

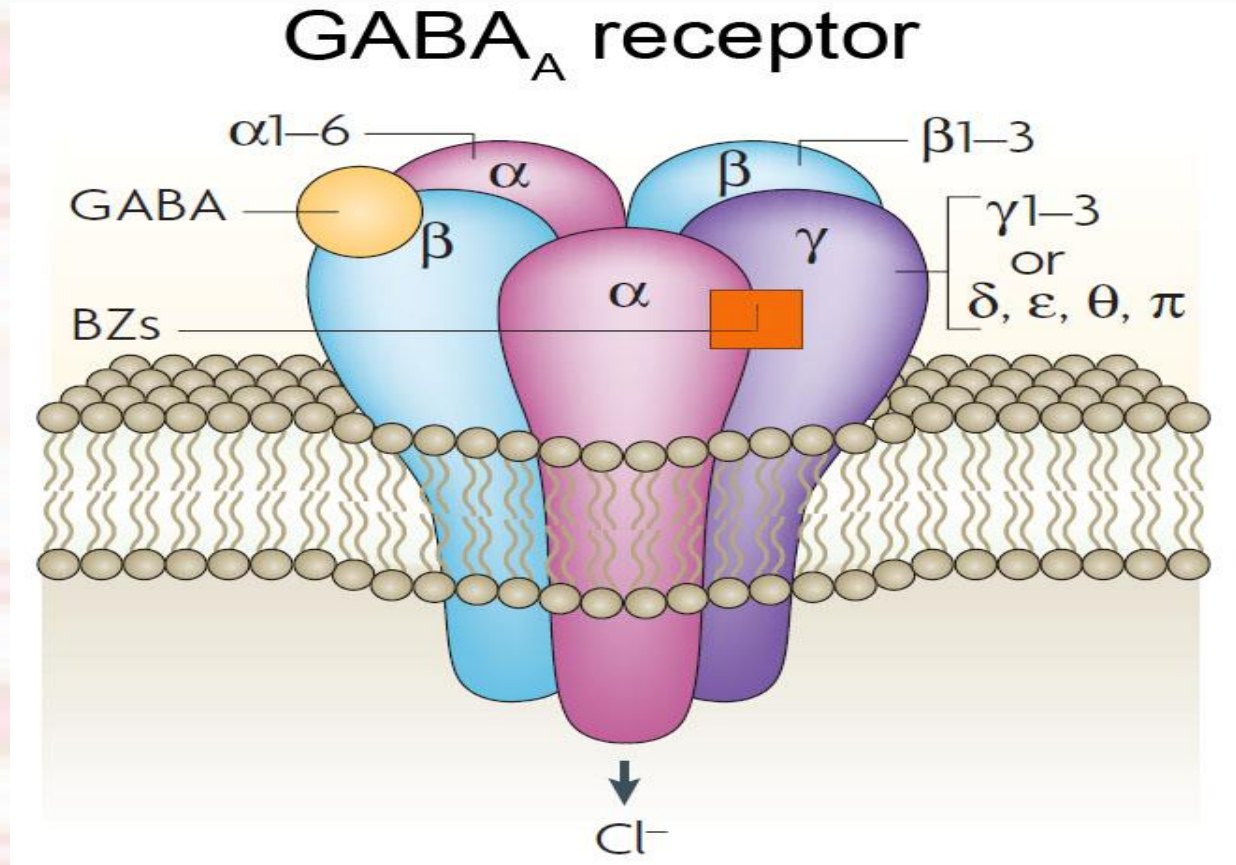
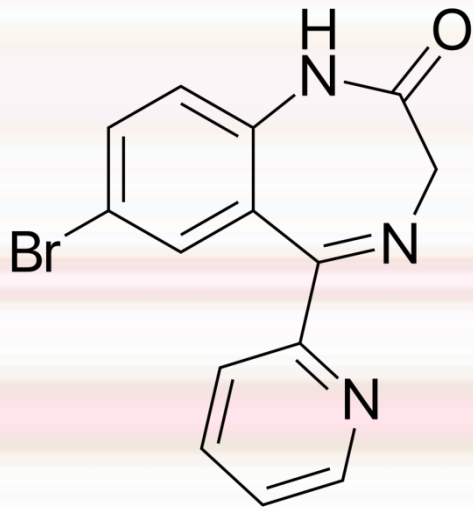
Универзитет Гоце Делчев, Факултет за
медицински науки

**РАЗВОЈ И ВАЛИДАЦИЈА НА HPLC МЕТОДА
ЗА IN-VITRO ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА
БРЗИНА НА РАСТВОРАЊЕ НА BROMAZERAM
ВО ТАБЛЕТИ**

Ирена Брчина, Биљана Ѓорѓеска

24-27 мај 2018, Будва

Бензодиазепини и Бромазепам



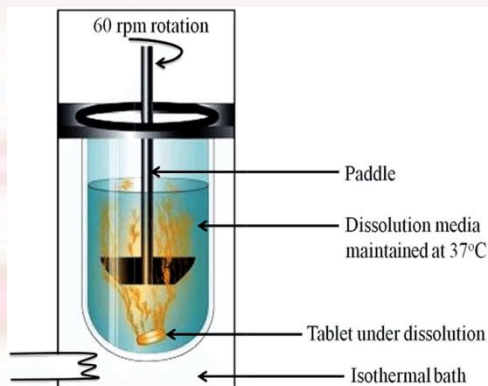
Испитување на брзина на растворливост (dissolution test)



Испитувањето на брзината на растворање на лековитата супстанција и воспоставување на *in vitro* - *in vivo* корелација довеле до развој на тестот на растворање (Dissolution test).

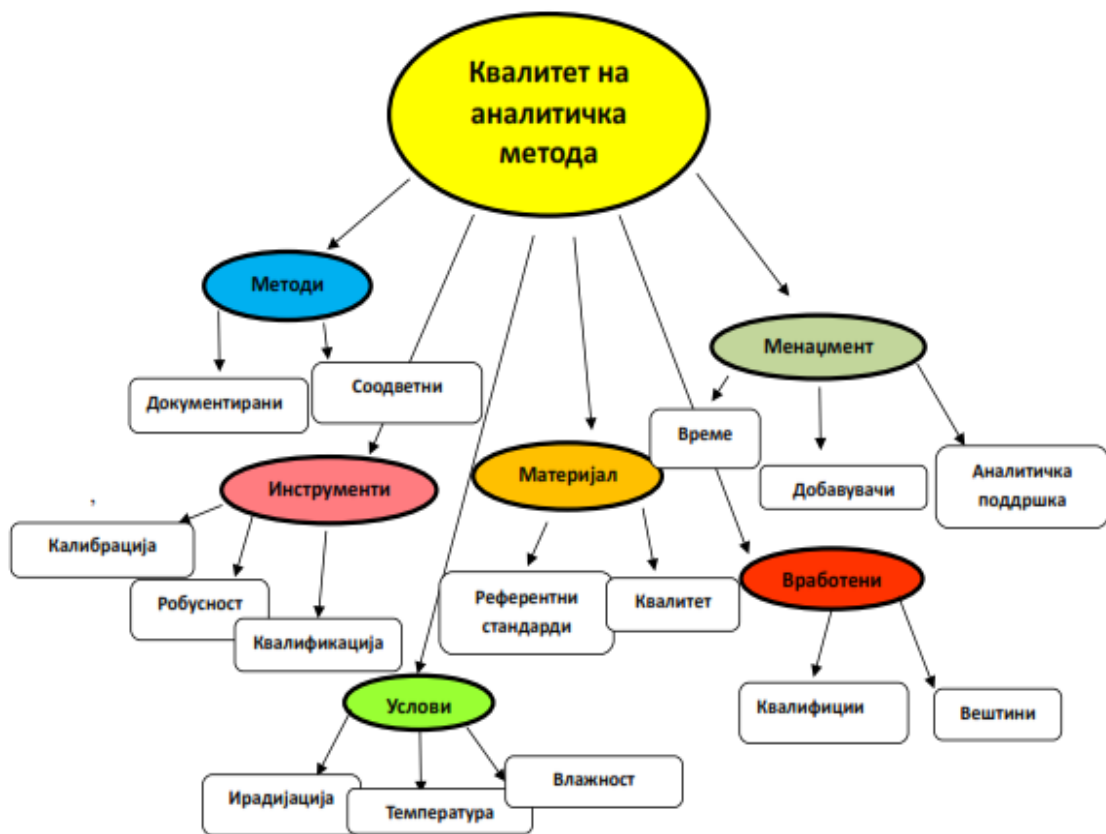
Биофармацевтски систем за класификација на лековите (Biopharmaceutics Classification System, BCS) кој се заснова на растворливоста на лековитата супстанција, нејзината пермеабилност и брзината на растворање од лековитиот облик *in vitro*.

- Одредување на брзина на растворање (тест на растворливост)
- Критериуми за тестот на растворливост кај цврсти дозирани форми
- Апаратура за изведување на дисолуциониот тест



High solubility		Low solubility		Non-classified
High permeability				
Class 1		Class 2		
Amlodipine (2) Bisoprolol (1) Cetirizine (2)* Citalopram/escitalopram (2) Donepezil (1) Doxazosin (1) Enalapril (2) Loratadine (1) Mirtazapine (1) Ondansetron (1)	Pravastatin (1) Quinapril (2) Ramipril (1) Sertraline (1) Sildenafil (1) Sildenafil (1) Terbinafin (2) Tramadol (1) Venlafaxine (1) Zolpidem (1)	Acetofenac (1) Acetofenac (1) Carbamazepine (1) Carvedilol (1) <u>Clopidogrel (3)</u> Ebastine (1) Ibuprofen (1+3) Ibuprofen (4) Irbesartan (1)	Irbesartan (1) Lamotrigine (1) Lorazepam (1) Lovastatin (1+2) Mycophenolate mofetil (1) Quetiapine (1) <u>Risperidone (1)</u> Risperidone (1) <u>Simvastatin (1)</u>	Amisulpride (1) <u>Azythromycin (2)</u> Azythromycin (2) <u>Bromazepam (1)</u> Bromazepam (1) <u>Clarithromycin (1)</u> Clarithromycin (1) <u>Clavulanate (2)</u> Clavulanate (1) Deffazacort (1)
Low permeability				
Class 3		Levetiracetam (1)* Levofloxacin (1) <u>Lisinopril (1)</u> Losartan (1) Pyrazinamide (1) Ranitidine (1) Risedronic acid (1) Terazosin (1) Topiramate (1)	Class 4 Acetaminophen (1) Amoxicillin (5) Cefixime (1) Cefuroxime axetil (1) Famotidine (2) Hydrochlorothiazide (2) <u>Oxcarbazepine (1)</u>	Deffazacort (1) Dyprone (4) <u>Flutamide (1)</u> Leflunomide (1) Lercanidipine (1) Loperamide (1) Lormetazepam (2) Naproxen (1) Norfloxacin (1) <u>Pentoxifylline (1)</u> Piroxicam (1) Pramipexole (1) Prednisone (1) Repaglinide (2) Rifampicin (1) Ropirinol (1) Torasemide (1)
<p>Classification of drugs according to ClogP permeability of Biopharmaceutics Classification System (BCS) of Therapeutic System Research Laboratories web site (http://www.tslinc.com/services/bcs/search.cfm). Drugs in bold for C_{max} and underlined for AUC correspond to non-bioequivalent parameters. (*) Therapeutic Equivalence Evaluation AA Code of FDA (Rest of codes were AB or none classified). †The primary results were maximum observed excretion rate ($Urate_{max}$) and accumulated elimination ($Ae(0,∞)$).</p>				

Валидација на аналитичка метода



Аналитичка процедура -карактеристики	Содржина -Растворливост -Потенција
Точност	+
Прецизност	+
-Повторливост	+ (1)
-Интермед. прецизност	
Специфичност (2)	+
Лимит на детекција	-
Лимит на квантификација	-
Линеарност	+
Опсег	+

- Означува дека оваа карактеристика обично не се оценува

+ Означува дека оваа карактеристика се оценува

(1) Во случај кога не е извршена репродуцибилност, интермед. прецизност не е потребна

Цели на трудот

- Главна цел на овој труд е да се развие и валидира метода за испитување на тестот за растворливост во Bromazepam таблетни формулации и истата да биде дел од обновата на регистрациската документација .
- Во важечките изданија на фармакопеите не постои HPLC аналитичка метода за *in vitro* определување на растворање на Bromazepam во таблети формулации.
- Новата развиена и валидирана метода имаше за цел да го скрати и времетраењето на анализите за да се постигне подобар економски бенефит.

Материјали и методи

Како материјал за овој специјалистички труд беа користени следните серии:

Серија I-2015, Серија II-2015, Серија III-2015 од таблети Bromazepam 1.5mg

Серија I-2015, Серија II-2015, Серија III-2015 од таблети Bromazepam 3mg

Серија I-2015, Серија II-2015, Серија III-2015 од таблети Bromazepam 6mg

Методите кои се користени во овој специјалистички труд се однесуваат на сите три јачини на Bromazepam таблети од 1.5mg, 3mg и 6mg.

Дисолуционен медиум: 0,1 М HCl, 500 ml ; 37°C

Апарат: Апарат 2 (весло), 75 вртежи во минута.

Време: 45 минути

Подготовка на Пуферски раствор pH 7.0

Измерете количина од 11,33 g K₂HPO₄ во 1000 ml одмерна тиквица, додадете 500 ml прочистена вода, измешајте за да се заврши растворањето и додадете вода до марката.

Мешавина на Ацетонитрил: Метанол: Пуфер pH = 7,0 во сооднос 5:45: 50, филтриран и дегазиран.

Хроматографски систем, HPLC Shimadzu Nexera, DAD

Колона: LiChrospher RP-Select B, 125 x 4.6mm, 5 μm, Merck

Проток: 1,0 ml / min

λ = 239 nm

Волумен на инјектирање: 20 μl

Температура: 50°C

Вромазепам 1.5mg

Прецизност на методот

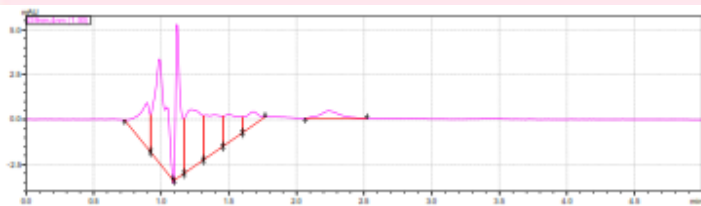
Репликации		1	2	3	4	5	6	Средна вредност
Серија. I-2015-1,5mg	Површина на пик	305891	304056	303984	300717	305619	304056	304054
	Растворливост %							
	SD (% растворливост)	93,05	92,49	92,47	91,48	92,97	92,49	92,49
	RSD (% растворливост)							0,5593
Серија. II-2015-1,5mg	Површина на пик	294675	300011	306690	291481	306163	300499	299920
	Растворливост %	89,64	91,26	93,3	89,67	93,13	91,41	91,40
	SD (% растворливост)							1,5945
	RSD (% растворливост)							1,7445
Серија. III-2015-1,5mg	Површина на пик	308165	302206	306872	293507	300259	306138	302858
	Растворливост %	93,74	91,93	93,35	89,28	91,34	93,13	92,13
	SD (% растворливост)							1,6653
	RSD (% растворливост)							1,8076

Конц. mg/ml		Добиена конц mg/ml	Аналитички принос %	Средна вредност на аналитички принос %
0,0018 (60%)	1	0,00181	100,55	100,92
	2	0,00182	101,11	
	3	0,00182	101,11	
0,0024 (80%)	1	0,00242	100,83	100,97
	2	0,00242	100,83	
	3	0,00243	101,25	
0,003 (100%)	1	0,0031	100,33	100,64
	2	0,0033	101,0	
	3	0,0032	100,60	
0,0036 (120%)	1	0,00361	100,27	100,45
	2	0,00362	100,55	
	3	0,00362	100,55	
0,0042 (140%)	1	0,00422	100,47	100,55
	2	0,00422	100,47	
	3	0,00423	100,71	

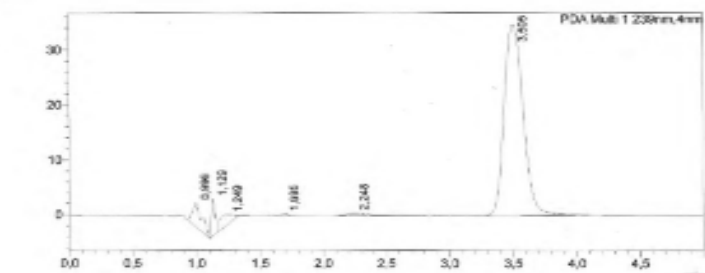
Точност на методот

Хроматограми на плацебо, стандарден раствор и тест раствор - линейарност и опсег

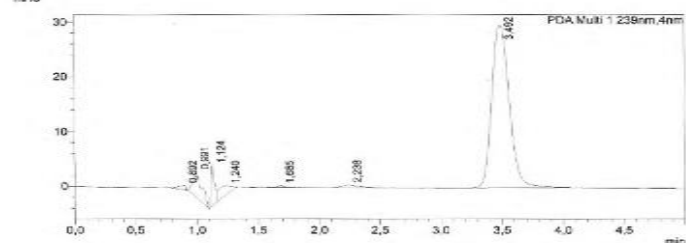
Bromazepam 1.5mg



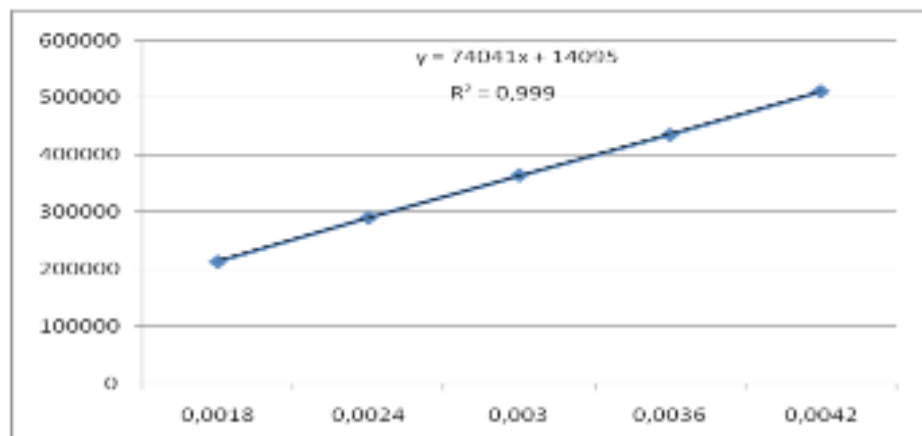
<Chromatogram>
mAU



<Chromatogram>
mAU



Репликации	Површина на пик				
	0,0018 mg/ml (60%)	0,0024 mg/ml (80%)	0,003 mg/ml (100%)	0,0036 mg/ml (120%)	0,0042 mg/ml (140%)
1	213831	291734	366088	435999	510178
2	214078	291056	362396	436345	511358
3	212839	288715	365164	433937	512445
Средна вредност	213583	290502	364549	435427	511327
RSD	0,307	0,545	0,527	0,299	0,222



Вромазепам 3mg

Прецизност на методот

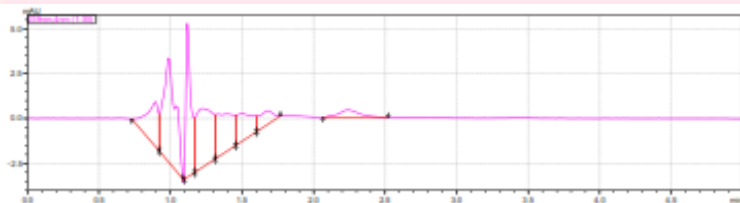
Репликации	1	2	3	4	5	6	Средна вредност	
Серија. I-2015-3mg	Површина на пик	603930	596719	616932	602274	6066558	621695	608018
	Растворливост %							97,695
	SD (% растворливост)	97,04	95,88	99,13	96,77	97,46	99,89	1,5173
	RSD (% растворливост)							1,5531
Серија. II-2015-3mg	Површина на пик	616708	619576	620549	616493	600194	599748	612211
	Растворливост %	99,09	99,55	99,71	99,06	96,44	96,37	98,36
	SD (% растворливост)							1,5386
	RSD (% растворливост)							1,5642
Серија. III-2015-3mg	Површина на пик	605801	597686	601981	616963	620163	606307	608150
	Растворливост %	97,34	96,03	96,72	99,13	99,65	97,42	97,71
	SD (% растворливост)							1,4002
	RSD (% растворливост)							1,4329

Конц. mg/ml		Добиени конц* mg/ml	Аналитички принос %	Средна вредност од аналитички принос %
0,0036 (60%)	1	0,00361	100,27	100,45
	2	0,00362	100,55	
	3	0,00362	100,55	
0,0048 (80%)	1	0,00482	100,41	100,48
	2	0,00482	100,41	
	3	0,00483	100,62	
0,006 (100%)	1	0,00601	100,16	100,33
	2	0,00603	100,5	
	3	0,00602	100,33	
0,0072 (120%)	1	0,00721	100,13	100,22
	2	0,00722	100,27	
	3	0,00722	100,27	
0,0084 (140%)	1	0,00842	100,23	100,27
	2	0,00842	100,23	
	3	0,00843	100,35	

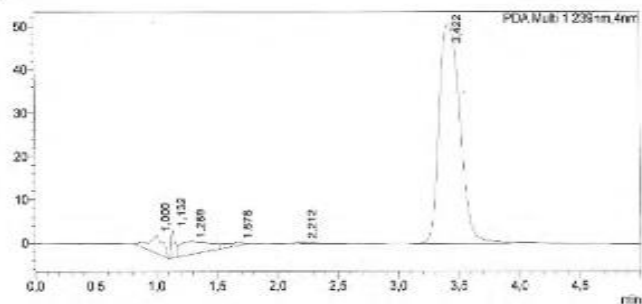
Точност на методот

Хроматограми на плацебо, стандарден раствор и тест раствор - линейарност и опсег

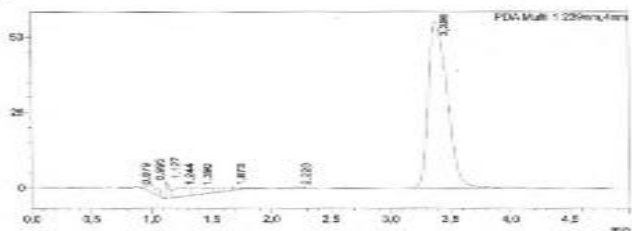
Bromazepat 3mg



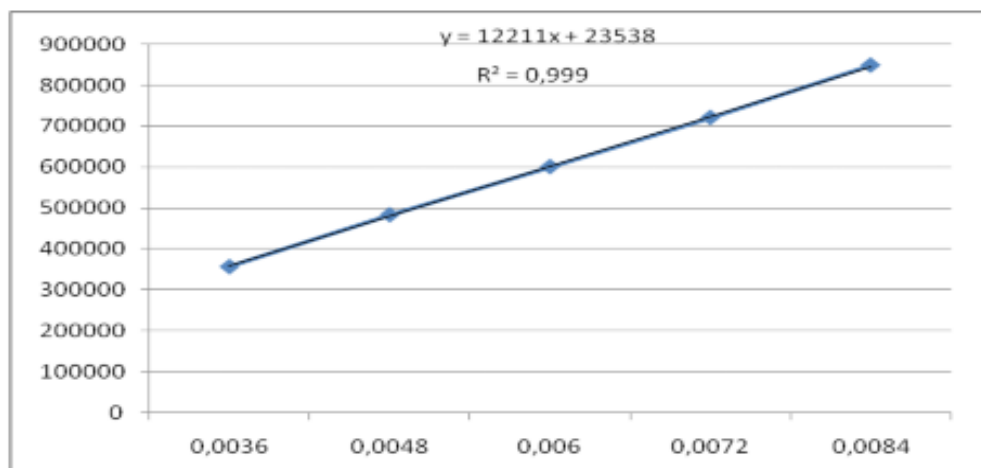
<Chromatogram>
mAU



<Chromatogram>
mAU



Репликации	Површина на пик				
	0,0036mg/ml (60%)	0,0048mg/ml (80%)	0,006mg/ml (100%)	0,0072mg/ml (120%)	0,0084mg/ml (140%)
1	356338	483104	600969	720542	845288
2	357090	482352	599320	720770	845859
3	355955	483318	601256	720295	853579
Средна вредност	356461	482925	600515	720536	848242
RSD	0,1619	0,1051	0,1739	0,0329	0,5459



Вромазепам 6mg

Прецизност на методот

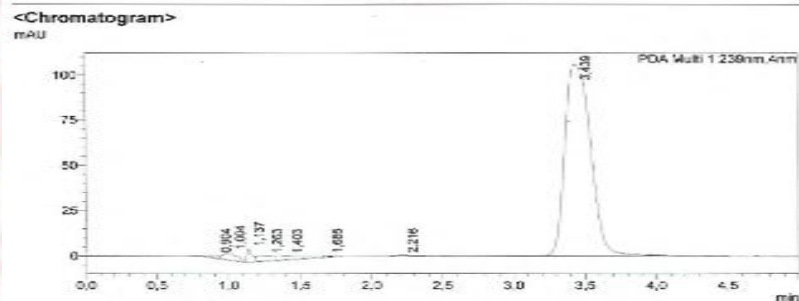
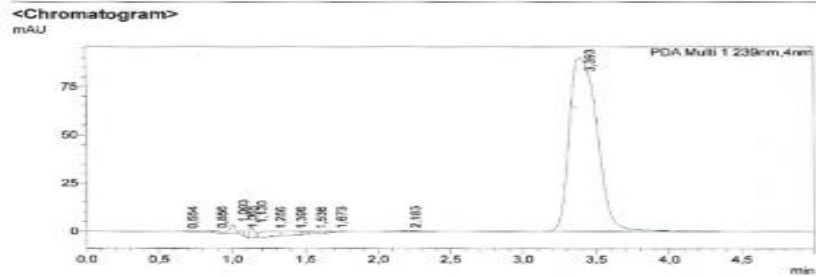
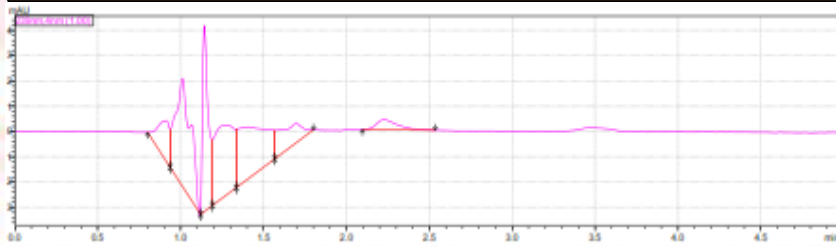
Репликации	1	2	3	4	5	6	Средна вредност	
Серија I-2015-6mg	Површина на пик	1325825	1285364	1331590	1326654	1279480	1319701	1311436
	Растворливост %	103,79	100,63	104,24	103,86	100,17	103,31	102,66
	SD (% растворливост)							1,7811
	RSD (% растворливост)							1,7349
Серија II-2015-6mg	Површина на пик	1269297	1321824	1311256	1316073	1275953	1329509	1303985
	Растворливост %	99,37	103,48	103,03	103,03	99,89	104,08	102,08
	SD (% растворливост)							1,9661
	RSD (% растворливост)							1,9260
Серија III-2015-6mg	Површина на пик	1322741	1316255	1322846	1290866	1340227	1284395	1312888
	Растворливост %	103,55	103,04	103,56	101,06	104,92	100,55	102,08
	SD (% растворливост)							1,6601
	RSD (% растворливост)							1,6262

Конц. mg/ml		Добиена конц. mg/ml	Аналитички принос %	Средна вредност од аналитички принос %
0,0072 (60%)	1	0,00721	100,13	100,50
	2	0,00725	100,69	
	3	0,00725	100,69	
0,0096 (80%)	1	0,00962	100,83	100,23
	2	0,00964	100,83	
	3	0,00961	101,25	
0,012 (100%)	1	0,0122	101,66	100,83
	2	0,0121	100,83	
	3	0,0120	100,00	
0,014 (120%)	1	0,0142	101,42	101,18
	2	0,0142	101,42	
	3	0,0141	100,71	
0,014 (140%)	1	0,0139	99,28	99,75
	2	0,0139	99,28	
	3	0,0141	100,71	

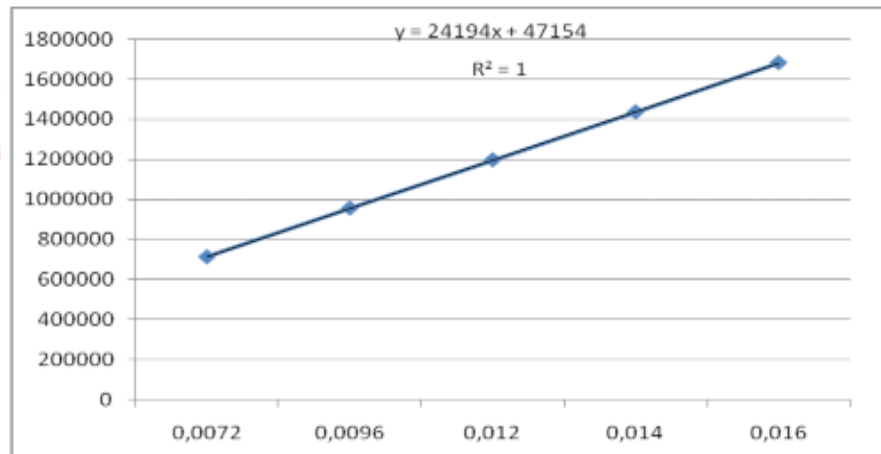
Точност на методот

Хроматограми на плацебо, стандарден раствор и тест раствор-линеарност и опсег

Bromazepam 6mg



Репликации	Површина на пик				
	0,0072mg/ml (60%)	0,0096mg/ml (80%)	0,012mg/ml (100%)	0,014mg/ml (120%)	0,016mg/ml (140%)
1	711194	956081	1196712	1435084	1683616
2	712650	956987	1198024	1437717	1683416
3	713248	956171	1198172	1437597	1681394
Средна вредност	712364	956413	1197636	1436799	1682809
RSD	0,148	0,0522	0,0671	0,1035	0,0731



Bromazepam 1.5 mg, 3mg, 6mg-споредба на валидациски параметри

Параметар	Тест	Резултати Bromazepam 1.5mg	Резултати Bromazepam 3mg	Резултати Bromazepam 6mg	Критериуми за прифаќање
Специфичност & соодветност на систем Слепа проба Раствор на плацебо	Интерференции	Нема интерференции	Нема интерференции	Нема интерференции	Не треба да има пик кој ќе интерферира со ретенционото време на површината на пикот на Bromazepam
	Интерференции	Нема интерференции	Нема интерференции	Нема интерференции	
Линеарност & Опсег	Фактор на корелација на Bromazepam R ²	0,999	0,999	1,0	0,995 – 1,0
	% RSD за површина на пик на Bromazepam	0.222 – 0.545	0.0329– 0.5459	0,0522-0,148	Не повеќе од 2,0%
Прецизност на метод	% RSD ослободен Bromazepam	0,6047-1,8076	1,4329-1,5642	1,6262-1,9260	Не повеќе од 2,0%
Точност на метод	% аналитички принос (recovery) на Bromazepam	100,45-100,97	100,22-100,48	99,75-101,18	Не повеќе од 98% Не повеќе од 102%
Робусност	%RSD на ослободен Bromazepam во mg/tablet	1,42 Аналитичар 1 0,89 Аналитичар 2	1,047 Аналитичар 1 0,779 Аналитичар 2	0,87 Аналитичар 1 0,68 Аналиичар 2	Не повеќе од 2,0%

Заклучоци

- Аналитичкиот метод кој се користеше за одредување на растворање на активната компонента во таблетите е во согласност со критериумите за прифаќање на ICH со што овој метод се смета за прифатлив.
- Резултатите од студијата за валидација покажуваат дека предложениот аналитички метод е брз, точен, прецизен и робусен и се користи за анализа на брзината на растворање на активната компонента во трите дозажни форми на Bromazepam таблети од 1.5mg, 3mg и 6mg.
- Оваа аналитичка постапка е релативно ефтина, едноставна и погодна за рутиниски анализи. Со намалувањето на времето на анализирање ја намаливме и потрошувачката на органските растворувачи со што се рационализира потрошувачката на реагенси во една лабораторија за контрола на квалитет.

**ВИ БЛАГОДАРАМ НА
ВНИМАНИЕТО**