



УДК 615.4:545

## ВАЛИДАЦИОННАЯ ОЦЕНКА ВЭЖХ-МЕТОДИКИ АНАЛИЗА СОСТАВА ДЛЯ ТЕРАПИИ ОЖОГОВ ПИЩЕВОДА В ФАЗУ РЕГЕНЕРАЦИИ

**В.М. ВОРОБЬЕВА**  
**Л.Е. КУДРИКОВА**

*Алтайский государственный  
медицинский университет,  
г. Барнаул*

*e-mail: vmv@agmu.ru*

В статье изложены экспериментальные данные валидации ВЭЖХ-методики качественного и количественного анализа метилурацила и метронидазола, входящих в состав № 2 для местной терапии ожогов пищевода. Установлены параметры пригодности хроматографической системы, специфичности, линейности, правильности и прецизионности разработанной методики.

Ключевые слова: состав для терапии ожогов пищевода, ВЭЖХ, количественное определение, валидация.

**Введение.** Химические ожоги пищевода вследствие отравления химическими веществами кислотной или щелочной природы с последующим стенозированием представляют сложную проблему хирургии. Проведение неотложных мероприятий должно быть продолжено комплексным лечением, способствующим быстрому заживлению ожоговой поверхности и профилактике развития рубцовых деформаций [1, 4]. Сотрудниками кафедр фармацевтической технологии и детской хирургии АГМУ предложены составы для местной терапии химических ожогов пищевода с учетом этапности развития патологического процесса. Состав № 1, обладающий противовоспалительным и местноанестезирующим действием, предназначен для применения в фазу воспаления. Состав № 2 оказывает регенерирующий и антипролиферативный эффекты для уменьшения образования грубой соединительной ткани и профилактики развития рубцовых деформаций во время второй и третьей фаз ожогового процесса. Оба состава обладают антимикробной активностью для профилактики наложения вторичной инфекции [3]. Состав № 2 представляет собой суспензию, стабилизированную полимером регенкур, и содержит метилурацила 2,0; метронидазола 0,75; гиалуронидазы 128 ЕД; регенкура 4,0; ароматизатора, идентичного натуральному 0,5; натрия сахарината 0,24; воды очищенной до 100,0.

При подготовке нормативной документации была разработана методика анализа лекарственных веществ, входящих в состав регенерирующего действия, методом ВЭЖХ. Согласно современным рекомендациям ИСН и ведущих фармакопей [7, 8, 9] методика количественного определения должна быть валидирована по основным характеристикам, таким как специфичность (specificity), линейность (linearity), правильность, или истинность (accuracy, or trueness), прецизионность (precision) [2,5,6].

**Цель настоящей работы** – изучение комплекса валидационных характеристик разработанной методики.

**Методика эксперимента.** Исследования проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе *МилиХром А-02* (ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова», г.Новосибирск), с УФ-детектором, колонкой 2 × 7,5 мм и сорбентом ProntoSIL-120-5-S18 (размер частиц 5 мкм), результаты исследования обрабатывали с использованием программы «МультиХром» для «Windows».

При подготовке пробы к анализу учитывали тот факт, что метронидазол и метилурацил в результате иммобилизации в матрице полимера регенкур неполно высвобождаются из лекарственной формы и, в связи с этим, данные количественного определения получаются заниженными. Для обеспечения выхода лекарственных веществ из полимерной матрицы добавляли раствор натрия хлорида 10%, который, взаимодействуя с карбоксильной группой полимера, способствовал вытеснению анализируемых ингредиентов.

**Методика.** Точную навеску анализируемого состава массой 0,5 г помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли 2,5 мл раствора натрия хлорида 10% и смесь, состоящую из 2,5 мл ацетонитрила и 2,5 мл раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ) 1%, взбалтывали в течение 15 минут, доводили объем до метки водой очищенной, тщательно перемешивали, фильтровали через бумажный фильтр. Полученный фильтрат исследовали методом ВЭЖХ.

В качестве элюента А использовали раствор ТФУ 0,1%, в качестве элюента Б – ацетонитрил и водный раствор ТФУ 1% в соотношении (9:1), градиент от 2 до 40 % элюента Б за 10 мин., при скорости потока подвижной фазы 100 мкл/мин. и температуре колонки 35 градусов, объем пробы 2 мкл. Детектирование проводили в УФ-области при длинах волн 240, 260, 270 и 300 нм. Расчет количественного содержания вещества в пробе проводили по калибровочному графику. Площадь пика на хроматограмме измеряли при длине волны 270 нм.

Количественное содержание определяемых веществ (X) в г/100 г в анализируемом составе вычисли по формуле:

$$X = \frac{P \cdot V \cdot \rho}{m} \cdot 10^{-3},$$

где P – содержание исследуемого вещества в хроматографической пробе, в мг/100г; V – вместимость мерной колбы, используемой для приготовления испытуемого раствора, в мл; ρ – плотность анализируемого состава, 1,06 г/мл; m – масса навески препарата, в граммах, 10<sup>-3</sup> – пересчет миллиграммов на граммы.

**Обсуждение результатов.** Хроматографирование анализируемой пробы при выбранных условиях (рис. 1) показало, что пики определяемых веществ хорошо разделены между собой и не накладываются на пики примесей из растворителя, на пики вспомогательных веществ и основы лекарственной формы (плацебо).

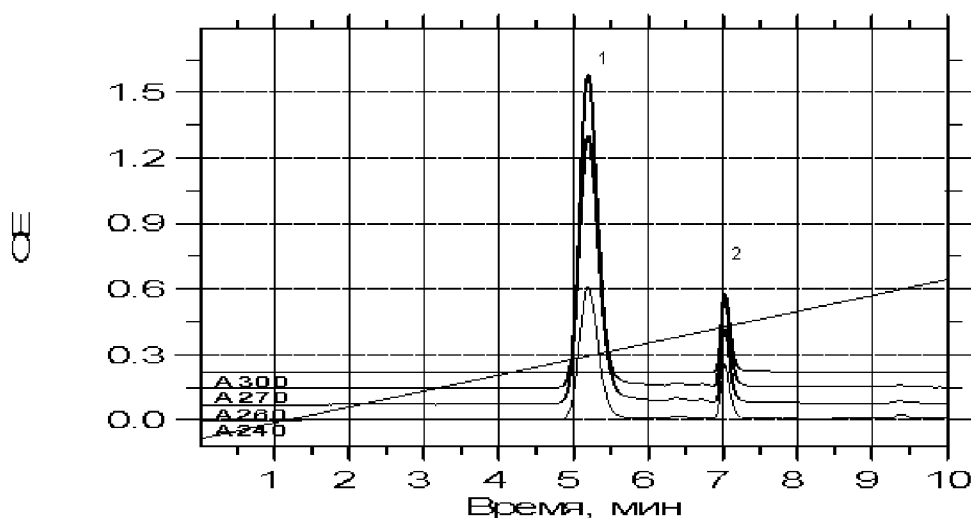


Рис. 1. Хроматограмма фильтрата состава № 2 (1-метилурацил, 2-метронидазол)

Время удерживания анализируемых веществ лекарственной формы (метилурацила – 5,2 мин., метронидазола – 7,1 мин.) совпадает с временем удерживания соответствующих стандартов в пределах допустимой ошибки (±2%).

**Пригодность хроматографической системы** характеризовалась несколькими параметрами: сходимость инъекций (n=6), эффеkтивность колонки (N≥2000) 2115т.т. для метилурацила и 1390вт.т. для метронидазола, коэффициенты асимметрии пиков (T≤2,0) для метилурацила - 1,26, для метронидазола – 1,51, коэффициент разделения пиков (Rs>2,0) для метилурацила не менее 6, для метронидазола не менее 4,5, величина относительного стандартного отклонения площади пика (RSD≤2,0%) для метилурацила 0,62%, для метронидазола 0,65%. Данные проверки сходимости инъекций, которые оценивали по воспроизводимости площадей пиков метилурацила и метрони-



дазола (n=6), представлены в табл. 1. Полученные результаты позволяют оценить пригодность хроматографической системы по основным показателям.

Таблица 1

**Оценка пригодности хроматографической системы  
по воспроизводимости площадей пиков**

№ п/п	Метилурацил	Метронидазол
1	43,083	8,010
2	42,970	7,995
3	43,242	8,101
4	42,557	7,970
5	43,288	8,084
6	42,921	8,018
Scp	43,010	8,030
SD	0,265	0,052
RSD ≤ 2,0 %	0,62	0,65

**Определение линейности и диапазона применения** проводили на 5 уровнях концентрации, для чего готовили растворы стандартных веществ в концентрациях 50, 80, 100, 120 и 150% от номинального значения. Измеряли аналитический сигнал (площадь пика) для проб с различными концентрациями определяемых веществ. Зависимости площадей пиков метилурацила и метронидазола от их содержания в пробе представлены на рис. 2 и 3 соответственно.

Зависимость величины аналитического сигнала (отклика) от количества определяемого вещества в пробе в диапазоне концентраций от 50 до 150% от номинального значения выражается уравнением регрессии для метилурацила  $Y=1,0468 \cdot X+0,98644$  с коэффициентом корреляции 0,9991, для метронидазола  $Y=0,53268 \cdot X+0,043103$  с коэффициентом корреляции 0,9999. Линейность зависимости площади пика от содержания анализируемых веществ (рис. 2, 3), воспроизводимость и точность результатов определения, а также значение коэффициента корреляции более 0,999 свидетельствуют о том, что интервал от 20 до 60 мг/100г для метилурацила и от 7,5 до 22 мг/100 г для метронидазола можно определить как аналитическую область методики.

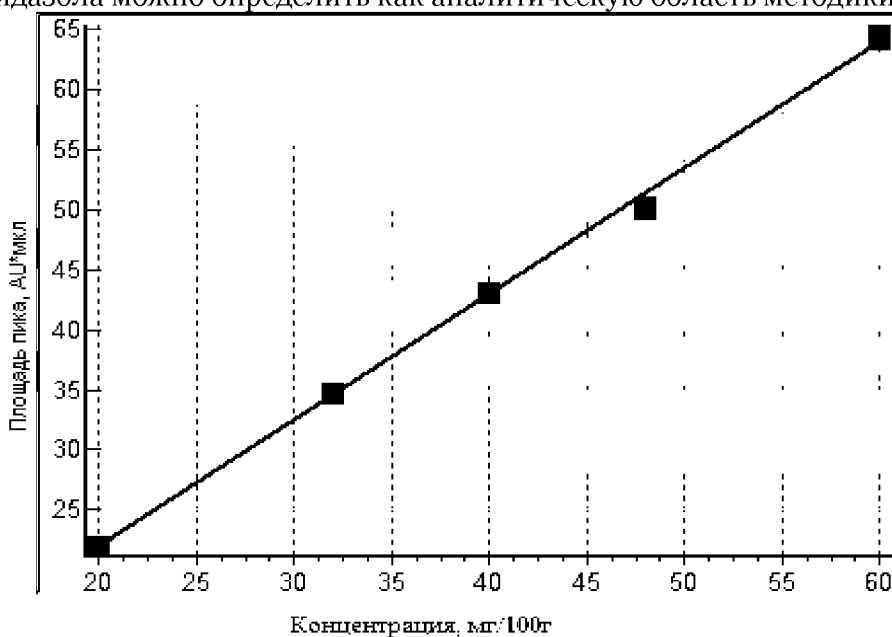


Рис. 2. Калибровочная кривая зависимости площади пика метилурацила от его содержания в пробе

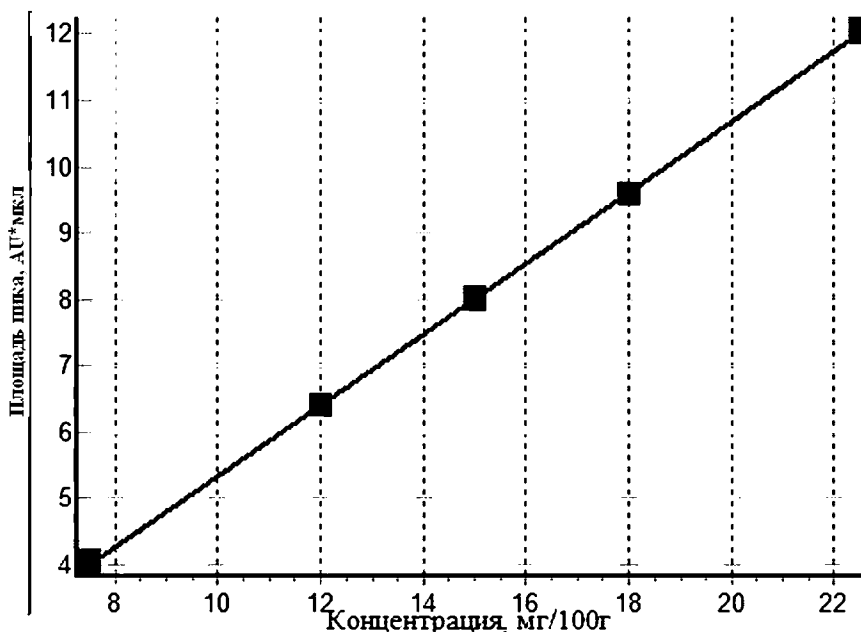


Рис. 3. Калибровочная кривая зависимости площади пика метронидазола от его содержания в пробе

**Правильность** методики устанавливали путем анализа лекарственных форм с содержанием действующих веществ 80-120% от номинального с последующим определением значения коэффициента R (открываемость), средняя величина которого должна принадлежать интервалу  $100 \pm 2\%$ .

Таблица 1

**Оценка правильности методики количественного определения метилурацила**

Ожидаемое содержание в пробе, мг/100 г	Полученное содержание в пробе, мг/100 г	Открываемость, %
1,697	1,716	101,12
1,710	1,681	98,31
1,719	1,734	101,08
2,177	2,15	99,07
2,187	2,147	98,17
2,165	2,163	99,93
2,564	2,546	99,28
2,563	2,555	99,67
2,570	2,538	98,74
Среднее значение, % -		99,49%

Таблица 2

**Оценка правильности методики количественного определения метронидазола**

Ожидаемое содержание в пробе, мг	Полученное содержание в пробе, мг	Открываемость, %
0,644	0,656	101,86
0,639	0,631	98,75
0,648	0,639	98,61
0,803	0,790	98,38
0,808	0,807	99,88
0,800	0,804	100,50
0,959	0,954	99,47
0,975	0,972	99,69
0,961	0,954	99,27
Среднее значение, % -		99,60%



Из данных табл. 2 и 3 видно, что в разработанной методике процент восстановления при определении метилурацила находился в пределах от 98,17 до 101,12%, при определении метронидазола от 98,38 до 101,86%. Среднее значение отклика для каждого из анализируемых веществ не превышает рекомендуемых значений.

**Прецизионность** методики оценивали путем воспроизведения методики на одной серии препарата в 6 повторностях, с последующим определением относительно стандартного отклонения (табл. 3).

Таблица 3

#### Оценка прецизионности разработанной методики

Повторность	Определенное содержание в пробе, мг /100 г	
	Метилурацил	Метронидазол
1	41,559	15,160
2	41,045	15,000
3	41,224	15,090
4	41,021	15,170
5	40,497	15,215
6	40,602	15,399
Среднее значение ( $\bar{X}_{ср} \pm \Delta \bar{X}_{ср}$ )	40,99 ± 0,413	15,17 ± 0,140
S	0,394	0,134
E, %	1,0	0,927
RSD ≤ 2,0%	0,96	0,88

Из данных, представленных в табл. 3, видно, что относительное стандартное отклонение не превышает 2,0%, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Обобщенные валидационные характеристики методики представлены в табл. 4.

Таблица 4

#### Валидационные характеристики ВЭЖХ-методики

Характеристики	Критерий приемлемости	Результаты испытаний	
		Метилурацил	Метронидазол
Пригодность хроматографической системы:			
Сходимость инъекций	$RSD \leq 2,0\%$	0,62	0,65
Эффективность колонки	$N$ не менее 2000 т.т.	2115	13906
Коэффициент асимметрии	не более 2	1,26	1,51
Критерий разделения пиков	$R_s \geq 1,5$	6,01	4,61
Линейность	$r \geq 0,9990$	0,9991	0,9999
Правильность	$R \pm \Delta R = 100 \pm 2\%$	99,49 ± 0,85%	99,60 ± 0,85%
Прецизионность	$RSD = \pm 2\%$	0,96	0,88

В результате проведенных исследований установлено, что ВЭЖХ-методика определения метилурацила и метронидазола в составе регенерирующего действия доступна, занимает минимум рабочего времени, не требует дорогостоящих реактивов и позволяет объективно оценить качество многокомпонентной лекарственной формы. Полученные результаты включены в Методические рекомендации по изготовлению и контролю качества составов для местной терапии ожогов пищевода.

#### Заключение.

1. Проведена валидация методики качественного и количественного анализа метронидазола и метилурацила в составе № 2 для местного лечения ожогов пищевода в фазу регенерации методом ВЭЖХ.

2. Установлены параметры пригодности хроматографической системы, специфичности, линейности, правильности и прецизионности разработанной методики.



### Литература

1. Воробьева, В.М. Ранозаживляющее действие новых лекарственных составов, предназначенных для лечения ожогов пищевода, в эксперименте / В.М.Воробьева, Д.Г. Полухин, А.В. Лепилов, А.К.Смирнов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № 2. – С. 31-34.
2. ГОСТ ИСО 5725-3-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» [Электронный ресурс]. – М. : Госстандарт, 2002. – Режим доступа: <http://www.docload.ru>.
3. Патент № 2286781 Способ лечения химических ожогов пищевода у детей / В.А. Кожевников, В.М. Воробьева, А.К. Смирнов, В.Ф. Турецкова, Д.Г. Полухин (РФ), заявка 2003121575/14 от 11.07.2003 г., патент РФ №2286781, опубликовано 10.11.2006 г., Бюл. № 31. – 8 с.
4. Смирнов, А.К. Лечение и профилактика рубцовых стенозов пищевода и желудка после химических ожогов у детей : автореф. дис. ...д-ра мед.наук / А.К. Смирнов. – Барнаул, 2009. – 40 с.
5. Эпштейн, Н. А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе // Химико-фармацевтический журнал. –2004. – Т. 38, № 4. – С. 40-55.
6. Эпштейн, Н.А. О требованиях к пригодности хроматографической системы при контроле качества лекарственных субстанций и препаратов методом ВЭЖХ / Н.А. Эпштейн, С.В. Емшанова // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42, № 11. – С. 34-40.
7. European Pharmacopoeia, 7<sup>th</sup> ed. European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe. – Strasbourg, France, 2010.
8. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Q2A «Text on Validation of Analytical Procedures». – ICH, Geneva, 1995.
9. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Q2B «Validation of Analytical Procedures: Methodology». – ICH, Geneva, 1997.

## VALIDATION OF HPLC TECHNIQUE IN ASSAYING FORMULATIONS FOR ESOPHAGEAL BURN THERAPY IN REGENERATION PHASE

**V.M. VOROBYEVA**  
**L.E. KUDRIKOVA**

*Altai State  
Medical University,  
Barnaul*

*e-mail: vmv@agmu.ru*

The article presents experimental data validation of HPLC technique for qualitative and quantitative assaying of methyluracil and metronidazole, constituting the № 2 formulation for local therapy of esophageal burns has been conducted. Parameters of HPLC applicability and of specificity, linearity, correctness and precision of the technique have been determined.

Key words: formulations for esophageal burns therapy, HPLC, quantification, validation.