной системы, блока смесителя, спектрофотометрического детектора, петлевого дозатора, аналитической колонки, термостата, также оснащен системой сбора данных (персональным компьютером с программным обеспечением «МультиХром»).

Спектрофотометрический детектор состоит из двух функциональных блоков: оптического и электронного. В состав оптического блока входят источник света (дейтериевая лампа), монохроматор, дифракционная решетка. Малошумящий монохроматор с установленной вогнутой голографической решеткой обладает высокой оптической эффективностью, дает возможность использовать малое число оптических элементов, а дифракционная решетка кроме основной функции, выполняет также и функцию фокусировки излучения.



Рис.2.1. Жидкостной хроматограф «Стайер»

2.3 Аналитическая методика количественного определения ранитидина в препарате Ранитидин-ЛекТ, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 150 мг.

Таблица 3

Условия анализа

Колонка	Luna C 18, 4,6x250 мм, 5 мкм
Подвижная фаза	Смесь фосфатного буферного раствора с pH 6,6 – метанолом (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 ранитидина	Около 5,3 мин

Процедура приготовления проб:

Раствор стандартного образца ранитидина гидрохлорида

Навеска стандартного образца (BP CRS, USP RS) ранитидина гидрохлорида массой около 55 мг помещается в мерную колбу вместимостью 50 мл, куда добавляют в 40 мл метанола для растворения и доводят объем раствора метанолом до метки, перемешивают (срок годности раствора 1 сутки). Затем 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивают (раствор используют свежеприготовленным).

Испытуемый раствор

Навеска порошка растертых таблеток Ранитидин-ЛекТ массой около 100 мг переносится в мерную колбу вместимостью 50 мл, к ней прибавляют

40 мл подвижной фазы, проводят растворение с помощью магнитной мешалки в течение 15 мин, доводят объем суспензии подвижной фазой до метки и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтра. Затем 1,0 мл фильтрата вносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, объем раствора доводят подвижной фазой до метки и перемешивают.

Содержание ранитидина ($C_{13}H_{22}N_4O_3S$) в таблетке (X) должно быть от 142 до 158 мг, считая на среднюю массу таблетки.

Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{S \times 0,896 \times 50 \times a_0 \times 25 \times G \times P}{S_0 \times a \times 50 \times 25 \times 100} = \frac{S \times a_0 \times G \times 0,896 \times P}{S_0 \times a \times 100}; \quad (3.1)$$

где 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, в граммах;

a – навеска порошка растертых таблеток, (мг);

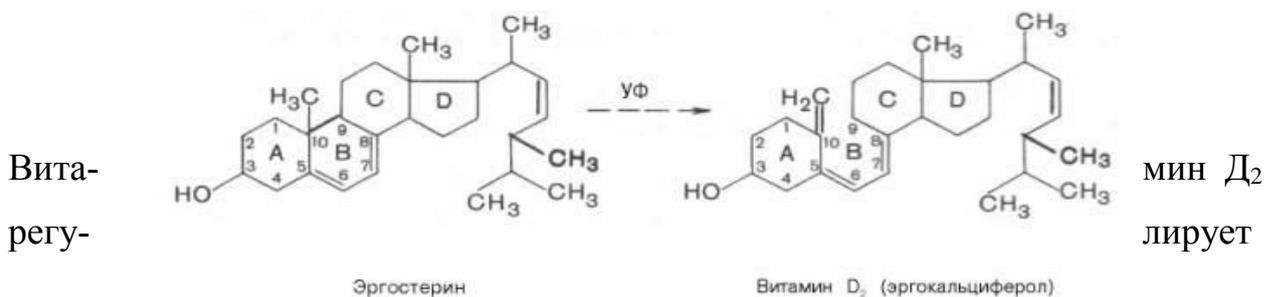
G – средняя масса одной таблетки, (мг);

P – содержание ранитидина гидрохлорида в стандартном образце, в процентах;

0,896 – коэффициент пересчета ранитидина гидрохлорида на ранитидин.

2.4 Аналитическая методика количественного определения эргокальциферола в препарате Эргокальциферол-ЛекТ (витамин D_2) раствор [в масле] 0,0625 % методом ВЭЖХ

Эргокальциферол (витамин D_2) — одна из форм витамина D , образуется при воздействии ультрафиолета на эргостерол по реакции



обмен кальция и фосфора в организме.

Таблица 4

Условия анализа

Прибор	Миличром-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

Приготовление растворов:

Раствор стандартного образца эргокальциферола:

Около 6 мг (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.

Раствор используют свежеприготовленным.

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.

Раствор используют свежеприготовленным.

Проверка пригодности хроматографической системы:

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- 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 %;
- коэффициент асимметрии – не более 1,2.

Последовательно хроматографируют стандартный и испытуемый растворы в условиях. Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Содержание эргокальциферола (X , мг/мл) должно составлять от 0,58 до 0,67 мг, вычисляется по формуле:

$$X = \frac{S \times a \times P \times 50}{S_0 \times 2,5 \times 50 \times 100} = \frac{S \times a \times P}{S_0 \times 250}, \quad (3.2)$$

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, %.

Пригодность данной методики анализа подтверждалась экспериментально по тем же критериям, что и методика количественного определения ранитидина.

2.5 Порядок оценки пригодности аналитической методики количественного определения

Оценка методик (п.2.3 и п.2.4) на соответствие установленным требованиям проводилась по ниже приведенным критериям.

1. Специфичность

Для определения были приготовлены модельные смеси:

Р – растворитель (ПФ);

С1 - раствор плацебо, не содержащий определяемого вещества;

С2 - раствор стандартного образца;

С3 - испытуемый раствор препарата.

2. Прецизионность

Анализ выполняют 2 техника (инженера). Каждый готовит стандартный раствор, и 6 растворов испытуемого образца по методике (п. 2.3 или п.2.4 соответственно).

3. Линейность

Были приготовлены 5 модельных смесей (Л1-Л5) с содержанием определяемого вещества от 80% до 120% от номинального.

4. Правильность

Для определения правильности методики были приготовлены следующие растворы:

П0 – стандартный раствор;

П1 – П9 – модельные смеси с различным содержанием определяемого компонента:

П1, П2, П3 – 80% от номинального;

П4, П5, П6 – 100% от номинального;

П7, П8, П9 – 120% от номинального.

5. Диапазон применения методики

Область определения устанавливали, исходя из результатов всех предыдущих испытаний.

2.6 Математическая обработка данных

Обработка хроматограмм осуществлялась с помощью компьютерного обеспечения «МультиХром» версии 3.4. Статистическая обработка проводилась в соответствии общей фармакопейной статьей [22].

Глава 3. Результаты и их обсуждения

Глава изъята автором

Выводы

1. Проведено предварительное тестирование методик количественного определения ранитидина и эргокальциферола методом ВЭЖХ.
2. Осуществлен подбор условий проведения анализа, в результате которого удалось создать хроматографическую систему, удовлетворяющую условиям пригодности.
3. Проведены работы по подтверждению пригодности выбранных методик.
4. Результаты статистической обработки полученных данных подтвердили возможность дальнейшего использования аналитических методик для контроля качества продукции на производстве.
5. Результаты испытаний занесены в протокол предприятия.

Список литературы

- [1] Хроматография. Основные понятия. Терминология / Под ред. В.А. Даванкова. Серия "Сборники научно-нормативной терминологии". Вып. 114. М.: Комитет научной терминологии РАН, 1997.
- [2] Цвет М. С., Труды Варшавского общества естествоиспытателей, Отд. Биологии, 1903, т. 14.
- [3] Интернет-ресурс «Википедия - свободная энциклопедия». (<http://ru.wikipedia.org/wiki>).
- [4] Nomenclature for chromatography. Pure Applied Chemistry, 1993, Vol. 65, No. 4, pp. 819-872 « (IUPAC Recommendations 1993).
- [5] Интернет-ресурс <http://chromatography.narod.ru/lecture/gc.html>.
- [6] Основы аналитической химии. В 2 кн. Кн. 1. общие вопросы. Методы разделения: Учебник для вузов / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева и др. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Высш. Шк., 2004. - 361 с.
- [7] Рудаков О.Б. Востров И.А. Спутник хроматографиста. — Воронеж: Водолей, 2004. — 528 с.
- [8] Е.А. Илларионова, И.П. Сыроватский, Высокоэффективная жидкостная хроматография. Теоретические основы метода. Практическое применение метода Учебное пособие Иркутск, 2012.
- [9] ОФС.1.2.1.2.0005.15 Высокоэффективная жидкостная хроматография.
- [10] Хефтман Э., Хроматография. Практическое приложение метода, часть 1, 1986,с.- 336.
- [11] Государственная фармакопея РФ XII издания, часть 2, ОФС 42-0096-09.
- [12] Сычев, К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии / Под ред. А.А. Курганова - Москва: Техносфера, 2010. - 123-127 с..
- [13] Бражников В.В., Детекторы для хроматографии, М.: Машиностроение, 1992 г. – 320 с..
- [14] Долгоносков А. М. «Методы колоночной аналитической хроматографии» - учебное пособие для студентов химических специальностей, Дубна ,2009г..
- [15] ОФС.1.2.1.2.0001.15 Хроматография.
- [16] Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Изд-во Наука, 1985 - 536 с..
- [17] Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа. Методическое пособие для специального курса., М.: Изд-во МГУ, 2007. – 204 с..
- [18] Гармонов С. Ю. Контроль качества и безопасность лекарственных препаратов: учебное

пособие / под ред. С. Ю. Гармонова. - Казань: Изд-во Казан. гос. технол. ун-та, 2008. - 171 с..

- [19] ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик.
- [20] General Information Chapter <1226> «Verification of Compendial Procedures». – Pharm. Forum. – 31 (2), 555-558 (2005).
- [21] Г.Р. Нежиховский Валидация, верификация и аттестация методик, Контроль качества продукции, № 9, 2016.
- [22] ОФС.1.1.0013.15 Статистическая обработка результатов химического эксперимента.
- [23] Руководство ВОЗ по надлежащей практике организации производства (требованиям GMP), 1999 г..
- [24] Химическая энциклопедия" т.1 М.: Советская энциклопедия, 1988 стр. 384-385.
- [25] USP Pharmacopeia 30. Official from May 1 2007 to July 31 2007. General Chapter <1010> Analytical Data - Interpretation and Treatment.
- [26] ГОСТ Р 52249-2004. Правила производства и контроля качества лекарственных средств.
- [27] Cazes J. "Encyclopedia of Chromatography" 2004.
- [28] Терещенко А.Г., Пикула Н.П. Внутрिलाбораторный контроль качества результатов химического анализа, Томск: STT, 2017.