

**ВАЛИДАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК
ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИНСУЛИНА НА ПРЕПАРАТ «ЖУСЛИН»**

Абдулхакимов Эгамберди Абдураким ўғли

магистрант 1-курса, кафедра «Химия и химическая технология
Ферганский политехнический институт»

Научный руководитель: Мирсалимова Саодат Рахматжановна

к.х.н., доцент, профессор кафедра «Химия и химическая технология,
Ферганский политехнический институт»

Научный руководитель: Ортикова София Саидмамбиевна

д.т.н. (PhD), доцент, кафедра «Химия и химическая технология,
Ферганский политехнический институт»

АННОТАЦИЯ

Эта статья о валидации аналитических методик идентификации и количественное определение человеческого инсулина на препарат «инсулин смешанно для инъекции 100 ме/мл»

Ключевые слова: жуслин, методом ВЭЖХ, ЕФ 2.2.29, хроматограмме, сорбент – L1, A21-дезамидоинсулина,

ABSTRACT

This article is about validation of analytical methods for identification and quantitative determination of human insulin for the preparation “insulin mixed for injection 100 iu/ml”

Key words:

Данный раздел содержит результаты валидации аналитических методик идентификации и количественное определение человеческого инсулина на препарат «инсулин смешанного для инъекции 100 МЕ/мл», методом ВЭЖХ согласно ЕФ 2.2.29. Назначение методики

количественное определение человеческого инсулина – гарантировать корректное определение количественного содержания и достоверную идентификацию человеческого инсулина в препарате.

Препарат имеет следующий состав (1 мл содержит):

Компонент	Количество/мл
Человеческий инсулин (инсулин рДНК)	100 МЕ
Метакрезол	1,6 мг
Фенол	0,73 мг
Глицерин	16,0 мг
Протамина сульфат	0,241 мг
Гидрофосфат натрия	3,78 мг
Хлоридная кислота (37 %)	0,001156 мл
Гидроксид натрия (10 %)	По требованию
Оксид цинк	27 мкг
Вода для инъекции	По требованию до 1 мл

Методика определения

Идентификация (подлинность инсулина).

Определение проводят методом ВЭЖХ в соответствии с требованиями ЕФ 2.2.29.

Расположение пика инсулина на хроматограмме испытуемого раствора, соответствует расположению основного пика на хроматограмме соответствующего стандартного раствора.

Количественное определение

Инсулин-жуслин

Норма: от 90,0 до 110,0 МЕ/мл

Метод: ВЭЖХ

Подвижная фаза



(A) 28,4 г. безводного натрия сульфата растворить в 1000 мл очищенной воде и перемешать с 2,7 мл фосфорной кислотой и при необходимости довести pH раствора этаноламином или фосфорной кислотой до 2,3.

(B) 550 мл полученного раствора смешать с 450 мл ацетонитрилом в соотношении 55:45 предварительно подогреть раствор более 20°C. Фильтровать и дегазировать раствор фильтром, пора которого не более 0,45 мкм.

Подвижную фазу приготовить через смешивания растворов (A) и (B) в соотношении 42:58 и сохранять раствор при температуре не менее 20°C.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы

Около 1,5 мг стандартного образца инсулина человеческого (USP RS) растворяют в 1,0 мл 0,01 М хлористоводородной кислоты. Раствор выдерживают при комнатной температуре не менее 3 дней для получения раствора, содержащего не менее 5 % A21-дезамидоинсулина.

Условия хроматографирования:

- Жидкостной хроматограф, оснащенный УФ-детектором (214 нм) и колонкой 4,6 мм x 15 см (сорбент – L1).
- Температура колонки: 40 °С.
- Скорость потока: 1 мл/мин.
- Объем введения: 20 мкл.

Стандартный раствор

Около 15 мг (точная навеска) стандартного образца инсулина человеческого (RS) помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяют в 0,01М хлористоводородной кислоте и доводят объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивают.

Испытуемый раствор

На каждый миллилитр препарата прибавляют по 2,5 мкл 9,6 М раствора кислоты хлористоводородной, перемешивают. 2,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 5 мл, доводят объем раствора 0,01 М хлористоводородной кислотой до метки, перемешивают.

Примечание. Испытуемый и стандартные растворы, раствор для проверки пригодности хроматографической системы хранят не более 12 ч при комнатной температуре и не более 48 ч в холодильнике.

Проверка пригодности хроматографической системы

Производят 5 повторных инъекций по 20 мкл стандартного раствора в



колонку хроматографа и регистрируют хроматограммы.

Относительное стандартное отклонение площади пика инсулина при повторных инъекциях должно быть не более 1,6 %.

В колонку хроматографа вводят 20 мкл раствора для проверки пригодности хроматографической системы, регистрируют хроматограмму.

Разрешение между пиками инсулина и А21-дезамидоинсулина должно быть не менее 2,0. Фактор асимметрии пика инсулина должен быть не более 1,8.

Методика

Вводят в хроматограф по 20 мкл испытуемого раствора и стандартного раствора. Регистрируют хроматограммы и рассчитывают площади пиков инсулина и А21-дезамидоинсулина.

Рассчитывают содержание инсулина в 1 мл препарата в МЕ (X) по формуле:

$$X = \frac{\sum r_u \times m_s \times p \times 5}{\sum r_s \times 10 \times V},$$

где m_s – навеска стандартного образца инсулина, мг;

p – содержание МЕ в 1 мг стандартного образца;

V – объем препарата, мл;

$\sum r_u$ и $\sum r_s$ – суммы площадей пиков инсулина и А21-дезамидированного инсулина на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов, соответственно.

Специфичность

Проводили хроматографирование раствора бланк, стандартного раствора и испытуемого раствора (таблица 1).

Таблица 1

Результаты, полученные на ВЭЖХ УФ-детектором при длине волны 214 нм, объём инъекции 20 мкл

Образец	Время удерживания, мин	Площадь пика
	Инсулина	Инсулина
Бланк	-	Не обнаружен
Стандартный раствор	0,295	225,33
Испытуемый раствор (100%)	0,296	226,08

Линейность

Готовили и проводили анализ растворов препарата с концентрацией человеческого инсулина в интервале от 90 до 110%: 3 раствора с концентрацией 90%, 3 раствора с концентрацией 100%, 3 раствора с концентрацией 110% (таблица 2).

Таблица 2

Площади пиков хроматограммы, полученные при разной концентрации человеческого инсулина (1 мл/мин, темп. колонки 40 °С, DAD- 214 нм, объём инъекции 20 мкл)

№	Уровень концентрации, %	X (Найденная Концентрация, инсулина МЕ/мл)	Y (Площадь пика инсулина)
1	90	90,488	180,89627
2	90	90,535	181,05228
3	90	90,655	181,19605
4	95	95,208	190,40801
5	95	95,286	190,5963
6	95	95,375	190,68958
7	100	100,153	200,44055
8	100	100,054	200,10866
9	100	100,243	200,22318
10	105	105,112	210,11059
11	105	105,286	211,17258
12	105	105,215	211,13265
13	110	109,176	218,41279
14	110	109,103	218,38281
15	110	109,228	218,34968

Таблица 3

Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра
линейности для инсулина

Статистические характеристики	Результаты
Наклон, а	2.0127
Отрезок на оси ординат b:	- 1.1931
Коэффициент корреляции r.	0,9996

По полученным данным строили зависимость площади пиков от концентрации фенола в растворе (рис. 1).

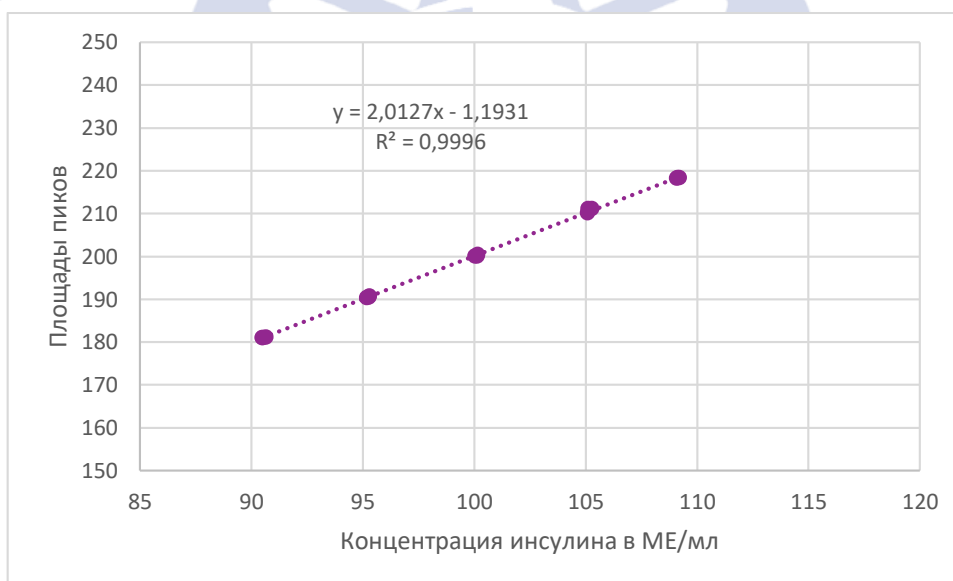


Рис. 1. График линейной зависимости площади пиков от концентрации инсулина.

Критерии оценки линейности: коэффициент корреляции $\geq 0,9968$

Сходимость

Для исследования готовили 6 растворов препарата при 100% концентрации инсулина. Анализ проводили для каждой пробы в разные дни, двумя химиками, с использованием разной мерной посуды. Результаты сходимости приведены в таблицах 4

Таблица 4



Результаты анализа, полученные химиком-1. Навеска РСО инсулина – 100,05 МЕ,
площадь пика раствора РСО инсулина – 200,0818
(1 мл/мин, темп. колонки 40 °С, DAD-214 нм, объем инъекции 20 мкл)

Номер пробы	Площадь пика инсулина	Определенное содержание инсулина, МЕ/мл	$X_i - X_{cp}$	$(X_i - X_{cp})^2$
1	200,06674	100,90	0,0250	0,000625
2	201,70792	100,86	0,0250	0,000625
3	201,86203	100,88	0,0050	0,000025
4	201,69598	100,86	0,0250	0,000625
5	201,99457	100,90	0,0150	0,000225
6	211,96410	100,90	0,0150	0,000225
ср		100,88		

Таблица 5

Результаты анализа, полученные химиком-2. Навеска РСО инсулина – 100,05 мг, площадь пика раствора РСО инсулина – 200,0818
(1 мл/мин, темп. колонки 40 °С, DAD-214 нм, объем инъекции 20 мкл)

Номер пробы	Площадь пика инсулина	Определенное содержание инсулина, ме/мл	$X_i - X_{cp}$	$(X_i - X_{cp})^2$
1	200,06674	100,80	0,0250	0,000626
2	201,50792	100,81	0,0249	0,000625
3	201,46203	100,78	0,0050	0,000024
4	201,29598	100,77	0,0248	0,000623
5	201,29457	100,76	0,0150	0,000225
6	211,66410	100,81	0,0148	0,000225
ср		100,78		

Проводили статистическую обработку полученных данных ткр, рассчитывали единое стандартное отклонение и относительный доверительный интервал (таблица 6).

Таблица 6

Расчеты, после статистической обработки результатов параметра сходимости, полученные химиками 1 и 2

(1 мл/мин, темп. колонки 40 °С, DAD-214 нм, объем инъекции 20 мкл)



Статистические характеристики, %	Результаты	
	Химика-1	Химика-2
	инсулин	инсулин
Наименьшее значение, ме/мл	100,86	100,76
Наибольшее значение, ме/мл	100,90	100,81
Среднее значение	100,88	100,78
Стандартное отклонение	0,0223	0,0316
Коэффициент вариации	0,022	0,032
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)	99,85	99,78
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)	100,15	100,22
$t_{кр}(5\%; 10) 2,228$	1,9555	
$F(5\%; 5; 5) 5,05$	0,2187	

Критерии оценки сходимости и промежуточной прецизионности: коэффициент вариации $\leq 1,5\%$ ($n \geq 6$), доверительный интервал $F(5\%, 5, 5): \leq 5,05$, $t(5\%, 10): \leq 2,228$.

Правильность

Готовили и проводили измерения испытуемых растворов с концентрацией инсулина в интервале от 90 до 110%: 3 раствора с концентрацией 90%, 3 раствора с концентрацией 95%, 3 раствора с концентрацией 100%, 3 раствора с концентрацией 105% и 3 раствора с концентрацией 110%. Результаты валидации по параметрам правильности приведены в таблице 5.4.10 и 5.4.11. Навеска РСО инсулина – 100,17 мг, площадь пика раствора РСО инсулина – 200,07943.

Таблица 7

Полученные данные по параметрам правильности валидации для инсулина
(1 мл/мин, темп. колонки 40 °С, DAD-214 нм, объем инъекции 20 мкл)

Уровень концентрации, %	Концентрация инсулина, ме/мл	Площадь пика	Отклонение, %
90	90,585	181,17405	0,13
90	90,584	181,17128	0,01

90	90,581	181,16680	-2,33
95	95,661	191,32279	-0,72
95	95,662	191,32819	-0,76
95	95,461	191,31195	-0,72
100	100,129	200,25596	-0,82
100	100,219	200,21785	-0,67
100	100,029	200,19014	-0,70
105	105,209	210,41802	-0,75
105	105,192	210,40485	-0,70
105	105,529	210,42218	-0,74
110	110,274	220,56424	-0,71
110	110,370	220,68132	-0,77
110	110,179	220,35724	-0,71

Таблица 8

Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра
правильности

Статистические характеристики, %	Результаты
	инсулина
Среднее значение	100,377
Стандартное отклонение	0,524
Коэффициент вариации	0,288
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)	99,71
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)	100,412

Критерии оценки правильности: коэффициент вариации $\leq 2,0\%$, фактор отклика – среднее значение от 100,377% до 100,412 %.

Все результаты проверки пригодности ВЭЖХ системы при проведении валидации методики количественного определения соответствуют выбранным критериям. При рутинном анализе требования к неопределенности анализа с вероятностью 95 % для методики количественного определения будут выполняться как максимум для 3-х параллельных анализов.

Заклучение

В результате проведения валидации было экспериментально доказано, что данная аналитическая методика характеризуется необходимой специфичностью, робастностью, линейностью, правильностью, прецизионностью в диапазоне использования методики (от 90 % до 110 % от номинального содержания) при количественном определении, а также может гарантировать достоверную идентификацию действующих веществ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хамдамова Шохида Шерзодовна, & Мирзаев Навруз Абдуллаевич (2020). Взаимодействие компонентов в системе $Mg(ClO_3)_2 - n(C_2H_4OH)_3 - H_2O$. *Universum: химия и биология*, (1 (67)), 26-31.
2. Ergashev Dilmurod, Mirzayev Navruzbek, & Ergashev Oybek (2022). The effect of efficient development developments on efficiency. *Universum: технические науки*, (12-7 (105)), 49-53.
3. Abdugaffor M. Khurmamatov, Navruzbek A. Mirzayev, & Farxod A. Ibragimov. (2023). Results of optimizing the process of cleaning air from solid particles. *International Journal of Advance Scientific Research*, 3(06), 217–225. <https://doi.org/10.37547/ijasr-03-06-38>

Research Science and
Innovation House

