

ВАЛИДАЦИЯ ВЭЖХ-МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОЙ СУБСТАНЦИИ В ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ

М.Р.Юсупов^{id}, А.Т.Арысбекова^{id}, К.С. Бегасыл^{id}, А.А. Адамбаева^{id},
Р.Б. Айтлесова^{id}, Н. Ж. Кошкинбай^{id}, А.С. Нурпейсова^{id}, Ж.С. Абай^{id},
М.М. Касенов^{id}

Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт

*malik_imhana@mail.ru

Аннотация. В данной работе рассматриваются принципы и методика валидации аналитического метода, основанного на высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), применяемого для контроля качества и количественного определения активной субстанции в противогельминтном лекарственном средстве.

Описаны ключевые параметры валидации, такие как специфичность, линейность, точность, прецизионность, предел обнаружения и предел количественного определения. Проведённый анализ позволил подтвердить соответствие метода требованиям нормативной документации, что обеспечивает его пригодность для последующего контроля качества препарата. Полученные результаты свидетельствуют о высокой надёжности и воспроизводимости ВЭЖХ-метода в условиях лабораторного контроля фармацевтической продукции. Установлено, что по всем представленным параметрам метод отвечает требованиям нормативных документов.

Ключевые слова: празиквантел, ВЭЖХ, валидация, контроль качества.

Введение Одним из наиболее чувствительных и воспроизводимых методов является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) — это один из наиболее широко используемых аналитических методов в фармацевтической промышленности. Благодаря высокой чувствительности, воспроизводимости и возможности применения к широкому спектру веществ, ВЭЖХ является золотым стандартом при контроле качества лекарственных средств. Однако для использования метода в рамках официального контроля необходимо его документально подтверждённое соответствие требованиям надёжности, что достигается валидацией [1 - 3].

ВЭЖХ это один из самых эффективных способов разделения и анализа сложных смесей. Как метод она была открыта в 1903 г. русским ученым-ботаником М.С. Цветом [4]. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) представляет собой вариант колоночной жидкостной хроматографии, в котором неподвижная фаза (сорбент) обычно состоит из частиц размером менее 10–20 мкм. Малый размер частиц необходим для высокой эффективности разделения, но увеличивает давление, требуемое для прокачивания подвижной фазы через колонку [5].

Цель представленной работы заключается в валидационной оценке аналитического метода количественного определения в лекарственной форме с использованием ВЭЖХ.

Объектом анализа является активная субстанция противогельминтного лекарственного средства — празиквантел, препарат для дегельминтизации домашних и диких плотоядных против эхинококкоза, альвеококкоза, описторхоза и других гельминтозов [5 - 8].

Материалы и методы

В работе использовались приборы:

- жидкостный хроматограф Agilent 1200 Series с колонкой C18;
- рН-метр ионометр С933;
- аналитические весы Precisa, модель 320ХТ.

В составе таблеток «ЦесТремForte» применяемый для дегельминтизации домашних и диких плотоядных против эхинококкоза, альвеококкоза, описторхоза и других гельминтозов, основным действующим веществом является празиквантел и наполнители: сахароза,

карбоксиметицеллюлоза натриевая соль, крахмал кукурузный, кальция стеарат и желатин для покрытия таблеток, с целью улучшения терапевтической активности и пролонгации основного действующего вещества.

500 мг таблетки содержит: активное вещество-празиквантел - 75 мг, наполнители: сахароза -160,0 мг, карбоксиметицеллюлоза (натриевая соль) -0,008 мг, крахмал кукурузный -260,0 мг, кальций стеарат - 0,005 мг и желатин - 4,987.

Определение валидационных параметров метода проводили на модельных смесях таблеток празиквантел в пересчете на одну дозу вещества (75 мг).

Метод количественного определения содержания празиквантела в таблетках.

Около 500 мг (точная навеска) препарата (эквивалентного 75 мг празиквантела) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 20 мл подвижной фазы, перемешивали в течение 15 минут, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,75 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата.

В качестве подвижной фазы (ПФ) использовали ацетонитрил (рН -3.0), в соотношении 45:55. По 20 мкл испытуемого раствора и раствора празиквантела попеременно хроматографировали на жидкостном хроматографе с УФ - детектором, получая не менее пяти хроматограмм, в следующих условиях:

- колонка размером 2.1 x150 мм, заполненная Zorbax XDB C18 с размером частиц 5 мкм;
- подвижная фаза ацетонитрил - вода очищенная (45:55), дегазированная любым удобным способом;
- скорость подвижной фазы 1 мл/мин;
- детектирование при длине волны 210 нм
- температура колонки комнатная.

Содержание празиквантела в одной таблетке (X) в миллиграммах вычисляли, по формуле:

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

- где S_1 - среднее значение площадей пиков празиквантела, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_0 - среднее значение площадей пиков празиквантела, вычисленное из хроматограмм СО празиквантела;

m_1 - масса навески препарата в миллиграммах;

m_0 - масса навески СО празиквантела в миллиграммах;

P - содержание празиквантела в СО празиквантела в процентах;

b - средняя масса таблеток в миллиграммах.

Содержание празиквантела в одной таблетке должно быть от 70 до 80 мг, считая на среднюю массу таблетки.

Результаты и обсуждение

На первом этапе для проведения анализа необходимо было подобрать растворитель для извлечения празиквантела из таблеточной массы. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил. Раствор используется свежеприготовленным виде. Для приготовления подвижной фазы брали ацетонитрил 45 мл, добавляли 55 мл воды.

Около 40 мг (точная навеска) субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в ПФ и доводили объем раствора тем же растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 1,0 мл испытуемый раствор это у нас празиквантел и доводили объем раствора ПФ до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 1,0 мл полученного раствора и доводили объем раствора ПФ до метки.

Специфичность определяли путем сравнения хроматограмм модельных таблеток. Время удерживания (t_R) исследуемого вещества на хроматограмме СО празиквантела составляет 1,4 минуты. На хроматограммах модельных таблеток празиквантела помимо пика основного вещества с $t_R=1,4$ мин. других пиков не зафиксирован.

Таблица 1 - Результаты определения подлинности празиквантела в препарате «ЦесТремФорте» параметром специфичности

Наименование	Результаты						Отклонение
	1	2	3	4	5	Среднее значение	срСО - срИО
Стандартный образец	1,435	1,435	1,430	1,431	1,433	1,433	0,002
Испытуемый образец	1,433	1,430	1,432	1,432	1,429	1,431	

В качестве критерия идентификации использовали сопоставление времени удерживания основного пика празиквантела на хроматограммах анализируемого образца и стандартного раствора. Совпадение времени удерживания на обеих хроматограммах подтверждает подлинность вещества.

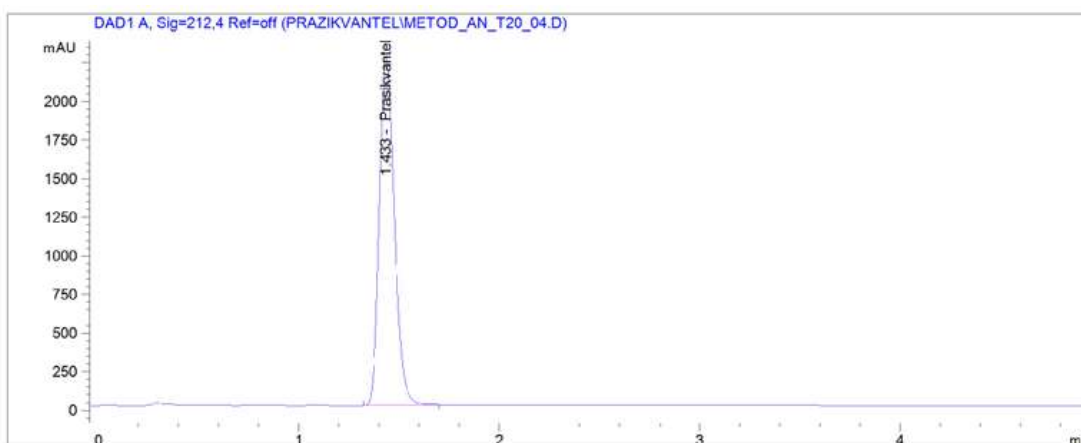


Рисунок 1 - Хроматограмма стандартного образца празиквантела

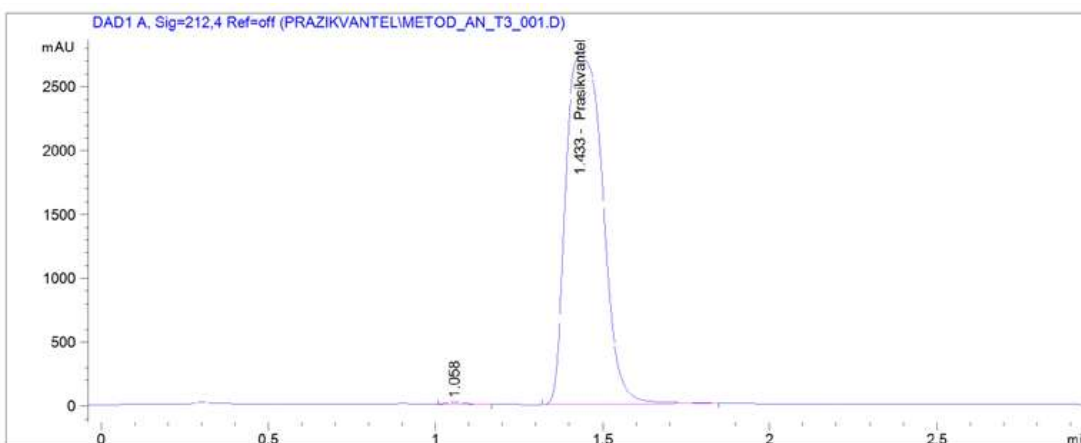


Рисунок 2 - Хроматограмма испытуемого препарата «ЦесТремФорте»

Метод показал хорошую специфичность: в хроматограммах стандартного раствора празиквантела и образца препарата пик основного вещества имел одинаковое время удерживания и не перекрывался с другими пиками, обусловленными вспомогательными веществами. Пик празиквантела был четким, симметричным и хорошо разрешенным, что свидетельствует об отсутствии интерференции со стороны компонентов лекарственной формы.

Линейность определяли путем измерения площади пиков извлечений из 5 образцов модельных смесей таблеток празиквантела действующего вещества 80, 90, 100, 110 и 120 %. Установлено, что аналитическая область метода, находящаяся в диапазоне 60-90 мг, входит в пределы линейной зависимости с коэффициентом корреляции $r=0,999$.

Таблица 2 - Результаты испытаний, подтверждающие корректность методики определения празиквантела

п/п	Введённое количество (мг)	% теоретического	Обнаруженное количество (мг)	Степень извлечения, %
	60,124	80%	60,041	99,86
	59,891	80%	59,88	99,98
	60,233	80%	60,21	99,96
	67,995	90%	67,923	99,89
	67,381	90%	67,491	100,16
	67,711	90%	67,624	99,87
	74,996	100%	75,031	100,05
	75,101	100%	75,11	100,01
	74,765	100%	74,81	100,06
0	82,913	110%	82,74	99,79
1	82,501	110%	82,677	100,21
2	82,24	110%	82,352	100,14
3	90,321	120%	90,195	99,86
4	89,981	120%	90,03	100,05
5	90,012	120%	90,022	100,01
Среднее значение степени извлечения, %				99,99333

Правильность предлагаемого метода определяли на 6 образцах модельных смесей таблеток с известным содержанием празиквантела.

С целью проверки повторяемости метода проводили трехуровневый эксперимент по 3 опыта на каждом уровне.

Общие результаты празиквантела оценки ВЭЖХ определения празиквантела в модельных смесях таблеток представлены в таблице 3.

Таблица 3-Результаты валидационной оценки ВЭЖХ метода определения празиквантела

Наименование показателя	Оптимальное значение (НД)	Результат определения	Соответствие требованиям НД
Специфичность	Однородность пика	Пик определяемого вещества четко отделяется от пиков вспомогательных веществ	+
Аналитическая область	Результаты должны иметь приемлемый уровень правильности и повторяемости	Методика применима в интервале от 80 до 120% от номинального значения содержания вещества в	+

		модельных таблеток	
Линейность (коэффициент корреляции)	$\geq 0,99$	0,999	+
По критерию Стьюдента	$\leq 2,57$	0,29	+
Повторяемость (относительное стандартное отклонение RSD)	$\leq 3\%$	0,9%	+

Согласно представленным данным методики выполняется условие линейной зависимости ($|r| \geq 0,990,99$), правильности ($t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}} (P, f)$), повторяемости ($RSD \leq 3\%$).

Заключение

В ходе экспериментальной работы проведена валидация метода количественного определения активной субстанции в лечебно-профилактическом препарате - празиквантела лечебно-профилактического препарата с использованием ВЭЖХ. При помощи валидационной оценки установлено, что разработанный метод ВЭЖХ валиден по показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, повторяемость. Валидационно подтвержденный метод ВЭЖХ для количественного определения празиквантела в лекарственной форме продемонстрировал высокую степень специфичности, точности, прецизионности и линейности. Метод соответствует требованиям и может быть рекомендован для рутинного контроля качества препаратов, содержащих празиквантел.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Яшин Я.И., Яшин А.Я. Высокоэффективная жидкостная хроматография // Состояние и перспективы. Рос. хим. журнал.-2002; -47 (4): 64-79.
2. Шаповалов Е.Н. Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа // -М.: МГУ им М.В. Ломоносова. - 2007. – С.109.
3. Blum F. High performance liquid chromatography // Br J Hosp Med (Lond). 2014 Feb;75(2):C18-21. doi: 10.12968/hmed.2014.75.Sup2.C18. PMID: 24521830.
4. Sobolewska E, Biesaga M. High-Performance Liquid Chromatography Methods for Determining the Purity of Drugs with Weak UV Chromophores // A Review. Crit Rev Anal Chem. 2025;55(3):419-433. doi: 10.1080/10408347.2023.2291815. Epub 2024 Jan 5. PMID: 38180794.
5. Цвет М С Тр. Варшавского общества естествоиспытателей// Отд биол.- 1903. Т. 14.-С.11-18.
6. Бирюков А.А. Зооантропонозные заболевания человека // Ветеринарная клиника. Екатеринбург, 2003. - №10 (17). - С. 32-34.
7. Игнатова Д.Ю. Эпизоотологический мониторинг при паразитозах собак: эпизоотологические параметры паразитозов собак: дисс. ... канд. вет. наук. / Нижний Новгород, 2007. 149 с.
8. Крючкова Е.Н. Экология гельминтов у домашних и диких плотоядных животных в европейской части // Российской Федерации: дисс. ... докт. вет. наук. Иваново, 2012. 311 с.

References

1. YAshin YA.I., YAshin A.YA. Vysokoeffektivnaya zhidkostnaya hromatografiya. Sostoyanie i perspektivy. Ros. him. zhurnal.2002; 47 (4): 64-79.
2. SHapovalov E.N. Pirogov A.V. Hromatograficheskie metody analiza. -M.: MGU im M.V. Lomonosova, 2007. 109 s
3. Blum F. High performance liquid chromatography. Br J Hosp Med (Lond). 2014 Feb;75(2):C18-21. doi: 10.12968/hmed.2014.75.Sup2.C18. PMID: 24521830.
4. Sobolewska E, Biesaga M. High-Performance Liquid Chromatography Methods for Determining the Purity of Drugs with Weak UV Chromophores - A Review. Crit Rev Anal Chem. 2025;55(3):419-433. doi: 10.1080/10408347.2023.2291815. Epub 2024 Jan 5. PMID: 38180794.

5. Cvet M S Tr Varshavskogo obva estestvoispytatelej Otd biol , 1903, t 14, s 1
6. Biryukov A.A. Zooantroponoznye zabolevaniya cheloveka // Veterinarnaya klinika. Ekaterinburg, 2003. - №10 (17). - S. 32-34.
7. Ignatova D.YU. Epizootologicheskij monitoring pri parazitozah sobak: epizootologicheskie parametry parazitov sobak: diss. ... kand. vet. nauk. Nizhnij Novgorod, 2007. 149 s.
8. Kryuchkova E.N. Ekologiya gel'mintov u domashnih i dikih plotoyadnyh zhivotnyh v evropejskoj chasti Rossijskoj Federacii: diss. ... dokt. vet. nauk. Ivanovo, 2012. 311 s.

ЕМДЕУ-ПРОФИЛАКТИКАЛЫҚ ПРЕПАРАТТАҒЫ БЕЛСЕНДІ СУБСТАНЦИЯНЫ САНДЫҚ АНЫҚТАУДЫҢ ЖТСХ ӘДІСІН ВАЛИДАЦИЯЛАУ

М.Р.Юсупов , А.Т.Арысбекова , К.С. Бегасыл , А.А. Адамбаева ,
Р.Б. Айтлесова , Н. Ж. Кошкінбай , А.С. Нурпейсова , Ж.С. Абай ,
М.М. Касенов 

Қазақ ғылыми-зерттеу ветеринариялық институты
*malik_imhana@mail.ru

Аннотация. Бұл жұмыста гельминтке қарсы препараттағы белсенді субстанцияның сапасын бақылау және сандық анықтау үшін қолданылатын жоғары тиімді сұйық хроматографияға (ЖТСХ жоғары тиімді сұйық хроматография) негізделген аналитикалық әдісті валидациялау принциптері мен әдістемесі қарастырылады.

Ерекшелік, сызықтық, дәлдік, дәлдік, анықтау шегі және сандық анықтау шегі сияқты валидацияның негізгі параметрлері сипатталған. Жүргізілген талдау әдістің нормативтік құжаттаманың талаптарына сәйкестігін растауға мүмкіндік берді, бұл оның препараттың сапасын бақылау үшін жарамдылығын қамтамасыз етеді. Алынған нәтижелер фармацевтикалық өнімді зертханалық бақылау жағдайында ВЭЖХ әдісінің жоғары сенімділігі мен қайталануын көрсетеді. Ұсынылған барлық параметрлер бойынша әдіс нормативтік құжаттардың талаптарына жауап беретіні анықталды.

Түйінді сөздер: празиквантель, ЖТСХ, валидация, сапаны бақылау.

VALIDATION OF HPLC, A METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF AN ACTIVE SUBSTANCE IN A THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC DRUG

M. Yusupov , A. Arysbekova , K.S. Begasyl , A.A. Adambayeva ,
R.B. Aitlesova , N. J. Koshkinbai , A.S. Nurpeisova , J.S. Abai ,
M.M. Kasenov 

Kazakh Scientific Research Veterinary Institute
*malik_imhana@mail.ru

Annotation. This paper discusses the principles and methodology of validation of an analytical method based on high performance liquid chromatography (HPLC) used for quality control and quantitative determination of the active substance in an anthelmintic drug.

Key validation parameters such as specificity, linearity, accuracy, precision, detection limit, and quantification limit are described. The analysis made it possible to confirm the compliance of the method with the requirements of regulatory documentation, which ensures its suitability for subsequent quality control of the drug. The results obtained indicate the high reliability and reproducibility of the HPLC method in the conditions of laboratory control of pharmaceutical products. It has been established that for all the parameters presented, the method meets the requirements of regulatory documents.

Keywords: praziquantel, HPLC, validation, quality control.