

Рекомендована д. фармац. наук, проф. С. О. Васюк

УДК 615.28:54.062

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ В ОРАЛЬНІЙ СУСПЕНЗІЇ «БІ-ТОЛ»

© А. В. Глущенко, А. М. Шекель, І. А. Вишневський, В. А. Георгіянц

Національний фармацевтичний університет, Харків

ТОВ ДКП «Фармацевтична фабрика», Житомир

Резюме: розроблено та валідовано аналітичну методику кількісного визначення триметоприму і сульфаметоксазолу разом в одній пробі методом рідинної хроматографії.

Ключові слова: валідація, рідинна хроматографія, триметоприм, сульфаметоксазол.

Вступ. Бісептол (бактрим) з'явився на фармацевтичному ринку як один з перших комбінованих антимікробних препаратів. Для зручності вживання у дітей та підвищення біодоступності розроблено оральну суспензію, яку випускають на ТОВ ДКП «Фармацевтична фабрика», м. Житомир під назвою «Бі-тол». Для реалізації вимог чинного законодавства щодо введення до ДФУ монографій на готові лікарські форми промислового виробництва необхідно розробити та валідувати методики контролю їх якості, зокрема кількісне визначення, що характеризує дотримання умов технологічного процесу при їх виготовленні.

Лікарська форма містить дві діючі речовини – сульфаметоксазол та триметоприм. Відповідно до методик аналізу діючих субстанцій «Бісептолу», ДФУ, як й інші фармакопеї, зокрема, Європейська, Британська пропонують визначати триметоприм потенціометричним кислотно-основним титруванням, сульфаметоксазол – нітритометричним із визначенням точки еквівалентності електрометричними методами [1, 2, 3]. Для даної лікарської форми бажано розробити методику, яка дозволяла б визначати вміст діючих речовин в одній пробі. В літературі описано декілька методик кількісного визначення обох компонентів у суміші. Наприклад, на основі спектра поглинання суміші, що містить три максимуми за довжин хвиль 285, 295 та 330 нм, розроблено спектрофлуорометричний метод [4]; вченими [5] запропоновано метод капілярного електрофорезу. Деякі літературні джерела пропонують визначення основних інгредієнтів методом абсорбційної спектрофотометрії [6, 7]. І, звичайно, надійним інструментом одночасного та об'єктивного визначення обох компонентів у суміші без попереднього їх розділення є рідинна хроматографія [8–10]. За методикою Фармакопеї США [11], заплановано розробку та

валідацію аналітичної методики кількісного визначення триметоприму і сульфаметоксазолу разом в одній пробі методом рідинної хроматографії.

Методи дослідження. Як досліджуваний препарат використовували суспензію оральну «Бі-тол», 200 мг/40 мг у 5 мл по 100 г у флаконі або банці з дозуючою скляночкою в пачці, виробництва ТОВ ДКП «Фармацевтична фабрика», м. Житомир, Україна.

Визначення проведено методом рідинної хроматографії відповідно до умов ДФУ (2.2.29^н). Дослідження проведено на рідинному хроматографі з УФ-детектором. Використано колонку Zorbax SB-C18 розміром 4,6 мм × 150 мм, заповнену силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р, з розміром часток 5 мкм. Рухома фаза складається з 1400 мл води для хроматографії Р, 400 мл ацетонітрилу для хроматографії Р і 2 мл тріетиламіну. Розчин залишали при кімнатній температурі для встановлення рівноваги. Доводили рН до 5,9±0,1 0,1 М розчином натрію гідроксиду Р або розведеною оцтовою кислотою льодяною Р (1:100). Доведено водою для хроматографії Р до 2000 мл, відфільтроване. Швидкість потоку рухомої фази 2 мл/хв; детектування проводилось за довжини хвилі 254 нм.

Досліджуваний розчин. До 2,30 г суспензії у мірній колбі ємністю 50 мл додано 25 мл метанолу Р і перемішано до повного розчинення препарату. Об'єм розчину доведено до мітки тим самим розчинником. Центрифуговано протягом 5 хв при 3000 об/хв. Відфільтровано через мембранний фільтр 0,45 мкм (Millipore HVLP або аналогічний). 1 мл зібраного фільтрату перенесено в мірну колбу ємністю 10 мл, за допомогою рухомої фази доведено до мітки.

Розчин порівняння. До 160 мг РСЗ сульфаметоксазолу і 32 мг РСЗ триметоприму додано 60 мл метанолу Р, перемішано до повного роз-

чинення. Об'єм розчину доведено тим самим розчинником до 100 мл. 1 мл одержаного розчину перенесено у мірну колбу ємністю 10 мл, об'єм доведено до мітки рухомою фазою.

Результати й обговорення. Попеременно хроматографовано по 20 мкл досліджуваного розчину і розчину порівняння. Отримано 5 хроматограм для кожного з розчинів.

Хроматографічну систему вважають придатною, якщо відносне стандартне відхилення площ піку триметоприму (сульфаметоксазолу) для п'яти повторних введень розчину порівняння не перевищує 2 %.

Вміст триметоприму (X_1) і сульфаметоксазолу (X_2) в 1 мл препарату, в мг, розраховано за формулою:

$$X_{1,2} = \frac{S_1 \times m_0 \times 1 \times 50 \times 10 \times \rho \times P}{S_0 \times 100 \times 10 \times 1 \times m_1 \times 100} = \frac{S_1 \times m_0 \times \rho \times P}{S_0 \times m_1 \times 200},$$

де S_1 – середнє значення площі піку триметоприму (сульфаметоксазолу) на хроматограмі досліджуваного розчину;

S_0 – середнє значення площі піку триметоприму (сульфаметоксазолу) на хроматограмі розчину порівняння;

m_0 – маса наважки РСЗ триметоприму (РСЗ сульфаметоксазолу), в мг;

m_1 – маса наважки препарату, в г;

c – відносна густина препарату, в г/см³;

P – вміст основної речовини в РСЗ триметоприму (РСЗ сульфаметоксазолу), у %.

Валідацію методик здійснено відповідно до вимог ДФУ.

Прогноз невизначеності пробопідготовки розраховано на основі загальних вимог ДФУ до лабораторного обладнання. Невизначеність при приготуванні досліджуваного розчину становить 0,79 %, розчину порівняння сульфаметоксазолу – 0,81 %, розчину порівняння триметоприму – 1,01 %.

Сумарні невизначеності з урахуванням максимально допустимого відхилення площ піків на хроматограмах не більше 2 % при кількісному визначенні сульфаметоксазолу – 2,30 %, триметоприму – 2,38 %.

Максимально допустима похибка вимірювань при інтервалі 10 % становить 3,2 %. Отже, розрахована невизначеність пробопідготовки і аналізу в цілому мають забезпечити достатню точність вимірювань.

Специфічність методики підтверджено порівнянням хроматограм стандартного, досліджуваного розчинів і досліджуваного розчину плацебо (рис. 1). Час утримування сульфаметоксазолу та триметоприму на хроматограмах досліджуваного розчину відповідають часу утримування відповідних піків на хроматограмах розчину порівняння (близько 5,4 хв для сульфаметоксазолу та близько 2,1 хв для триметоприму).

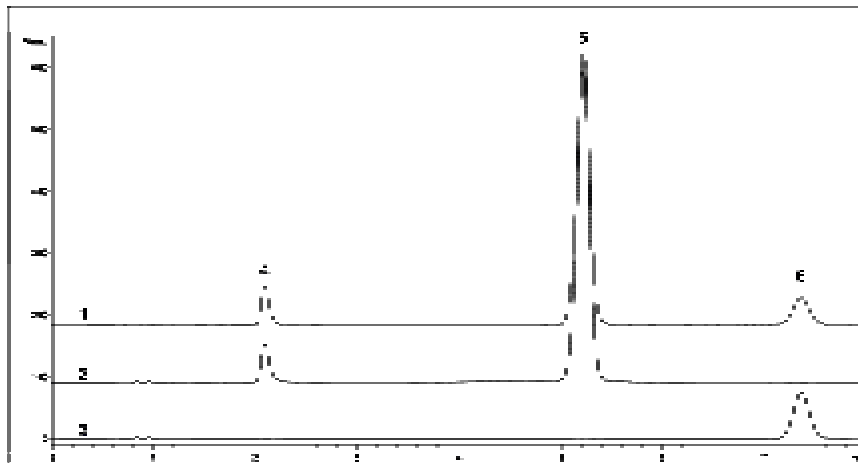


Рис. 1. Хроматограма компонентів препарату, де 1 – досліджуваний розчин, 2 – розчин порівняння, 3 – плацебо, 4 – триметоприм, 5 – сульфаметоксазол, 6 – плацебо.

На хроматограмах плацебо не виявлено піків, вищих за шум базової лінії, час утримування яких збігався б з часом утримування аналізованих речовин.

Для дослідження лінійності використано п'ять розчинів стандартних зразків діючих речовин з відомою концентрацією в діапазоні концентрацій від 80 до 120 % від номінального вмісту в препараті.

Розрахунки вели в нормалізованих координатах. Отримані результати (табл. 1) проаналізовано методом лінійної регресії (табл. 2). Графік та рівняння лінійної регресії наведено на рисунку 2.

Правильність методики оцінювали на діапазоні застосування методики (з концентраціями 80 %, 100 %, 120 % від номінальної).

Відповідно до ДФУ розраховано такі критерії: критерій статистичної незначущості $\delta\%$ (для пра-

Таблиця 1. Залежність площі піків від концентрації діючих речовин

Рівень, %	Площа	Середня площа	RSD, %	Площа, % до номінальн.	Площа	Середня площа	RSD, %	Площа, % до номінальн.
	сульфаметоксазол				триметоприм			
80	3624.0	3625.7	0.40	79.85	285.3	287.1	0.71	79.56
	3641.0				289.3			
	3612.0				286.7			
90	4081.3	4072.6	0.26	89.70	320.7	321.0	0.41	88.96
	4075.9				319.9			
	4060.7				322.5			
100	4533.9	4540.4	0.13	100.00	359.7	360.9	0.30	100.00
	4542.7				361.8			
	4544.6				361.1			
110	5004.2	4990.9	0.27	109.92	395.1	395.4	0.81	109.58
	4991.3				392.4			
	4977.3				398.8			
120	5501.0	5491.7	0.21	120.95	432.9	434.4	0.38	120.38
	5495.4				436.2			
	5478.7				434.1			

Таблиця 2. Результати дослідження лінійності методики кількісного визначення сульфаметоксазолу і триметоприму

Критерій	Вимоги ДФУ	Сульфаметоксазол	Триметоприм
Кут нахилу		1.02	1.02
Перетинання	< 5.1	-2.34	-2.55
Коефіцієнт кореляції	> 0.99236	0.99981	0.99970

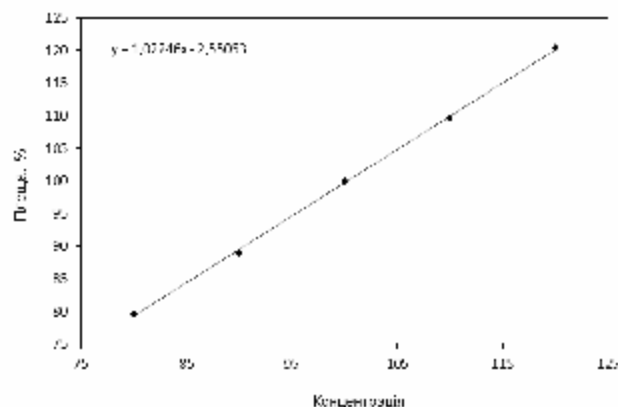
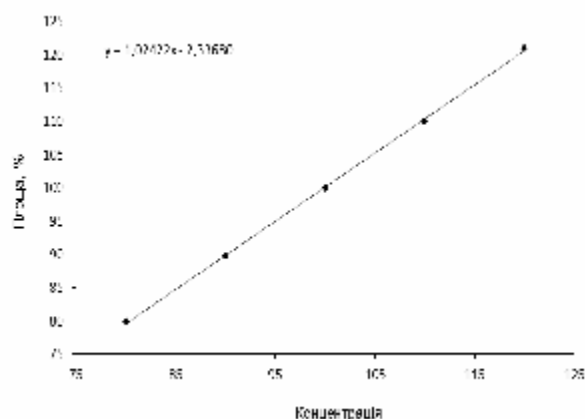


Рис. 2. Графіки залежності площі піків від концентрації сульфаметоксазолу та триметоприму.

вильності) і одnobічний довірчий інтервал Δ_z (для прецизійності) (табл. 3). Знайдені критерії відповідають вимогам ДФУ.

Робастність методики продемонстровано на стабільності досліджуваного розчину, розчину порівняння та стійкості методики до змін хроматографічної системи.

Стабільність розчину вивчена на порівнянні концентрацій досліджуваного розчину з використанням одного і того ж стандартного розчину протягом 2 діб. Дослідження підтвердили, що відхилення від вихідної концентрації лежить в межах інструментальної похибки (табл. 4).

Таблиця 3. Результати дослідження правильності і прецизійності методики кількісного визначення сульфаметоксазолу і триметоприму

Критерій	Сульфаметоксазол		Триметоприм	
	встановлено	вимоги ДФУ	знайдено	вимоги ДФУ
\bar{Z}	99.83		100.25	
S	1.065		1.015	
Δ_z	1.98	< 3.2	1.89	< 3.2

Таблиця 4. Результати дослідження робастності методики кількісного визначення сульфаметоксазолу і триметоприму

Час зберігання, год	Концентрація в досліджуваному розчині		Концентрація в розчині порівняння	
	зміна, %	різниця, % від початкової	зміна, %	різниця, % від початкової
Сульфаметоксазол				
0	100.00	-	100.00	-
2	99.01	0.99	99.27	0.73
12	99.12	0.88	100.80	0.80
24	100.22	0.22	99.81	0.19
48	100.41	0.41	100.55	0.55
Триметоприм				
0	100.00	-	100.00	-
2	99.64	0.36	99.04	0.96
12	100.66	0.66	100.84	0.84
24	99.21	0.79	99.16	0.84
48	99.45	0.55	100.64	0.64

Стійкість методики до змін хроматографічної системи перевіряли на досліджуваному розчині (табл. 5). Умови хроматографування (швидкість потоку, температура колонки, співвідношення розчинників у рухомій фазі, рН) змінювались в межах ± 10 % від вказаних в методиці, при цьо-

му розглядали такі параметри хроматограми, як число теоретичних тарілок, коефіцієнт асиметрії піків і коефіцієнт розділення піків триметоприму і сульфаметоксазолу. На основі даних таблиці 5 встановлені критерії придатності хроматографічної системи.

Таблиця 5. Результати дослідження придатності хроматографічної системи для методики кількісного визначення сульфаметоксазолу і триметоприму

Параметр	Час утримання		Число теоретичних тарілок		Коефіцієнт асиметрії		Коефіцієнт розділення С і Т
	С*	Т*	С	Т	С	Т	
Умови методу	5,21	2,1	7964	3529	1,10	0,69	16,32
Швидкість потоку 1,8 мл/хв (-10%)	5,9	2,4	8777	3770	1,12	0,67	17,5
Швидкість потоку 2,2 мл/хв (+10%)	4,8	1,9	7739	3932	1,10	0,69	16,3
Температура колонки 18 °С	5,5	2,1	7785	3561	1,12	0,68	17,1
Температура колонки 22 °С	5,1	2,1	8286	3583	1,07	0,68	16,1
Ацетонітрил-буфер 18:82	5,6	2,3	8300	3681	1,11	0,68	17,07
Ацетонітрил-буфер 22:78	4,6	1,9	7851	3419	1,21	0,73	10,9
рН 5,46	6,1	1,9	8389	3567	0,97	0,69	21,4
рН 6,14	5,2	2,2	6740	3710	1,79	0,72	11,5

Примітки: *С – сульфаметоксазол; *Т – триметоприм.

Висновки. 1. Здійснено розробку і валідацію методики кількісного визначення сульфаметоксазолу та триметоприму в оральної дитячої суспензії “Бі-тол”, 200 мг/40мг у 5 мл по 100 г у флаконі або банці з дозуючою скляночкою в пачці, виробництва ТОВ ДКП

“Фармацевтична фабрика”, м. Житомир, Україна.

2. Встановлено, що розроблена методика відповідає вимогам ДФУ за специфічністю, правильністю, прецизійністю та робастністю в діапазоні від 80 до 120 % від номінального вмісту.

Література

1. Державна Фармакопея України / Держ. п-во "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-ше вид., допов. 1. – X. : PIPEГ, – 2004. – 520 с.
2. European Pharmacopoeia. – 6th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2007. – 3261p.
3. British Pharmacopoeia. – London. The Stationary Office. – 2009. – Vol. 1–2. – 10952 p.
4. Rapid assay for determination of trimethoprim and sulfamethoxazole levels in serum by spectrofluorometry / D. M. Lichtenwalner, B. Suh, B. Lorber [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 1979. – Vol. 16(5). – P. 579–583.
5. Berzas Nevado J. J. Determination of sulfamethoxazole, sulfadiazine, and associated compounds in pharmaceutical preparation by capillary zone electrophoresis / J. J. Berzas Nevado, G. Castaneda Penalvo, F. J. Guzman Bernardo // J. Chromatogr. A. – 2001. – Vol. 918(1). – P. 205–210.
6. Simultaneous determination of binary mixtures of trimethoprim and sulfamethoxazole or sulfamethoxy-pyridazine by the bivariate calibration spectrophotometric method / L. Lopez-Martinez, P. L. Lopez-de-Alba, Manuel de- L. Leon-Rodriguez [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2002. – V. 30(1). – P. 77–85.
7. Sahver Ege Hismiogullari. Spectrophotometric determination and stability studies of sulfamethoxazole and trimethoprim in oral suspension by classical least square calibration method/ Sahver Ege Hismiogullari, Ender Yarsan// Hacettepe University Journal of Faculty of Pharmacy. – 2009. – Vol. 29. – P. 95–104.
8. Simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in veterinary formulations by chromatographic multivariate methods/ E. Dinc, A. Bilgili, B. Hanedan // Pharmazie. – 2007. – Vol. 62(3). – P. 179–184.
9. Simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in veterinary formulations / C. Akay, S. A. Ozkan // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2002. – V. 30(4). – P. 1207–1213.
10. Berzas Nevado J. J. Simultaneous determination of sulfamethoxy-pyridazine, sulfamethoxazole, sulfadimetoxine and their associated compounds by liquid chromatography/ J. J. Berzas Nevado, G. Castaneda Penalvo, F. J. Guzman Bernardo // Anal. Chim. Acta. – 2001. – Vol. 442(2). – P. 241–248.
11. United State Pharmacopoeia. NF 25. – 30th ed. – Rockville, 2007. – P. 3248.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ В ОРАЛЬНОЙ СУСПЕНЗИИ “БИ-ТОЛ”

А. В. Глущенко, А. Н. Шекель, И. А. Вишнеvский, В. А. Георгиянц

*Национальный фармацевтический университет, Харьков
ООО ГКП “Фармацевтическая фабрика”, Житомир*

Резюме: разработана и валидирована аналитическая методика количественного определения триметоприма и сульфаметоксазола в одной пробе методом жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: валидация, жидкостная хроматография, триметоприм, сульфаметоксазол.

DEVELOPMENT AND VALIDATION THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE ACTIVE PHARMACEUTICAL SUBSTANCES IN THE ORAL SUSPENSION “BI-TOL”

A. V. Hlushchenko, A. M. Shekel, I. A. Vyshnevskyi, V. A. Heorhiyants

*National University of Pharmacy, Kharkiv
JSC “Pharmaceutical Factory” Zhytomyr*

Summary: the method of quantitative determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in the same test by the liquid chromatography was worked out and validated.

Key words: validation, liquid chromatography, trimethoprim, sulfamethoxazole.