

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 615.453.6:615.03

DOI: <https://doi.org/10.52540/2074-9457.2021.2.80>В. Б. Климашевич¹, Е. В. Кокусев¹, В. В. Гудович¹, О. А. Казюциц², А. И. Жебентяев³

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИМЕСЕЙ В ТАБЛЕТКАХ «РАНОЛАЗИН-НАН»

¹Государственное предприятие «АКАДЕМФАРМ», г. Минск, Республика Беларусь²СООО «НАТИВИТА», г. Бешенковичи, Витебская область, Республика Беларусь³ Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь

В статье представлены результаты исследования по разработке методики определения сопутствующих примесей методом высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии в таблетках «Ранолазин-НАН». Подобраны условия пробоподготовки образцов таблеток ранолазина, оптимальные условия градиентного режима хроматографирования с использованием колонки Zorbax Eclipse Plus C18: элюент А – 0,1% буфер триэтиламина с рН $6,0 \pm 0,1$ (доведено ортофосфорной кислотой) и ацетонитрил в соотношении 70:30 об/об и элюент В – ацетонитрил. Установлено влияние рН среды (2,0; 6,0; 9,0) на эффективность колонки при исследовании испытуемых растворов ранолазина и идентифицируемых примесей. Доказана пригодность хроматографической системы, специфичность методики к неидентифицируемым и идентифицируемым примесям. Для методики определения сопутствующих примесей в таблетках «Ранолазин-НАН» была подтверждена линейность на всем диапазоне применения методики (от предела количественного определения до 125% (от содержания единичной примеси)), правильность, а также прецизионность на уровне сходимости и внутрилабораторной прецизионности, устойчивость (робастность) методики при небольших изменениях скорости потока и температуры колонки.

Ключевые слова: ранолазин, высокоэффективная хроматография, валидация, пригодность хроматографической системы, специфичность, критерий приемлемости, условия хроматографирования.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема эффективного лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы выходит на первый план, особенно в контексте пандемии Covid-19. Согласно официальной статистике, за первые три месяца 2020 года среди причин смерти в Республике Беларусь лидирующее место занимала ишемическая болезнь сердца [1].

Эффективным антиишемическим и антиангинальным действием с точки зрения доказательной медицины обладает ранолазин. Согласно рекомендациям Европейского общества кардиологов (ESC) 2019 года, ранолазин используют в качестве препарата 2-й линии с классом рекомендаций IIa, как препарат 1-й линии в комбинации с бета-блокатором или блокатором кальциевых каналов (IIb класс ре-

комендаций), с уровнем доказательности рекомендаций – В, а также для лечения пациентов с низкой частотой сердечных сокращений и низким артериальным давлением в качестве терапии первой линии (IIb класс рекомендаций) с уровнем доказательности С [2–4].

Отечественный генерический лекарственный препарат, содержащий ранолазин, – «Ранолазин-НАН» – разработан в рамках Государственной программы по развитию импортозамещающих производств фармацевтических субстанций, готовых лекарственных и диагностических средств в Республике Беларусь (ГП «Импортозамещающая фармпродукция»), производится государственным предприятием «АКАДЕМФАРМ».

В литературных источниках для количественного определения примесей в суб-

станции ранолазина и таблетках описано использование следующих составов подвижных фаз: ацетонитрил – фосфатный буфер с pH 7,3 в соотношении 10:90 об/об и 55:45 об/об (колонка Acuity UPLC BEN RP-18 размером 100x2,1 мм, 1,7 мкм) [5], ацетонитрил – 0,02 М фосфатный раствор с pH 4,5 в соотношении 10:90 об/об (колонка ВЭЖХ Inertsil ODS C18 размером 150x4,6, 3 мкм) [6], метанол – фосфатный буфер pH 7,0 в соотношении 35:65 об/об (колонка ВЭЖХ Supelcosil C 18 размером 250x4,6 мм, 5 мкм) [7].

Методика определения примесей в субстанции ранолазина не подходит для определения примесей ранолазина в таблетках «Ранолазин-НАН» из-за меньшей специфичности по отношению к плацебо в результате мешающего действия вспомогательных компонентов, в особенности матрицеобразующих (гидроксипропилметилцеллюлозы и сополимера метакриловой кислоты и этилакрилата).

Рассмотренные выше методики ВЭЖХ определения примесей в таблетках ранолазина с использованием обращенно-фазовой стационарной фазы C18 обладают продолжительной пробоподготовкой – более 45 минут [6] и общей продолжительностью анализа 60–70 минут [7].

Целью настоящего исследования является разработка и валидация методики количественного определения сопутствующих примесей в таблетках «Ранолазин-НАН».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Стандартный образец ранолазина (Unichem, Индия), фармацевтическая субстанция ранолазина (Unichem, Индия), стандартные образцы примесей: примесь А, USP RS; примесь В, USP RS; примесь С, USP RS; примесь D, USP RS, ацетонитрил для хроматографии Р, триэтиламин Р, образцы таблеток лекарственного средства пролонгированного действия «Ранолазин-НАН», 500 мг.

Оборудование. Лабораторная центрифуга Biofuge primo, весы электронные Radwag AS 220/C/2/N, термошейкер для микропробирок Biosan T-100, хроматограф жидкостный Agilent 1260, оснащенный DAD-детектором с программным обеспечением Agilent Chemstation, pH-метр Thermo Scientific Orion Star A 111.

Испытуемый раствор. 700,0 мг порошка тщательно растертых в агатовой ступке десяти таблеток растворяли в 50 мл подвижной фазы А, тщательно перемешивали, обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин и перемешивали в течение 10 мин, довели до объема 100,0 мл этим же растворителем. Полученный раствор центрифугировали в течение 10 мин (5000 об/мин), 10,0 мл надосадочной жидкости довели до 25,0 мл подвижной фазой А и отфильтровывали через мембранный фильтр с размером пор не более 0,45 мкм.

Раствор сравнения. 50,0 мг ранолазина растворяли в 30 мл подвижной фазы А и довели этим же растворителем до 50,0 мл. 1,0 мл полученного раствора довели этим же растворителем до 50,0 мл, 1,0 мл полученного раствора довели этим же растворителем до 10,0 мл.

Раствор плацебо. 200,0 мг растертого плацебо растворяли в 50 мл подвижной фазы А, тщательно перемешивали, обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин и перемешивали в течение 10 мин, довели до объема 100,0 мл этим же растворителем. Полученный раствор центрифугировали в течение 10 мин (5000 об/мин), 10,0 мл надосадочной жидкости довели до 25,0 мл подвижной фазой А и фильтровали через мембранный фильтр с размером пор не более 0,45 мкм.

Раствор модификатора. К 900 мл воды Р добавляли 1,0 мл триэтиламина Р, pH полученного раствора довели до значения $6,0 \pm 0,1$ с помощью кислоты фосфорной Р, объем полученного раствора довели водой Р до 1000,0 мл.

По 20 мкл раствора плацебо, раствора сравнения и испытуемого раствора попеременно хроматографировали на жидкостном хроматографе со спектрофотометрическим детектором.

Условия хроматографирования. Колонка Zorbax Eclipse Plus C18, длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р с размером частиц 5 мкм; подвижная фаза А: раствор триэтиламина – ацетонитрил для хроматографии Р (70:30 об/об); подвижная фаза В: ацетонитрил для хроматографии Р; скорость подвижной фазы: 1,0 мл/мин; длина волны детектора: 225 нм; объем вводимой пробы: 20 мкл; температура колонки: 25 °С; время интегрирования: 50 мин.

Содержание любой примеси (идентифицируемой и неидентифицируемой) согласно проекту USP должно быть не более 0,10%; суммарное содержание примесей должно быть не более 1,00%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики. В ходе разработки пробоподготовки испытуемого раствора с учетом свойств вспомогательных веществ в составе таблеток «Ранолазин-НАН» были изучены следующие условия: время обработки ультразвуком (5, 10 и 15 мин), время перемешивания (5 и 10 мин), скорость центрифугирования испытуемого раствора порошка таблеток ранолазина (1000 об/мин, 2500 об/мин и 5000 об/мин), время центрифугирования (5 и 10 мин). Контроль вели визуально по однородности раствора во время воздействия ультразвуком и перемешивания и по прозрачности надосадочной жидкости во время центрифугирования. В результате пробоподготовки определены оптимальные условия, при которых происходит наиболее полное растворение ранолазина и примесей и осаждение мешающих вспомогательных компонентов. При обработке ультразвуком в течение 15 мин и перемешивании в течение 10 мин была достигнута достаточная однородность раствора. При центрифугировании в течение 10 мин и скорости вращения центрифуги 5000 об/мин наблюдали наиболее чистую надосадочную жидкость.

К особенностям структуры ранолазина следует отнести наличие азотсодержащего гетероцикла и ароматических колец, обеспечивающих гидрофобные взаимодействия, а также для ранолазина характерно положительное значение логарифма коэффициента распределения в двухфазной системе *n*-октанол–вода $\log P$ (2,83), что тоже свидетельствует о склонности к гидрофобным взаимодействиям [8]. Это явилось основанием для выбора в качестве стационарной фазы хроматографической колонки Zorbax Eclipse Plus C18 с обращенной фазой.

Так как ранолазин и его примеси содержат похожие функциональные группы (амидные, гидроксильные) и другие структурные элементы (ароматические кольца и кольцо производного пиперазина, метоксифеноксильные фрагменты), это позволило экспериментально подобрать условия

градиентного режима. В качестве элюента А была применена смесь воды и ацетонитрила, являющихся полярными растворителями. Выбор ацетонитрила вместо метанола обусловлен его преимуществами в отношении растворимости ранолазина, пропускания в ближнем ультрафиолетовом диапазоне, меньшей полярностью согласно элюотропному ряду и меньшей токсичностью для оператора. В качестве динамического модификатора в воду добавлен триэтиламин, поскольку ранолазин и его примеси представляют (за исключением примеси А) собой азотсодержащие основания, которые могут взаимодействовать с примесями металлов в стационарной фазе C18 [8]. В качестве элюента В использовали ацетонитрил [9–11].

pH-зависимый характер растворимости ранолазина (растворимость ранолазина значительно ухудшается при возрастании значения pH), особенно ввиду оптимизации пробоподготовки, потребовал апробации использования растворов триэтиламина с различными диапазонами pH. Эксперимент планировали, ориентируясь на способ половинного деления. Такой метод позволяет оптимизировать число экспериментов. Предварительно установлено, что для обращенно-фазового адсорбента C18 неприемлемым является pH более 10, так как силикагель при таком значении pH начинает растворяться. Поэтому для эксперимента были выбраны крайние рабочие диапазоны pH колонки: 2 и 9. Согласно литературным данным, ранолазин обладает двумя константами кислотности: pK_a (Strongest Acidic) – 13,6 и pK_a (Strongest Basic) – 7,17, что характеризует ранолазин как слабое основание [8]. При разных значениях pH испытуемого раствора будет преобладать либо ионная, либо молекулярная форма ранолазина. Поэтому выбраны две крайние точки pH, а также среднее значение pH диапазона – 5,5, которое округлили до 6,0, чтобы быть ближе к равновесному значению pH 7, 17.

Значения pH, равные $2,0 \pm 0,1$, $6,0 \pm 0,1$ и $9,0 \pm 0,1$, получены подкислением испытуемых растворов с помощью фосфорной кислоты, при этом соотношения объемов ацетонитрила и буфера составили 50:50 об/об, 60:40 об/об и 70:30 об/об. Нами экспериментально установлено, что выбранная колонка обеспечивает наилучшее разделение пиков ранолазина и исследу-

емых примесей в системе, содержащей элюент А – 0,1% раствор триэтиламина с рН 6,0 и ацетонитрил в объемном соотношении 70:30 и элюент В – ацетонитрил. При использовании хроматографической системы с другими значениями рН колонка обладала меньшей эффективностью по отношению к исследуемым компонентам, кроме того, была нарушена симметрия пиков примесей ранолозина.

Нами были предприняты попытки оптимизации хроматографических условий с целью уменьшения времени анализа, однако сокращение времени градиента и состава подвижной фазы приводило к ухудшению разрешения между пиками неидентифицируемых примесей и пиком ранолозина.

В таблице 1 приведены идентифицируемые примеси ранолозина и их структура.

Таблица 1. – Идентифицируемые примеси ранолозина

Название примеси	Химическое название	Формула
Примесь А	2-[(2-метоксифенокси)метил]оксиран	
Примесь В	N-(2,6-диметилфенил)-2-[4-(2-гидрокси-3-феноксипропил)пиперазин-1-ил]ацетамид	
Примесь С	N-(2,6-диметилфенил)-2-(пиперазин-1-ил)ацетамид	
Примесь D	2,2-(пиперазин-1,4диил)бис[N-(2,6-диметилфенил)ацетамид]	
Ранолозин	(RS)-N-(2,6-диметилфенил)-2-[4-[2-гидрокси-3-(2-метоксифенокси)пропил]пиперазин-1-ил]ацетамид	

Из литературных источников известно, что примеси А и С, вероятно, являются остатками компонентов синтеза ранолозина основания по одному из описываемых в литературе способов [12].

Таким образом, разработанная методика определения сопутствующих примесей в таблетках «Ранолозин-НАН» позволила сократить время анализа до 50 мин, а время пробоподготовки – до 35 мин. На основании полученных результатов предложена более простая и экономичная хроматографическая система при меньшей концентрации триэтиламина с получением симметричных разделенных пиков ранолозина и идентифицируемых примесей.

Валидация методики. Методика определения содержания сопутствующих

примесей в таблетках «Ранолозин-НАН» валидирована по основным валидационным характеристикам: испытание пригодности хроматографической системы, специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость, внутрилабораторная прецизионность), диапазон применения, предел количественного определения, робастность [13, 14].

Испытание пригодности хроматографической системы. Критериями приемлемости для испытания пригодности хроматографической системы были следующие: относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика ранолозина не более 5,0%, эффективность колонки (по пику ранолозина) более 2000 теоретиче-

ских тарелок, коэффициент асимметрии для пика ранолазина на хроматограмме раствора сравнения должен находиться в промежутке 0,8–2,0. Результаты испытаний пригодности хроматографической систе-

мы приведены в таблице 2, а пример хроматограммы раствора сравнения ранолазина представлен на рисунке 1.

Пример хроматограммы раствора сравнения приведен на рисунке 1.

Таблица 2. – Результаты испытаний пригодности хроматографической системы

Средняя площадь пика ранолазина, mAU*s	RSD	Эффективность колонки (теоретические тарелки)	Коэффициент асимметрии
65,318	0,46%	Среднее: 40100	Среднее: 1,00

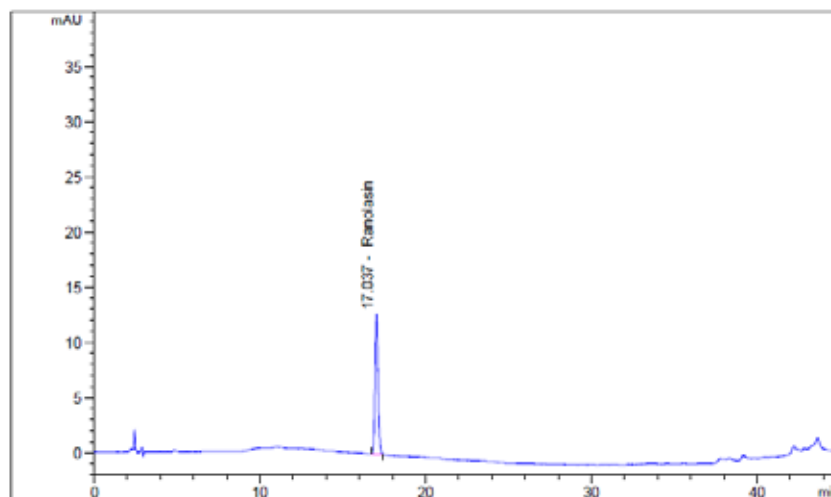


Рисунок 1. – Пример хроматограммы раствора сравнения ранолазина

Специфичность. На рисунке 2 представлена хроматограмма раствора плацебо, на которой нет пиков, совпадающих по времени удерживания с ранолазином и основными примесями, следовательно, специфичность к плацебо подтверждена.

В качестве стрессовых испытаний для определения специфичности к продуктам

разложения были выбраны следующие условия: воздействие 1 М раствором кислоты хлористоводородной, воздействие 1 М раствором натрия гидроксида; воздействие концентрированным раствором водорода пероксида; воздействие термостатирования при 100 °С. Образцы растворов ранолазина подвергали стрессовым испытаниям в течение 1 часа.

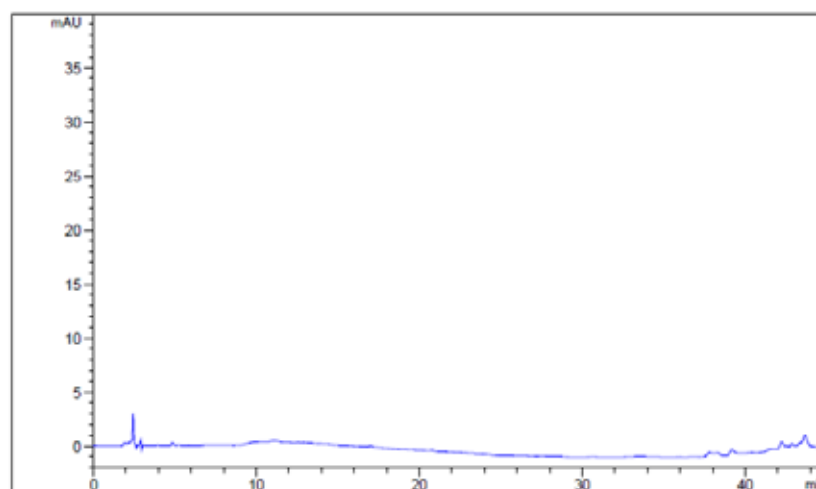


Рисунок 2. – Пример хроматограммы раствора плацебо

Доказательством специфичности методики определения неидентифицируемых примесей ранолазина является превышение спектральной чистоты основного пика при всех видах воздействия значения порога чистоты (Threshold) – 990 (согласно инструкции, на программное обеспечение «Agilent ChemStation»).

На хроматограммах раствора ранолазина после кислотного и щелочного гидролиза, термического воздействия и окисления (рисунки 3–6) минимальное разрешение между пиком ранолазина и соседним пиком более 1,5, что свидетельствует о

полном разделении пиков, а также соответствует разработанным нами критериям.

На хроматограмме основных идентифицируемых примесей и ранолазина (рисунок 7) минимальное разрешение между пиком ранолазина и соседними пиками более 2,0. Относительные времена удерживания идентифицированных примесей ранолазина (t_i -примеси/ t -ранолазина): А – 0,79, В – 1,16, С – 0,15, D – 1,37.

Установили, что данная методика испытания является специфичной по отношению к идентифицируемым и неидентифицируемым примесям ранолазина.

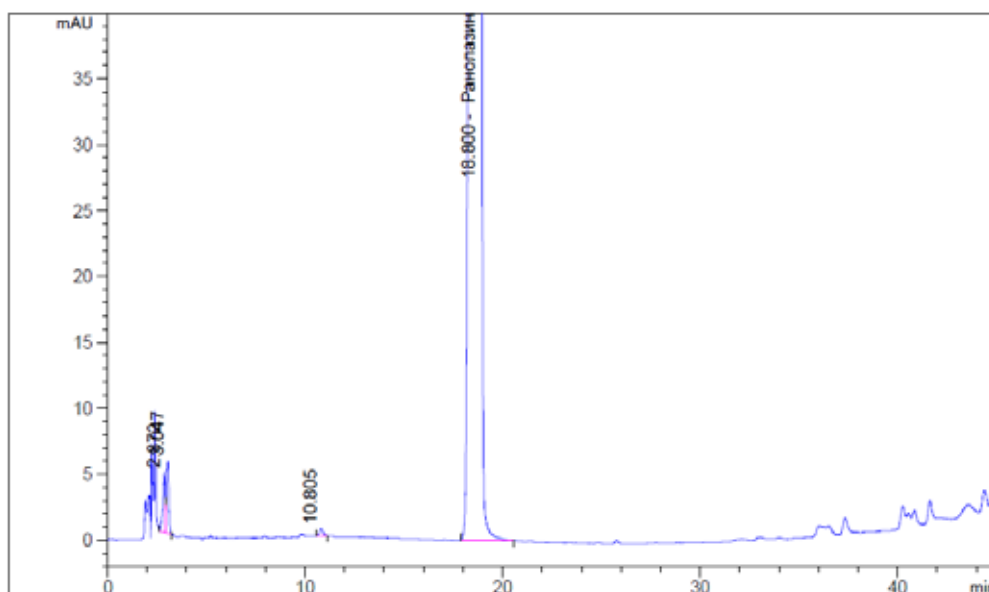


Рисунок 3. – Пример хроматограммы раствора продуктов кислотного гидролиза испытуемого раствора ранолазина

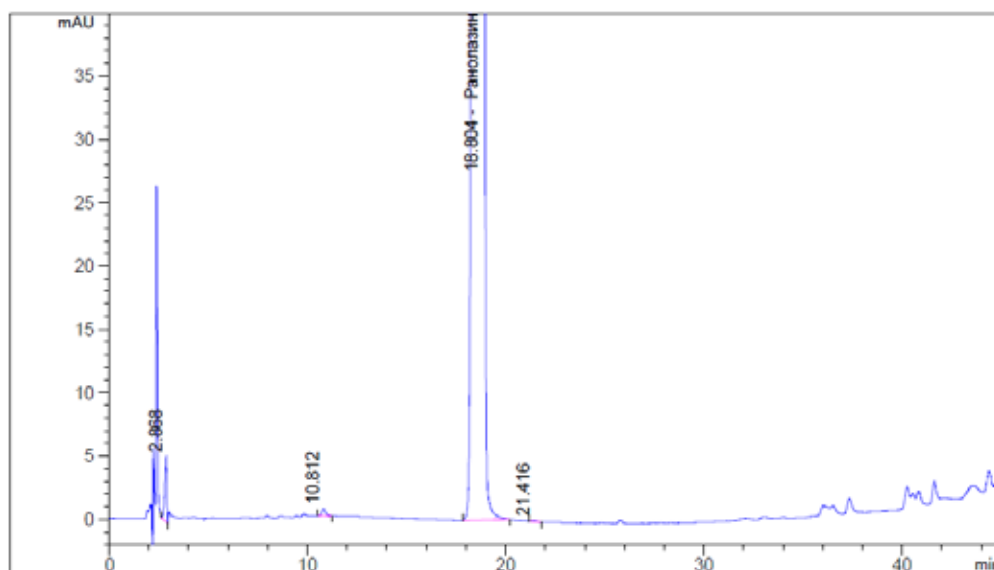


Рисунок 4. – Пример хроматограммы раствора продуктов щелочного гидролиза испытуемого раствора ранолазина

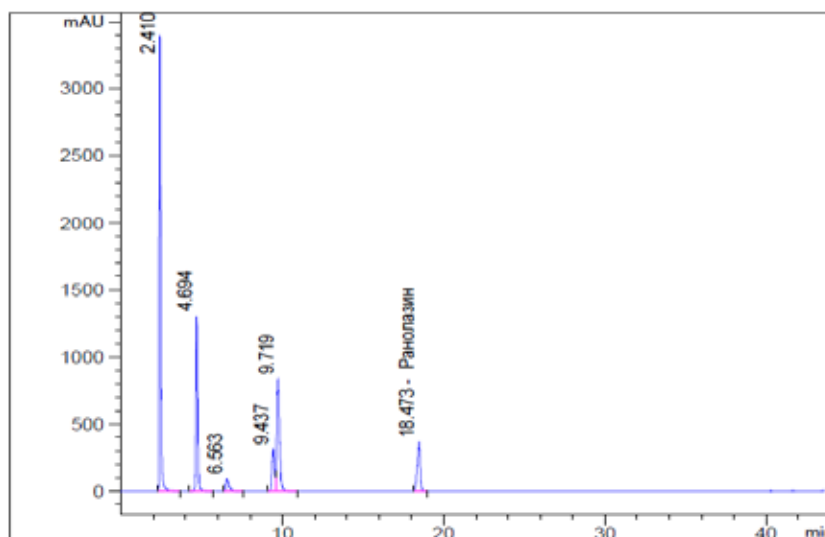


Рисунок 5. – Пример хроматограммы продуктов окисления испытуемого раствора ранолазина

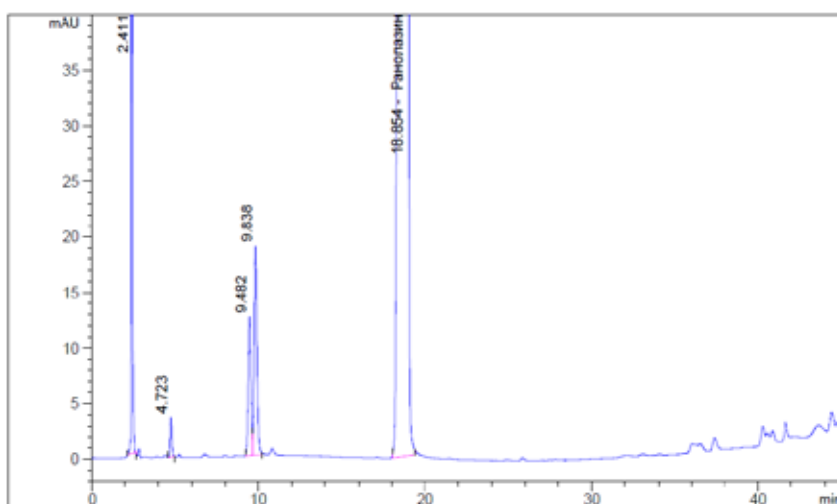


Рисунок 6. – Пример хроматограммы испытуемого раствора ранолазина после термического воздействия

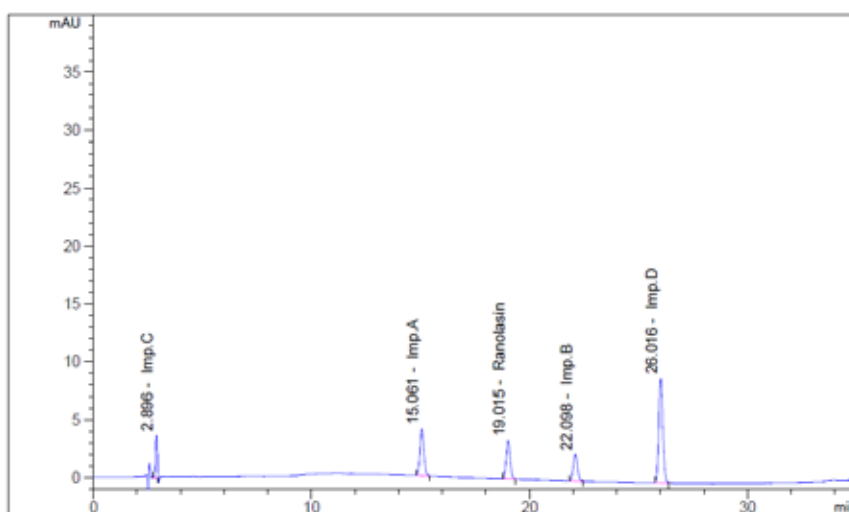


Рисунок 7. – Пример хроматограммы смеси идентифицируемых примесей

Определение предела количественного определения. Для определения предела количественного определения (ПКО) готовили растворы с низкой концентрацией ранолазина и идентифицируемых при-

месей и, исходя из соотношения сигнал/шум базовой линии, определяли ПКО. В таблице 3 приведены результаты испытаний определения ПКО ранолазина и каждой из идентифицируемых примесей.

Таблица 3. – Результаты испытаний предела количественного определения для ранолазина и примесей

Концентрация, % от предельного содержания примеси	Среднее соотношение сигнал/шум				
	Ранолазин	Примесь А	Примесь В	Примесь С	Примесь D
2,5	5,4	9,7	4,9	-	8,4
5	11,9	19,9	10,05	5,3	17,1
10	-	-	-	8,4	-
15	-	-	-	11,03	-

Исходя из результатов полученных соотношений сигнал/шум (более 10) [16], для данной методики определения содержания сопутствующих примесей в таблетках «Ранолазин-НАН» ПКО составил 5,0% для ранолазина (неидентифицируемых примесей) и примесей А, В, D, и 15,0% – для примеси С.

Линейность. Для определения содержания единичных неидентифицируемых примесей линейность оценивали путем построения графика зависимости площади пика от концентрации ранолазина в растворе на всем диапазоне приме-

ния (5–125%). Линейность методики для единичных идентифицированных примесей (А, В, С, D) оценивали по растворам соответствующих идентифицированных примесей на соответствующих диапазонах применения методики (ПКО – 125%). На рисунке 8 представлены хроматограммы растворов ранолазина, полученные для определения линейности в диапазоне 5–125%.

В таблице 4 представлены результаты испытаний линейности для растворов ранолазина и примесей в диапазоне от ПКО до 125 % от предельного значения для еди-

Таблица 4. – Результаты испытаний линейности для ранолазина и идентифицированных примесей

Концентрация, % от предельного содержания идентифицируемой примеси и ранолазина	Средняя площадь пика, mAU*s				
	Ранолазин	Примесь А	Примесь В	Примесь С	Примесь D
5	3,0	7,5	3,2	-	3,8
10	6,7	12,5	6,6	-	7,6
15	10,2	19,2	10,0	9,1	11,9
20	13,6	26,1	13,4	13,0	15,4
40	26,5	52,3	26,5	25,0	30,9
50	32,8	65,2	33,0	31,0	38,8
80	48,0	97,4	50,0	46,0	58,5
100	63,8	126,6	66,9	61,0	77,2
125	80,3	161,4	83,1	78,0	95,6
Уравнения линейной зависимости $y=bx+a$	$y = 31,915x + 0,5252$	$y = 52,493x + 0,5152$	$y = 24,335x - 0,0764$	$y = 32,798x + 0,1524$	$y = 31,484x + 0,1871$
Коэффициент корреляции	0,9999	0,9998	1,0	0,9997	0,9999
Сравнение $ a * \text{и } \Delta_a *$	$ a = 0,5252$ $\leq \Delta_a = 0,5640$	$ a = 0,5152$ $\leq \Delta_a = 1,2655$	$ a = 0,0764$ $\leq \Delta_a = 0,2246$	$ a = 0,1524$ $\leq \Delta_a = 1,0945$	$ a = 0,1871$ $\leq \Delta_a = 0,4968$

Примечание: * – модуль свободного члена а; Δ_a – доверительный интервал свободного члена а.

ничной неидентифицируемой или идентифицируемой примеси, а также уравнения линейной зависимости между различными концентрациями растворов ранолазина/идентифицируемых примесей и площадями пиков.

Линейность методики определения сопутствующих примесей в таблетках «Ранолазин-НАН» в пределах исследуемого диапазона применения подтверждена высокими значениями коэффициента корреляции ($> 0,99$), а также тем, что свободный член «а» статистически незначимо отличается от нуля (таблица 4).

При количественном определении примесей относительно ранолазина в расчетах необходимо учитывать относительный фактор отклика детектора F_i , который вычислили для каждой идентифицированной примеси. Все полученные данные сведены в таблицу 5, из которой следует, что фактор отклика следует учитывать только для примесей А и В, так как чувствительность детектора к этим примесям отличается от чувствительности детектора к ранолазину (значение фактора отклика F_i выходит за установленный допустимый диапазон 0,8–1,2) [13, 14].

Таблица 5. – Результаты испытаний при определении фактора отклика детектора для ранолазина и примесей

Показатель	Ранолазин	Примесь А	Примесь В	Примесь С	Примесь D
Фактор отклика F_i	1,0	0,61	1,31	0,97	1,01

Правильность. Правильность методики определения сопутствующих примесей в таблетках «Ранолазин-НАН» изучали на двенадцати образцах (4 модельных смеси с содержанием примесей на уровне ПКО (5%/15%), 50%, 100% и 125% от предельного содержания и по три повтора для каждой смеси). Расчет проводили методом внешнего стандарта с использованием стандартного раствора ранолазина [10, 11]. В таблице 6 представлены данные статистической обработки результатов определения правильности для примесей А, В, С, D и ранолазина с критериями приемлемости и выводами о соответствии.

Систематическую составляющую неопределенности (δ) можно характеризовать отличием среднего значения степени извлечения ($Z_{ср}$) от 100%. Систематическая погрешность статистически неотличима от нуля, если отклонение $Z_{ср}$ от нуля не превышает свой доверительный интервал. Для всех модельных смесей идентифицированных примесей А, В, С, D средние значения степеней извлечения не выходят за рамки установленного диапазона (Z от 85% до 115%), t -критерий Стьюдента меньше расчетного и систематическая погрешность статистически неотличима от нуля, что удовлетворяет установленному критерию приемлемости. Правильность методики определения сопутствующих примесей в таблетках «Ранолазин-НАН» подтверждена.

Сходимость. Сходимость методики определения сопутствующих примесей в таблетках «Ранолазин-НАН» определяли

по образцам с добавкой каждой из идентифицируемых примесей в унифицированном количестве (по 0,5 мл в каждую из 6 проб каждой примеси). Данные наблюдений и результаты статистической обработки приведены в таблице 7.

Относительное стандартное отклонение средних значений содержаний примесей в таблетках «Ранолазин-НАН» не превышает 5,0%, что подтверждает сходимость результатов.

Внутрилабораторная прецизионность. Внутрилабораторная прецизионность методики определения сопутствующих примесей в таблетках ЛС «Ранолазин-НАН» проводилась разными аналитиками в разные дни на разных приборах. Данные статистической обработки результатов представлены в таблице 8.

Согласно таблице 8 и критериям Фишера и Стьюдента, различие дисперсий S_1^2 и S_2^2 , а также средних значений содержания примесей $\bar{x}_1$ и $\bar{x}_2$ двух выборок испытуемых образцов растворов примесей А, В, С, D – незначимо.

Таким образом, подтвердили внутрилабораторную прецизионность методики определения сопутствующих примесей в таблетках «Ранолазин-НАН».

Устойчивость (робастность) методики. Для оценки устойчивости методики определения сопутствующих примесей в таблетках «Ранолазин-НАН» изменяли два параметра: температуру колонки и скорость потока. Результаты статистической обработки данных представлены в таблице 9.

Таблица 6. – Данные статистической обработки результатов испытаний правильности для ранолазина и примесей

Рассчитанные значения	Критерий приемлемости	Соответствие критериям
Ранолазин		
$\Delta_z/\sqrt{n}=2,444; \delta=0,905$	$\delta\% = Z_{\text{ср}} - 100 \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}$	Соответствует
$t_{\text{расч}} = 0,808$	$t_{\text{расч}} < t_{\text{табл}}(0,95;11)=2,201$	Соответствует
$Z= 100,91\%$	Z от 85 до 115%	Соответствует
Примесь А		
$\Delta_z/\sqrt{n}=2,046; \delta=1,165$	$\delta\% = Z_{\text{ср}} - 100 \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}$	Соответствует
$t_{\text{расч}} = 1,269$	$t_{\text{расч}} < t_{\text{табл}}(0,95;11)=2,201$	Соответствует
$Z= 98,83 \%$	Z от 85 до 115%	Соответствует
Примесь В		
$\Delta_z/\sqrt{n}=3,205; \delta=0,073$	$\delta\% = Z_{\text{ср}} - 100 \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}$	Соответствует
$t_{\text{расч}} = 0,05$	$t_{\text{расч}} < t_{\text{табл}}(0,95;11)=2,201$	Соответствует
$Z= 99,93\%$	Z от 85 до 115%	Соответствует
Примесь С		
$\Delta_z/\sqrt{n}= 1,785; \delta=0,390$	$\delta\% = Z_{\text{ср}} - 100 \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}$	Соответствует
$t_{\text{расч}} = 0,483$	$t_{\text{расч}} < t_{\text{табл}}(0,95;11)=2,201$	Соответствует
$Z= 99,61\%$	Z от 85 до 115%	Соответствует
Примесь D		
$\Delta_z/\sqrt{n}=1,649; \delta=0,036$	$\delta\% = Z_{\text{ср}} - 100 \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}$	Соответствует
$t_{\text{расч}} = 0,048$	$t_{\text{расч}} < t_{\text{табл}}(0,95;11)=2,201$	Соответствует
$Z= 100,04\%$	Z от 85 до 115%	Соответствует

Таблица 7. – Результаты испытаний образцов таблеток «Ранолазин-НАН» с добавками примесей по тесту «Сходимость»

Примесь	Содержание индивидуальной примеси, %						Среднее	RSD, %
	1	2	3	4	5	6		
А	0,122	0,122	0,122	0,122	0,121	0,124	0,122	0,65
В	0,146	0,147	0,147	0,144	0,144	0,145	0,145	0,99
С	0,076	0,074	0,074	0,074	0,075	0,075	0,075	1,24
D	0,138	0,135	0,139	0,134	0,134	0,140	0,137	2,05

Так как относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика ранолазина составило не более 5,0%, эффективность колонки не менее 2000 теоретических тарелок, коэффициент асимметрии для пика ранолазина на хроматограмме раствора сравнения находился в диапазоне 0,8–2,0,

методика определения сопутствующих примесей в таблетках ЛС «Ранолазин-НАН» устойчива к небольшим изменениям температуры колонки и скорости потока.

Определение диапазона применения. Исходя из данных, полученных по результатам исследованных тестов, дан-

Таблица 8. – Результаты внутрилабораторной воспроизводимости методики определения примесей в таблетках «Ранолазин-НАН»

Условия испытаний	Среднее содержание примеси ($\bar{x}_i$), %	Дисперсия (S^2_i)
Содержание примеси А, %		
Аналитик 1	0,122	$6,37 \times 10^{-7}$
Аналитик 2	0,121	$2,65 \times 10^{-6}$
$S_{\text{бол.}}^2/S_{\text{мен.}}^2 = 4,16 < F_{\text{табл}}(P; f_1; f_2) = 5,05$		
$t_{\text{расч}} = 1,54 < t_{\text{табл}}(0,95; 10) = 2,23$		
Содержание примеси В, %		
Аналитик 1	0,145	$2,08 \times 10^{-6}$
Аналитик 2	0,148	$6,41 \times 10^{-6}$
$S_{\text{бол.}}^2/S_{\text{мен.}}^2 = 3,09 < F_{\text{табл}}(P; f_1; f_2) = 5,05$		
$t_{\text{расч}} = 1,84 < t_{\text{табл}}(0,95; 10) = 2,23$		
Содержание примеси С, %		
Аналитик 1	0,075	$8,56 \times 10^{-7}$
Аналитик 2	0,074	$5,38 \times 10^{-7}$
$S_{\text{бол.}}^2/S_{\text{мен.}}^2 = 1,59 < F_{\text{табл}}(P; f_1; f_2) = 5,05$		
$t_{\text{расч}} = 1,96 < t_{\text{табл}}(0,95; 10) = 2,23$		
Содержание примеси D, %		
Аналитик 1	0,137	$7,86 \times 10^{-6}$
Аналитик 2	0,136	$8,02 \times 10^{-6}$
$S_{\text{бол.}}^2/S_{\text{мен.}}^2 = 1,02 < F_{\text{табл}}(P; f_1; f_2) = 5,05$		
$t_{\text{расч}} = 0,22 < t_{\text{табл}}(0,95; 10) = 2,23$		

Таблица 9. – Результаты испытания устойчивости аналитической методики определения сопутствующих примесей в таблетках «Ранолазин-НАН»

Параметр	Значение параметра	Средняя площадь пика ранолазина, mAU*s	RSD, %	Эффективность колонки	Коэффициент асимметрии
				Среднее значение	
Температура колонки, °С	23	67,6	0,58	34784	1,04
	27	68,25	0,46	38955	1,02
Без изменений	25 /1,0	68,02	0,59	37470	1,03
Скорость потока, мл/мин	1,1	61,6	0,67	32981	1,03
	0,9	75,41	0,26	39342	1,04

ная методика определения содержания сопутствующих примесей в таблетках «Ранолазин-НАН» применима в диапазоне 0,005% – 0,125% для неидентифицируемых примесей и примесей А, В, D и в диапазоне от 0,015% до 0,125% для примеси С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика определения сопутствующих примесей в таблетках ЛС «Ранолазин-НАН». Валидация методики определения сопутствующих примесей в

таблетках лекарственного средства пролонгированного действия «Ранолазин-НАН» выполнена в соответствии с аналитическими характеристиками метода: испытание пригодности хроматографической системы, специфичность, правильность, прецизионность (сходимость, внутрилабораторная прецизионность), предел количественного определения, линейность, робастность, диапазон применения. По валидационным характеристикам разработанная методика соответствует требованиям Государственной фармакопеи Республики Беларусь.

SUMMARY

V. B. Klimashevich, E. V. Kokusev,
V. V. Gudovich, O. A. Kazyuchits,
A. I. Zhebentyaev

**DEVELOPMENT AND VALIDATION
OF THE PROCEDURE
FOR QUANTITATIVE DETERMINATION
OF IMPURITIES IN TABLETS
“RANOLAZIN-NAN”**

The article presents the results of the research on the development of the procedure for determining related impurities by high-performance reversed-phase chromatography in the tablets “Ranolazin-NAN”. The conditions for samples preparation of ranolazine tablets, optimal conditions for the gradient mode of chromatography were selected using Zorbax Eclipse Plus C18 column: eluent A – 0,1% triethylamine buffer with pH $6,0 \pm 0,1$ (diluted with orthophosphoric acid) and acetonitrile in a ratio 70:30 v / v and eluent B – acetonitrile. The effect of pH medium (2,0, 6,0 and 9,0) on the efficiency of the column while studying the solutions of ranolazine and identified impurities was established. The suitability of the chromatographic system was proven and the specificity of the method for determining unidentified and identified impurities was proven. Linearity in the entire range of the procedure usage (from the quantitation limit to 125% (of the content of a single impurity)), correctness as well as precision at the level of reproductivity and intermediate precision, and the stability (robustness) of the method with small changes in the flow rate and column temperature were proven for the procedure of related impurities determination in Ranolazin-NAN tablets.

Keywords: ranolazine, high performance chromatography, validation, suitability of the chromatographic system, specificity, acceptance criterion, chromatographic conditions.

ЛИТЕРАТУРА

1. Число зарегистрированных родившихся, умерших, браков и разводов по Республике Беларусь за январь – март 2020 г. [Электронный ресурс] / Национальный статистический комитет Республики Беларусь. – 2020. – Режим доступа: <https://www.belstat.gov.by/upload/iblock/486/4866f19f86d7c3d71be0063e76229230.pdf>. – Дата доступа: 01.02.2021.
2. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes /

J. Knuuti [et al.] // *Europ. Heart J.* – 2020. – Vol. 14, N 41. – P. 407–477.

3. Барышникова, Г. А. Место инновационного препарата ранолазина в лечении ишемической болезни сердца / Г. А. Барышникова, С. А. Чорбинская, И. И. Степанова // *Медиц. совет.* – 2014. – № 12. – С. 44–48.

4. Клиническая фармакология, фармакологическая терапия: пособие / М. Р. Конорев [и др.]; под ред. М. Р. Конорева. – Витебск: Витебский гос. медиц. ун-т, 2015. – 354 с.

5. A novel reverse phase stability indicating PR-UPLC method for the quantitative determination of fifteen related substances in ranolazine drug substance and drug product / V. Malati [et al.] // *Talanta.* – 2012. – Vol. 97. – P. 563–573.

6. Development and validation of a new analytical method for the determination of related components and assay of ranolazine in bulk drug and pharmaceutical dosage forms by LC / A. Madhavi [et al.] // *Chromatographia.* – 2009. – Vol. 70, N 1. – P. 333–338.

7. Suresh Babu V. V. Validated HPLC method for determination related substances in compatibility studies and novel extended release formulation for ranolazine / V. V. Suresh Babu, V. Sudhakar, M. Tegk // *J. of chromatography separation techniques.* – 2014. – Vol. 5, N 1. – P. 1–7.

8. Ranolazine [Electronic resource] // *Drugbank.* – 2005. – Mode of access: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00243>. – Date of access: 10.01.2018.

9. Сычев, К. С. Мир химии. Правильная эксплуатация ВЭЖХ оборудования и колонок / К. С. Сычев. – Москва: Техносфера, 2020. – 156 с.

10. Ацетонитрил – уникальный растворитель для жидкостной хроматографии и экстракции / О. Б. Рудаков [и др.] // *Вестн. Воронежского гос. ун-та. Сер. Химия. Биология. Фармация.* – 2015. – № 3. – С. 41–46.

11. Рудаков, О. Б. Элюирующая способность подвижных фаз в обращенно-фазовой ВЭЖХ и удерживание фенольных соединений / О. Б. Рудаков, Л. В. Рудакова, Грошев Е. Н. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* – 2011. – Т. 11, № 5. – С. 633–640.

12. Yadavalli, V. Green Aspects of Scale-Up Synthesis of Some APIs, Drug Candidates Under Development or Their Critical Intermediates / V. Yadavalli, R. Kambhampati // *Applications of Nanotechnology for Green Synthesis* / M. Inamuddin, A. Asiri. – Switzerland: Springer, 2020. – Ch. 7. – P. 145–190.

13. Государственная фармакопея Республики Беларусь: в 2 т. : введ. в действие с 1 янв. 2013 г. приказом М-ва здравоохранения РБ от 25.04.2012 г. № 453. – Т. 1 : Общие методы контроля качества лекарственных средств / М-во здравоохранения Республики Беларусь, Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении ;

[под общ. ред. А. А. Шерякова]. – Молодечно: Победа, 2012. – 1220 с.

14. Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний. Основные положения: ТКП 432 – (02041). – Введ. 29.12.12. – Минск: Департамент фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 2012. – 22 с.

REFERENCES

1. Natsional'nyi statisticheskii komitet Respubliki Belarus'. The number of registered births, deaths, marriages and divorces in the Republic of Belarus for January - March 2020 [Elektronnyi resurs]. 2020. Rezhim dostupa: <https://www.belstat.gov.by/upload/iblock/486/4866f19f86d7c3d71be0063e76229230.pdf>. Data dostupa: 01.02.2021. (In Russ.)

2. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. Eur Heart J. 2020;14(41):407-77. doi: 10.1093/eurheartj/ehz425

3. Baryshnikova GA, Chorbinskaia SA, Stepanova II. The place of the innovative drug ranolazine in the treatment of coronary heart disease. Medits sovet. 2014;(12): 44-8. (In Russ.)

4. Konorev MR, Gurin NG, Kuz'mina OI, Dorozhkina OP, Kurliuk OV, Antonova EG i dr. Konorev MR, redaktor. Clinical pharmacology, pharmacological therapy: posobie. Vitebsk, RB: Vitebskii gos medits un-t; 2015. 354 s. (In Russ.)

5. Malati V, Reddy AR, Mukkanti K, Suryanarayana MV. A novel reverse phase stability indicating PR-UPLC method for the quantitative determination of fifteen related substances in ranolazine drug substance and drug product. Talanta. 2012;97:563-73. doi: 10.1016/j.talanta.2012.03.067

6. Madhavi A, Subba Rao DV, Srinivasu P, Naidu A. Chromatographia. 2009;70(1):333-8. doi: 10.1365/s10337-009-1145-5

7. Suresh Babu VV, Sudhakar V, Tegk M. Validated HPLC method for determination related substances in compatibility studies and novel extended release formulation for ranolazine.

J Chromatogr Sep Tech. 2014;5(1):1-7. doi: 10.4172/2157-7064.1000209

8. Ranolazine [Electronic resource]. Drugbank. 2005. Mode of access: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00243>. Date of access: 10.01.2018

9. Sychev, K. S. The world of chemistry. Correct Operation of HPLC Equipment and Columns. Moskva, RF: Tekhnosfera, 2020; 156 s. (In Russ.)

10. Rudakov OB, Khorokhordina EA, Rudakova LV, Groshev EN. Acetonitrile is a unique solvent for liquid chromatography and extraction. Vestn Voronezhskogo gos un-ta. Ser Khimii Biologii i Farmatsii. 2015;(3):41-6. (In Russ.)

11. Rudakov OB, Rudakova LV, Groshev EN. Elution Capacity of Mobile Phases in Reversed Phase HPLC and Retention of Phenolic Compounds. Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy. 2011;11(5):633-40. (In Russ.)

12. Yadavalli V, Kambhampati R. Green Aspects of Scale-Up Synthesis of Some APIs, Drug Candidates Under Development or Their Critical Intermediates. In: Inamuddin M, Asiri A, editors. Applications of Nanotechnology for Green Synthesis. Switzerland: Springer; 2020. Ch. 7. p. 145-90.

13. Ministerstvo zdravookhraneniia Respubliki Belarus', Tsentr ekspertiz i ispytaniia v zdravookhraneniia. State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus: v 2 t. T. 1. General methods of quality control of medicines. Sheriakov AA, redaktor. Molodechno, RB: Pobeda; 2012. 1220 s. (In Russ.)

14. Manufacturing of medicines. Validation of test procedures. Key provisions: ТКП 432. Vved 2012 Dek 29. Minsk, RB: Departament farmatsevt prom-sti M-va zdravookhraneniia Resp Belarus'; 2012. 22 s. (In Russ.)

Адрес для корреспонденции:

220141, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. академика В.Ф. Купревича, д.5, к.3,
Республиканское производственное
унитарное предприятие "АКАДЕМФАРМ",
тел/факс: +375(17)268 63 64,
e-mail: alkiona9@mail.ru,
Климашиевич В.Б.

Поступила 04.06.2021 г.