

Стандартизация и валидация методики количественного определения действующего вещества и предельного содержания сопутствующих примесей в фармацевтической субстанции «Мелатонин»

М.В. Яцко*, В.И. Фадеев, А.А. Чиркин***

**Учреждение образования*

«Витебский государственный университет имени П.М. Машерова»

***ООО «Рубикон»*

Статья посвящена контролю качества и стандартизации лекарственной продукции для обеспечения населения эффективными и безопасными лекарственными средствами. Мелатонин, функцией которого может быть регуляция сна, представляет интерес для фармацевтического производства лекарственного средства, нормализующего циркадные ритмы организма человека.

Цель исследования – провести стандартизацию и валидацию фармацевтической субстанции «Мелатонин» по показателям количественного содержания N-[2-(5-метокси-1H-индол-3-ил)этил] ацетамида и предельного содержания сопутствующих примесей.

***Материал и методы.** Объектом исследования является фармацевтическая субстанция «Мелатонин» (производитель Alcon Biosciences Private Limited, Индия, серия ALC/MLT/120901).*

Изучение субстанции проводили: 1) на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Agilent 1200» со спектрофотометрическим детектором переменной длины волны и последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы обработки «ChemStation» для «Windows» и 2) на хроматографе «WATERS e2695» с диодно-матричным детектором Waters2998 с последующей обработкой результатов исследования с помощью программы обработки «Empower» для «Windows».

***Результаты и их обсуждение.** Разработана методика определения предельного содержания примесей, которая позволяет определять содержание примеси А (5-Methoxy indol-3-yl acetonitril) и примеси В (5-Methoxy Tryptamine) в субстанции «Мелатонин» в диапазоне концентраций 0,1 до 0,4 мкг/мл, что составляет 80–120% от предельно допустимого содержания примесей.*

***Заключение.** В результате проведенных исследований были разработаны и провалидированы в соответствии с ТКП 030-2013 (02040) методики количественного определения мелатонина и предельного содержания примесей в фармацевтической субстанции.*

***Ключевые слова:** стандартизация, валидация, мелатонин, количественное содержание, примеси.*

Standardization and Validation of the Method for Quantitative Identification of the Active Substance and Maximum Content of Impurities in the Pharmaceutical Substance of Melatonin

M.V. Yatsko*, W.I. Fadeev, A.A. Chirkin***

**Educational establishment «Vitebsk State P.M. Masherov University»*

***LLC «Rubicon»*

The article is devoted to quality control and standardization of medicinal products, to provide people with effective and safe drugs. Melatonin, the function of which may be regulation of sleep, it is of interest to the pharmaceutical industry drug which normalizes circadian rhythms of the human body.

***The purpose of the study** is to standardize and validate the pharmaceutical substance of Melatonin in terms of the quantitative content of N-[2-(5-methoxy-1H-indole-3-yl) ethyl] acetamide and maximum content of associated impurities.*

Material and methods. The object of the study is the pharmaceutical substance of Melatonin by the manufacturer Alcon Biosciences Private Limited, India, series ALC/MLT/120901.

The study of the substance was carried out: 1) on HPLC «Agilent 1200» with a spectrophotometric detector of variable wavelength and subsequent computer processing of the findings of the research using the processing «ChemStation» to «Windows» and 2) chromatograph «WATERS e2695» with diode array detector Waters2998 followed by treatment of the findings of the study using the processing «Empower» for «Windows».

Findings and their discussion. The technique to determine the maximum content of impurities, which allows to determine the impurity content of A (5-Methoxy indol-3-yl acetonitril) and impurity B (5-Methoxy Tryptamine) in the substance of Melatonin, concentrations within the range 0,1 to 0,4 mcg/ml that is 80–120% of the maximum permissible content of impurities, was worked out.

Conclusion. Methods of quantitative determination of Melatonin and maximum content of impurities in pharmaceutical substances were elaborated and validated in accordance with TAP 030-2013 (02040)

Key words: standardization, validation, Melatonin, quantitative content of impurities.

Мелатонин – основной гормон эпифиза (шишковидного тела мозга, пинеальной железы), описанный А. Лернером (Йельский университет) в 1958 году. В настоящее время мелатонин обнаружен в растениях, грибах, бактериях, одноклеточных организмах, а также у беспозвоночных и позвоночных животных. У человека он продуцируется главным образом эпифизом в ответ на сигнал зрительных рецепторов о наступлении темноты. Пик концентрации мелатонина приходится на середину ночи. Мелатонин участвует в регуляции эндокринной системы, поддержании кровяного давления и управляет периодичностью сна. Гормон регулирует сезонную ритмику у многих животных, замедляет процессы старения, усиливает эффективность функционирования иммунной системы, обладает антиоксидантными свойствами, влияет на процессы адаптации при смене часовых поясов [1–3].

На молекулярном уровне наиболее детально изучено влияние мелатонина на окислительные процессы. Сотрудниками кафедры биохимии БГУ в 2014 году было продемонстрировано влияние мелатонина и его производных на активность дыхательных комплексов митохондрий различных тканей [4]. Антиоксидантный эффект мелатонина был открыт американским ученым Расселом Рейтером в 1993 г. и подтвержден в многочисленных исследованиях, выполненных в разных лабораториях. Основная направленность антиоксидантного действия мелатонина – защита ядерной ДНК, протеинов и липидов. Защитное действие этого гормона может проявляться в любой клетке живого организма и в отношении всех клеточных структур. Механизм антиоксидантного действия мелатонина связан с его выраженной способностью нейтрализовать свободные радикалы, в том числе образующиеся при перекисном окислении липидов, а также с активацией в его присутствии глутатионпероксидазы – мощного эндогенного фактора ферментативной защиты от радикального окисления. рядом экспериментальных исследований доказано, что мелатонин обладает значительно большей

активностью в отношении нейтрализации агрессивного гидроксил-радикала по сравнению с глутатионом. При нейтрализации пероксильных радикалов мелатонин оказывается в 2 раза активнее токоферола [1–2].

Уникальные биологические эффекты мелатонина явились основанием для его применения в клинической практике. В настоящее время препараты «Мелатонин», «Вита-мелатонин», «Мелаксен», «Циркадин» нашли широкое применение для лечения нарушений сна, различных соматических заболеваний с целью уменьшения проявлений окислительного стресса, для борьбы с опухолевой трансформацией клеток, в спортивной медицине и др. [5–7].

В последние годы идет подготовка к выпуску отечественного препарата с действующей субстанцией – мелатонин. Одним из важнейших этапов этого процесса является разработка способов стандартизации и валидации препарата по действующей субстанции и возможным примесям. В настоящее время описано много методов анализа мелатонина и его метаболитов (тонкослойная хроматография, радиоиммуноанализ, газовая хроматография с масс-спектрометрией, капиллярный электрофорез, жидкостная хроматография с масс-спектрометрией или жидкостная хроматография с электрохимическим или флуориметрическим детектированием, метод ядерного магнитного резонанса).

Важнейшим условием производства и реализации лекарственных средств является обеспечение качества в первую очередь за счет выполнения принципов и правил Надлежащей производственной практики ТКП 030-2013 (02040). Валидация является одним из основополагающих правил этого регламентирующего документа. Валидация методик испытаний – документированное подтверждение обоснованности выбора метода испытания для определения показателей и норм качества лекарственных средств, гарантия получения ожидаемых и воспроизводимых результатов, соответствующих поставленной цели. Валидация методик испытаний – одно из ос-

новых направлений научного обеспечения перехода отечественной фармацевтической промышленности на принципы ТКП 030-2013 (02040), обеспечивающего как защиту внутреннего рынка от некачественных лекарственных средств, так и повышение конкурентоспособности и экспортного потенциала республики [8].

Цель работы – провести стандартизацию и валидацию фармацевтической субстанции «Мелатонин» по показателям количественного содержания N-[2-(5-метокси-1H-индол-3-ил)этил]ацетамида и предельного содержания сопутствующих примесей.

Материал и методы. Объектом исследования является фармацевтическая субстанция «Мелатонин» (производитель Alcon Biosciences Private Limited, Индия, серия ALC/MLT/120901).

Мелатонин содержит не менее 98,5% и не более 102,0% N-[2-(5-метокси-1H-индол-3-ил)этил]ацетамида в пересчете на сухое вещество.

Изучение субстанции проводили: 1) на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Agilent 1200» со спектрофотометрическим детектором переменной длины волны и последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы обработки «ChemStation» для «Windows» и 2) на хроматографе «WATERS e2695» с диодно-матричным детектором Waters 2998 с последующей обработкой результатов исследования с помощью программы обработки «Empower» для «Windows».

Результаты и их обсуждение. Для достижения поставленной цели был проведен анализ методик определения мелатонина в различных объектах природного и синтетического происхождения. Оказалось, что для валидации отечественного препарата необходимо разработать специальные методики количественного определения основного фармацевтического ингредиента и сопутствующих примесей в субстанции «Мелатонин», произведенной Alcon Biosciences Private Limited (Индия, серия ALC/MLT/120901). Выбор метода анализа основывался как на изучении литературных источников, так и возможностях аналитической базы лаборатории ВГУ имени П.М. Машерова и ООО «Рубикон».

Поскольку аналитическая матрица субстанции не является такой сложной, как плазма крови или экстракты растений, в которых присутствуют дополнительные компоненты, не было необходимости использовать высокоселективные методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрией или ка-

пиллярного электрофореза. Необходимо было создать экспрессную, недорогую методику для серийного анализа. В основу были положены методы высокоэффективной хроматографии и газожидкостной хроматографии. После предварительных экспериментов было отдано предпочтение методу ВЭЖХ как универсальному и доступному на аналитических базах.

В результате проведенных исследований были разработаны и провалидированы в соответствии с ТКП 030-2013 (02040) методики количественного определения мелатонина и предельного содержания примесей в фармацевтической субстанции.

Условия хроматографирования для методики испытания (МИ) количественного определения:

- колонна длиной 0,25 м и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р с размером частиц 5 мкм (Dr. Maisch GmbH Reprospher C18-DE);
- температура колонны 30⁰С;
- подвижная фаза: ацетонитрил Р1: метанол Р2: фосфатный буфер рН 2,3 в объемных соотношениях 80:105:315;
- скорость потока 1,0 мл/мин;
- спектрофотометрический детектор, длина волны 278 нм;
- объем вводимой пробы: 20 мкл;
- время хроматографирования: 2-кратное время удерживания мелатонина.

Пример хроматограммы при исследовании раствора субстанции «Мелатонин» представлен на рис. 1.

На основе валидации методики количественного определения установлено, что методика избирательна, линейна, правильна, прецизионна и имеет диапазон применения от 70 до 130%.

На основе валидации показано, что методика испытания обладает следующими характеристиками: погрешность метода составляет 0,62% в диапазоне 80–120% и 0,1% в диапазоне 70–130% (табл. 1).

Условия хроматографирования для методики испытания предельного содержания сопутствующих примесей:

- колонна длиной 0,25 м и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р с размером частиц 5 мкм (Dr. Maisch GmbH Reprospher C18-DE);
- температура колонны 30⁰С;
- подвижная фаза: ацетонитрил Р1: метанол Р2: фосфатный буфер рН 2,3 в объемных соотношениях 70:95:335;

- скорость потока 1,0 мл/мин;
- спектрофотометрический детектор, длина волны 223 нм;
- объем вводимой пробы: 20 мкл;
- время хроматографирования: 2-кратное время удерживания мелатонина;
- относительное удерживание по отношению к мелатонину (время удерживания мелатонина – около 15 мин): примесь А – около 1,8; примесь В – около 0,37 (рис. 2).

На основе валидации установлено, что методика определения предельного содержания сопутствующих примесей мелатонина обладает следующими характеристиками: линейностью в диапазоне от 0,1 до 0,4 мкг/мл, что составляет 80–120% от предельно допустимого содержания примесей, избирательностью и пределом обнаружения, составляющего 0,1% от концентрации мелатонина в испытуемом растворе (табл. 2).

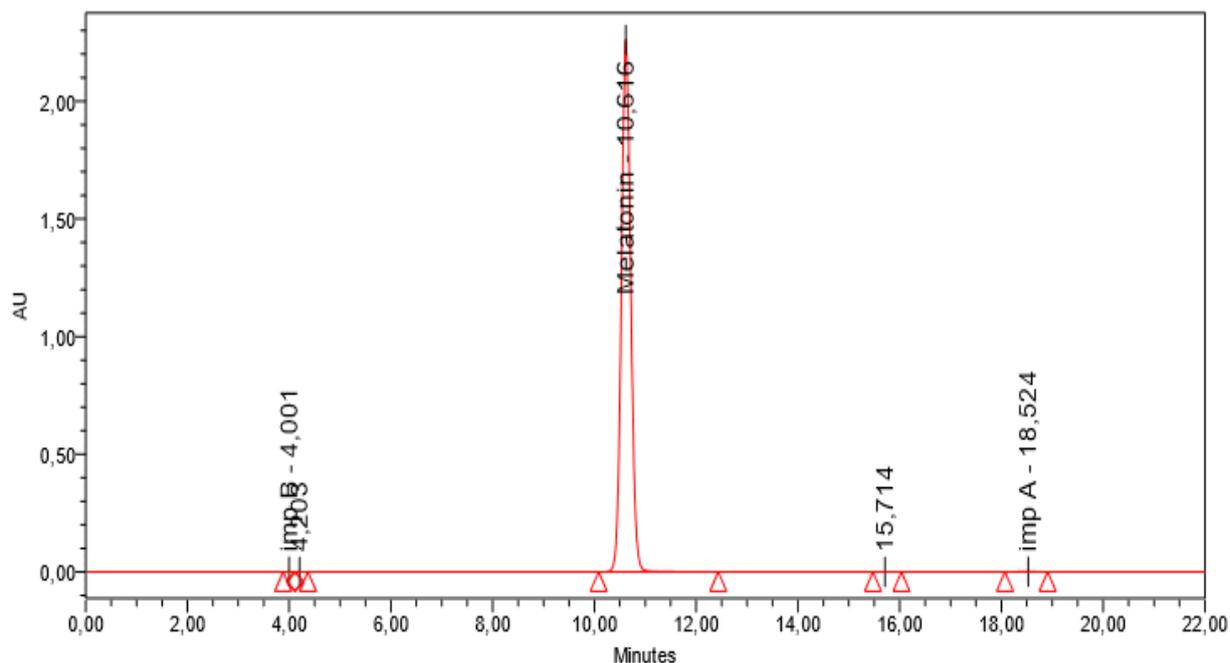


Рис. 1. Типовая хроматограмма испытуемого раствора мелатонина.

Таблица 1

Критерии приемлемости и результаты валидации количественного определения действующего вещества в фармацевтической субстанции «Мелатонин»

Критерий приемлемости	Результаты
Коэффициент корреляции R должен быть не менее 0,999	0,9996
Пересечение с осью Y (не более 2,0% отклика номинальной концентрации)	0,26%
Относительное стандартное отклонение (RSD) при оценке повторяемости должно быть для 6 определений не более 2,0%	0,62%
Относительное стандартное отклонение (RSD) при оценке внутрилабораторной прецизионности для 12 определений, выполненных двумя химиками за 2 дня, должно быть не более 3,0%	0,49%
Средний процент восстановления, полученный при анализе растворов с содержанием активного вещества 70%, 100% и 130%, скорректированный на 100%, должен находиться в пределах от 99,0% до 101,0%	100,1%

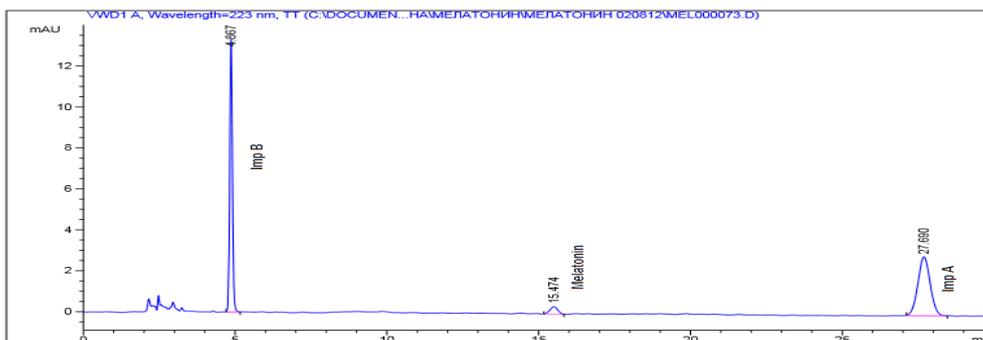


Рис. 2. Типовая хроматограмма модельной смеси мелатонина и его примесей.

Таблица 2

Критерии приемлемости и результаты валидации содержания сопутствующих примесей в фармацевтической субстанции «Мелатонин»

Критерий приемлемости	Результаты
Коэффициент корреляции R должен быть не менее 0,99	Мелатонин – 0,9998 Примесь А – 0,9999 Примесь В – 1,0000
Пересечение с осью Y (не более 5,0% отклика номинальной концентрации)	Мелатонин – 2,93% Примесь А – 0,26% Примесь В – 0,08%
Предел обнаружения должен составлять не более 0,15% от концентрации мелатонина в испытуемом растворе	0,1%

Заключение. Результаты проведенной валидации подтверждают возможность использования разработанных методик в нормативном документе по стандартизации. Методика количественного определения позволяет верифицировать N-[2-(5-метокси-1H-индол-3-ил)этил] ацетамид с погрешностью метода 0,62% в диапазоне 80–120%. Методика определения предельного содержания примесей позволяет выявить содержание примеси А (5-Methoxy indol-3-yl acetonitril) и примеси В (5-Methoxy Tryptamine) в субстанции «Мелатонин» в диапазоне концентраций 0,1 до 0,4 мкг/мл, что составляет 80–120% от предельно допустимого содержания примесей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов, В.Н. Мелатонин – роль в организме, применение в клинике / В.Н. Анисимов. – СПб.: «Система», 2007. – 40 с.
2. Anisimov, V.N. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen / V.N. Anisimov [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – Vol. 1757. – P. 573–589.
3. Arendt, J. Shift work: coping with the biological clock / J. Arendt // Occup. Med (London). – 2010. – Vol. 60, № 1. – P. 10–20.
4. Кузнецова, Е.И. Влияние мелатонина и его производных на активность дыхательных комплексов митохондрий различных органов крыс *in vitro* / Е.И. Кузнецова, И.В. Семак // Новости медико-биологических наук. – 2014. – Т. 9, № 1. – С. 38–42.
5. Souza, A.V. Melatonin biological activity and binding sites in human melanoma cells / A.V. Souza, M.A. Viscont, A.M. Castrucc // J. Pineal. Res. – 2003. – Vol. 34, № 4. – P. 242–248.

6. Kim, T.K. Metabolism of melatonin and biological activity of intermediates of melatonergic pathway in human skin cell / T.K. Kim [et al.] // FASEB J. – 2013. – Vol. 27, № 7. – P. 2742–2755.
7. Timoty, C. The biological effects and clinical uses of the pineal hormone melatonin / C. Timothy, N.D. Birdsall // Alt. Med. Rev. – 1996. – Vol. 1, № 2. – P. 94–102.
8. Технический кодекс установившейся практики ТКП 468-2012 (02041) «Валидация методик испытаний». – Введ. 1.06.2013. – Минск: Мин-во здравоохранения Респ. Беларусь, 2013. – 32 с.

REFERENCES

1. Anisimov V.N. *Melatonin – rol v organizme, primeneniye v klinike* [Melatonin – Role in the Body, Clinical Application], SPb: «Systema», 2007, 40 p.
2. Anisimov, V.N. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen / V.N. Anisimov [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2006. – Vol. 1757. – P. 573–589.
3. Arendt, J. Shift work: coping with the biological clock / J. Arendt // Occup. Med (London). – 2010. – Vol. 60, № 1. – P. 10–20.
4. Kuznetsova E.I., Semak I.V. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk* [News of Medical and Biological Sciences], 2014, 9(1), pp. 38–42.
5. Souza, A.V. Melatonin biological activity and binding sites in human melanoma cells / A.V. Souza, M.A. Viscont, A.M. Castrucc // J. Pineal. Res. – 2003. – Vol. 34, № 4. – P. 242–248.
6. Kim, T.K. Metabolism of melatonin and biological activity of intermediates of melatonergic pathway in human skin cell / T.K. Kim [et al.] // FASEB J. – 2013. – Vol. 27, № 7. – P. 2742–2755.
7. Timoty, C. The biological effects and clinical uses of the pineal hormone melatonin / C. Timothy, N.D. Birdsall // Alt. Med. Rev. – 1996. – Vol. 1, № 2. – P. 94–102.
8. *Tekhnicheskii kodeks ustanovivsheisia praktiki TKP 468-2012 (02041) «Validatsiya metodik ispitaniy»*. [Technical Code of Established Practice of TKP 468-2012 (02041) «Validation of Test Methods» – Introduced 1.06.2013], Minsk: Ministry of Health of the Republic of Belarus, 2013, 32 p.

Поступила в редакцию 04.06.2014. Принята в печать 18.08.2014
Адрес для корреспонденции: e-mail: chir@tut.by – Чиркин А.А.