



РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕКСПАНТЕНОЛА В 5% ГЕЛЕВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ И ЕГО ВАЛИДАЦИЯ

Камилова Гулноза Сапорбой кизи

Ташкентский фармацевтический институт

Gulnoza.@umail.uz

<https://doi.org/10.5281/zenodo.6034728>

ИСТОРИЯ СТАТЬИ

Принято: 15-декабрь 2021

Утверждено: 15-январь 2022

Опубликовано: 5-февраль 2022

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Декспантенол

АННОТАЦИЯ

В настоящей статье представлены результаты исследования по разработке и валидации методики высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения декспантенола в 5% гели с противовоспалительным действием. На основании проведённой валидации установлены критерии приемлемости методики и доказано, что предложенная методика количественного определения декспантенола является специфичной, линейной в диапазоне её применения, правильной и прецизионной.

Разработанная валидированная методика количественного определения декспантенола предложена для включения её в проект фармакопейной статьи производителя.

Фармакологические свойства

Декспантенол (Dexpanthenolum, R-2,4-Дигидрокси-N-(3-гидрокси-пропил)-3,3-диметилбутанамид) является производным пантотеновой кислоты. Восполняет дефицит пантотеновой кислоты, обладает противовоспалительным и дерматопротективным действием, стимулирует процессы регенерации.

Выпускается в виде мазей, кремов, спреев, аэрозолей. Комбинированные препараты на его основе, такие как мазь «Комбисепт» (декспантенол; хлорамфеникол; бензалкония хлорид (БХ)) и др.

Существует ряд современных физико-химических методов анализа, используемых для определения декспантенола в ЛС, среди которых

метод обращенно-фазовой жидкостной хроматографии является наиболее часто применяемым и описан в современной научной литературе [1-4].

С целью увеличения ассортимента выпускаемых лекарственных средств отечественными фармацевтическими производителями повышения их био доступности и снижения отрицательных эффектов существующих лекарственных форм, и нами был разработан 5% гель на основе декспантенола.

Цель исследований - разработка и валидация унифицированной методики количественного определения декспантенола в новой гелевой лекарственной форм использованием метода ВЭЖХ, которая даст возможность



объективно оценить его в лекарственной форме (ЛФ).

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследований были использованы опытные образцы гели с использованием АФИ, соответствующим требованиям Европейской Фармакопеи: декспантенол (НД РБ 0103 С-2010), компонентами которых явились: карбомер, 400 (ГФ РБ, 2 том, с. 192); вода, очищение сорбент динатрий эдитат, миндальное масло – 1500 (ГФ РБ, 2 том, с. 192).

Для проведения исследований использован жидкостной хроматограф «Agilent 1260 infinity» (Agilent Technologies Германия), который состоит из: четырёхканального плунжерного насоса фирмы «Agilent» (до 400 бар) со скоростью потока 0,001-10 мл /мин с отсеком для растворителей и шагом регулировки подачи растворителя 0,001 мл /мин «Agilent»; вакуумного дегазатора на 4 канала с производительностью до 10 мл /мин «Agilent»; блока автоматического введения проб с объёмом инъекции от 0,1 мкл до 100 мкл с шагом 0,03 мкл «Agilent».

Идентификация декспантенола осуществлена с помощью диодно-матричного спектрофотометрического детектора фирмы «Agilent».

В качестве подвижной фазы использована система, состоящая из буферного раствора (одноосновной натрий фосфат с рН до $2.2 \pm 0,1$ для хроматографии) и ацетонитрила для хроматографии в соотношении (75:25).

Испытуемый раствор 5% -ной гели и раствор рабочего стандартного образца (РСО) декспантенола

приготовлены с концентрацией 0,2 мг /мл.

Методика была утверждена в соответствии с руководящими принципами Международной конференции по гармонизации с использованием параметров, специфичности, линейности, точности (сходимость и внутрилабораторная точность), предела обнаружения (LOD) и предела количественного определения (LOQ), а также и надежности [5-7]. Валидационные характеристики устанавливали на опытных образцах гели, полученных в лабораторных условиях.

Специфичность методики подтверждали путем анализа растворов готовой ЛФ (испытуемый раствор) и «основы», содержащей все компоненты ЛФ за исключением декспантенола (в 6 повторениях). Критерием приемлемости явилось отсутствие на хроматограмме раствора «основы» пика со временем удерживания, соответствующего времени выхода пика декспантенола.

Линейность оценивали путем анализа, по меньшей мере пяти уровней концентраций в гели в трех экземплярах, охватывающих значения в диапазоне $80 \% \div 120 \%$ от номинального содержания декспантенола (30-70 мкг /мл). Расчеты линейности вели с использованием метода наименьших квадратов по экспериментально измеренным значениям «у» для заданных значений аргумента «х». Критерием приемлемости служил коэффициент корреляции линейной зависимости (r), который должен составлять не менее 0,99.

Для доказательства сходимости методики испытания было последовательно проанализировано



одним химиком в один день на одном и том же оборудовании шесть образцов одной серии ЛФ.

Внутрилабораторная прецизионность была установлена двумя аналитиками в разные дни на разном оборудовании путем последовательного анализа 6 образцов одной серии ЛФ. Критерием приемлемости были: относительное стандартное отклонение (RSD, %), рассчитанное для количественного содержания декспантенола, полученное в условиях повторяемости, не должно превышать 2,0 %; различие значений дисперсий S_1^2 и S_2^2 средних результатов двух выборок, полученных в условиях внутрилабораторной воспроизводимости при определении содержания декспантенола в идентичных образцах ЛФ, должно быть статистически достоверно.

Правильность методики количественного определения декспантенола определялась на в трех лабораторных образцах концентрациях, которые входят в диапазон применения методики: 45,00 мг /г, 50,00 мг /г, 55,00 мг /г (90 %; 100 % и 110 % от номинального содержания) с использованием 6 воспроизведений для каждой его концентрации. Модельные образцы содержали точно известное количество декспантенола.

Результаты испытаний проверялись на однородность выборки, из выборки исключались данные, отягощённые грубыми ошибками. Подтверждение правильности полученных данных осуществлялось путем вычисления смещения $|x_{cp} - \mu|$ и проверки значимости отличия случайной величины X_{cp} от константы μ (принятого эталонного значения).

В результате проведённых исследований была обоснована методика количественного определения декспантенола в ЛФ. Для этого 2,000 г (точная навеска) испытуемой гели помещают в мерную колбу ёмкостью 100 мл, приливают 60,0 мл воды, интенсивно перемешивая в течение 20 мин в горячей ультразвуковой бане (примерно 70° С) до растворения гели. Полученную смесь, постоянно встряхивая, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора этим же растворителем до метки. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу емкостью 25,0 мл и доводят объем водой, перемешивают. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Для приготовления раствора СО точную навеску (0,100 г) декспантенола растворяют в 50 мл воды очищенной в мерной колбе емкостью 100 мл путем взбалтывания до полного его растворения, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают. 5,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу емкостью 25,0 мл и разбавляют до метки смесью воды для хроматографии. Полученный раствор не фильтруют.

На основании анализа литературных данных и результатов проведенных исследований были определены следующие оптимальные условия процесса хроматографирования декспантенола: хроматографическая колонка Eclipse XDB C18 размером (150cm x 4,6mm), заполненная силикагелем цианосилильным для хроматографии Р с размером частиц 5µm (например, колонка «Waters Spherisorb CNRP» или аналогичная, температура колонки – 40 °С; подвижная фаза А:



раствор натрия фосфата одноосновного с концентрацией 1,38 г/л, доведенный до значения pH (2,2±0,1) кислотой фосфорной; подвижная фаза В: ацетонитрил для хроматографии; изократическое элюирование с соотношением подвижной фазы А и подвижной фазы В (75:25) об/об;

скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин; детектор спектрофотометрический: длина волны регистрации – 210 нм; объем вводимой пробы – 20,0 мкл. Результаты представлены на рисунках 1 и 2.

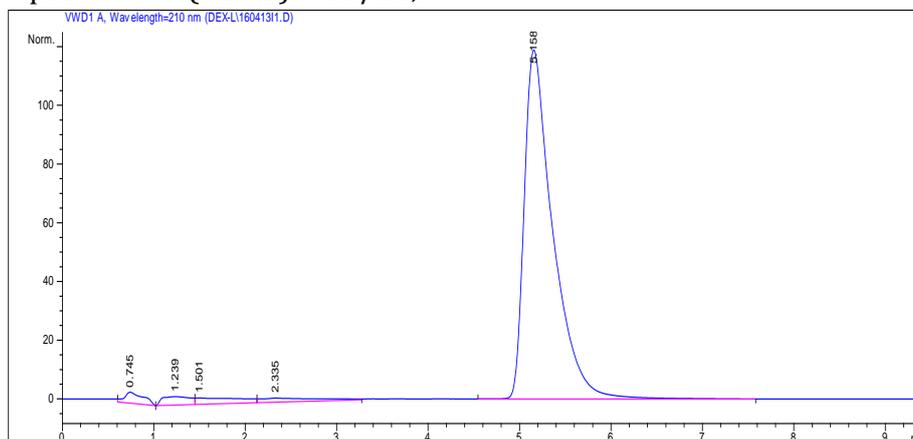


Рис. 1. Типичная хроматограмма раствора РСО декспантенола в выбранных условиях

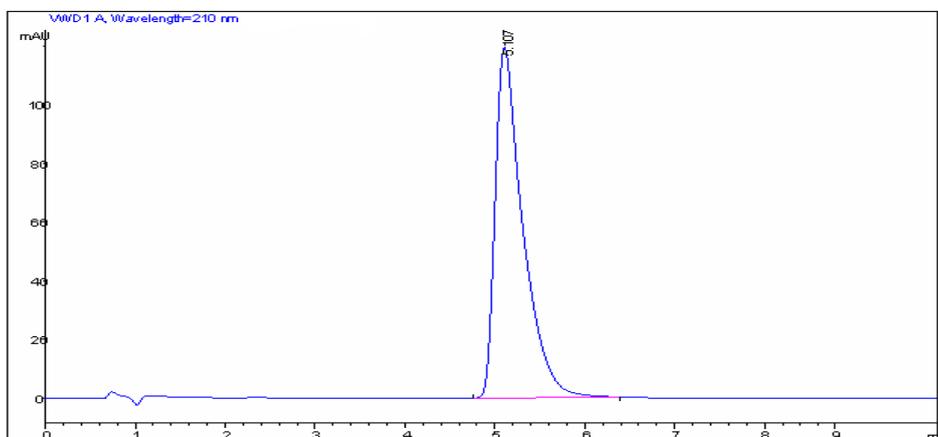


Рис. 2. Типичная хроматограмма испытуемого раствора гели при выбранных условиях. Из хроматограмм СО и испытуемого раствора, представленных на рисунках 1 и 2 видно, что пики со временем удерживания 5,1 мин соответствует декспантенолу. Разрешение между пиками составило 3,42, что более регламентируемого значения 1,5. Относительное стандартное отклонение, рассчитанное по временам выхода пиков по результатам

шестикратного повторения анализа, составило 0,939 %. Эффективность хроматографической колонки оценивали по количеству теоретических тарелок и фактора асимметрии пиков.

Количественное определение декспантенола проводили путём сравнения площадей пиков декспантенола на хроматограмме СО





декспантенола (рисунок 1) с соответствующим пиком на хроматограмме испытуемого раствора (рисунок 2).

При расчёте количественного содержания декспантенола в гели учитывали также массу навесок испытуемого образца, массу взятого для анализа РСО и процентное содержание декспантенола в РСО, в пересчёте на безводное вещество.

Количественное содержание декспантенола (X, мг) рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 25 \cdot P \cdot b}{S_0 \cdot 100 \cdot 50 \cdot m_1 \cdot 5 \cdot 100}$$

где: S – среднее значение площади пика декспантенола на хроматограмме испытуемого раствора;

S- среднее значение площади пика стандартного раствора декспантенола;

m- масса навески СО декспантенола, мг;

m- масса навески испытуемого образца, мг;

P- фактическое содержание декспантенола в СО, в %

b- средняя масса гели, мг.

Результаты количественного определения декспантенола и метрологические характеристики разработанной методики приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Метрологические характеристики методик количественного определения декспантенола при F= 4, t (P, f)=2,78, P=95 %

X _{ср} , %	S ²	S	Δ x	ε, %
5,1				

Как видно из таблицы 1 содержание декспантенола в гели составляет 5,1±0,04 %. Относительная ошибка единичного определения декспантенола в ЛФ составляет 2,66%. По разработанной методике проведен количественный анализ декспантенола в 5 сериях гели. Результаты анализа представлены в таблице 2.

Надежность методики ВЭЖХ оценивали путем внесения изменений в рН буфера (± 0,1), состав наименее подвижной фазы (± 10%), скорость потока (± 0,1 мл / мин), температуру в печи (± 2 °), длину волны (± 2 нм) и столбик другой партии стационарной фазы.

Результаты исследования специфичности методики показали, что при выбранных условиях проведения испытания ни используемый растворитель, ни подвижная фаза, ни компоненты плацебо не искажают результатов количественного определения декспантенола,

Специфичность методики определяли путем сравнения площади и времени удерживания пиков водного раствора 5 % геля декспантенола, полученного по предложенной методике количественного определения, и раствора СО декспантенола (рис.1 и 2.).

Линейность методики проводилась на пяти уровнях концентрации СО декспантенола от 80 до 120 % от теоретического содержания декспантенола в гели. Экспериментальные данные обрабатывали методом наименьших квадратов, составляли уравнение регрессии. Критерием приемлемости линейности является коэффициент



корреляции (r) который должен быть не менее 0,99. При условии, что его значение близко к единице, то совокупность анализируемых данных можно описать прямой линией.

Аналитическую область методики определяли по интервалу

экспериментальных данных полученных и удовлетворяющих линейную модель. Результаты проведенных испытаний представлены в таблице 1

Таблица 2.

Результаты изучения линейной зависимости методики

Содержание СО декспантенола в % от нормируемого	Концентрация СО декспантенола, мг/мл (в измеряемом растворе)	Аналитический сигнал (площадь пиков)	Коэффициент корреляции
80	40,6	2238,478	0,9999
90	45,6	2514,153	
100	50,2	2754,727	
110	55,3	3034,589	
120	60,5	3319,939	
b=054,217; a=-37,649			

Прецизионность методики характеризуется сходимостью, внутрилабораторной и межлабораторной воспроизводимостью и является величиной стандартного отклонения (RSD), которого должно быть не более 15 %.

Для определения сходимости испытание проводили в разные дни с одним и тем же специалистом на одном образце гели в 6 повторностях (таблица 3) в одинаковых условиях.

Таблица 3.

Результаты определения сходимости методики

Истинное значение определяемой величины 5%					
образец	Результаты Определений	Стандартное отклонение SD	Относительное стандартное отклонение RSD %	Коэффициент вариация sb	Критерий стьюдента таб.
1-день					
1	0,0513	0,00096	1,92	3,92	2,57
2	0,0510	0,00096	1,92	3,92	2,57



3	0,0498	0,00096	1,92	3,92	2,57
4	0,0489	0,00096	1,92	3,92	2,57
5	0,0500	0,00096	1,92	3,92	2,57
6	0,0513	0,00096	1,92	3,92	2,57
2-день					
1	0,0499	0,00063	1,42	2,57	2,57
2	0,0500	0,00063	1,42	2,57	2,57
3	0,0520	0,00063	1,42	2,57	2,57
4	0,0509	0,00063	1,42	2,57	2,57
5	0,0500	0,00063	1,42	2,57	2,57
6	0,0514	0,00063	1,42	2,57	2,57

Установлена сходимость методики испытания количественного определения декспантенола. Относительное стандартное отклонение (RSD, %), рассчитанное для содержания декспантенола и полученное в условиях повторяемости, не превышало 2,0 % и составило 0,348 %.

Подтверждена внутрилабораторная сходимость методики испытания количественного определения декспантенола. Коэффициент Фишера $F(P, f_1, f_2)$ не превышает табличной величины $F_{табл}(0,95; 5; 5)$. Результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4.

Внутрилабораторная и межлабораторная воспроизводимость методики количественного определения декспантенола

Образец №	1-лаборатория		2-лаборатория
	1-аналитик	2-аналитик	
	Содержание декспантенола, г		
1	0,0513	0,0499	0,0513
2	0,0510	0,0500	0,0510
3	0,0498	0,0520	0,0498
4	0,0489	0,0509	0,0489
5	0,0500	0,0500	0,0500
6	0,0513	0,0514	0,0513
Статистические характеристики			
Внутрилабораторная прецизионность			межлабораторная прецизионность
\bar{x}	0,050	0,0507	0,0504
S	0,00096	0,00063	0,00097
S ²	0,0000009	0,0000004	0,00000095
RSD,%	1,92	1,42	1,92
Интервал варьирования $\Delta\bar{x}$	0,001	0,00066	0,00102

Относительного стандартного отклонения, %	0,78	0,507	0,79
---	------	-------	------

Правильность методики определения количественного содержания декспантенола подтверждена соответствующими испытаниями на модельных образцах для трех концентраций. Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания декспантенола в гели с добавлением СО декспантенола из расчета 80, 100, 120 % от содержания в ЛФ. Относительная ошибка в опытах с добавками не превышает относительной ошибки

среднего результата, что свидетельствует о правильности методики и об отсутствии систематической ошибки. Полученные результаты определения не отягощены систематической ошибкой. Средний процент восстановления для 9 измерений составил 99,37 % для декспантенола. Результаты исследования по определению правильности представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Правильность количественного определения декспантенола в 5% гели

№ определения	Содержание декспантенола, мг/г	Добавлено СО декспантенола, мг	Ожидаемая величина, мг/г	Экспериментально найденное значение	
				Полученное содержание, мг/г	Процент восстановления, %
1	50	25	74	73,0	98,64
2				73,5	99,32
3				73,7	99,59
1	51	50	101	100,0	99,0
2				101,0	100,0
3				100,0	99,0
1	52	75	127	126,0	99,21
2				127,0	100,0
3				126,5	99,61

Установлен показатель количественного определения декспантенола, который включен в нормативные документы на гель- не менее 5,0 %.

Таким образом, предложенный спектрофотометрический метод определения декспантенола в гели

соответствует по следующим показателям валидации: правильность, прецизионность, специфичность и линейность и включен

Выводы

На основании результатов исследований подобраны наиболее приемлемые условия пробоподготовки



гели дексапатенола и условия его анализа.

Разработана унифицированная ВЭЖХ методика, позволяющая идентифицировать и количественно определять декспантенол в его ЛФ.

Подобраны оптимальные условия хроматографирования, позволяющие элюировать определяемое вещество за короткий промежуток времени и обеспечивать экспресность анализа (время хроматографирования составляет ~5 мин).

Проведена валидация разработанной методики количественного определения в соответствии с установленными требованиями и доказана её специфичность, линейность в диапазоне применения, правильность и прецизионность. Полученные результаты подтверждают гарантию получения ожидаемых и воспроизводимых результатов, была проведена валидация

Использованная литература:

1. Fluorimetric determination of pantothenic acid in foods by liquid chromatography with post-column derivatization / С. Pakin [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2004. – Vol. 1035 (1). – P. 87–95.
2. Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method / S. Vidovića [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2008. – Vol. 1202 (2). – P. 155–162.
3. Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatography method for determination of dexpanthenol in pharmaceutical formulations / A. Kulikov [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2007. – Vol. 43 (3). – P. 983–988.
4. Stability indicating HPLC method for simultaneous determination of dexamethasone sodium phosphate and chloramphenicol in bulk and formulations/ K. Prakash [et al.] // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2012 – Vol.4. – P. 505–5010.
5. ICH harmonised tripartite Guideline // Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. – 1994–1996. – P. 13.
6. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации: в III частях / Н.В. Юргель [и др.]; под общ. ред. Н.В. Юргель. – М., 2007–. – Часть I: Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. - 192 с.
7. Квалификация и валидация в свете требований GMP // Фармацевтическая отрасль. Промышленное обозрение. – 2008. – № 3 (8). – С. 14-17.

