

Розробка методики кількісного аналізу діючих речовин вагінальних супозиторіїв «Флугедин»

В.А.Ханін, К.О.Бур'ян, Г.О.Бур'ян

Національний фармацевтичний університет
Харків, Україна

Вході роботи був запропонований метод якісного та кількісного аналізу діючих речовин препарату методом високоефективної рідинної хроматографії. Розроблена методика є універсальною і дозволяє визначити всі діючі речовини в одній системі.

Ключові слова: кількісний аналіз, супозиторії, флуконазол, хлоргексидин.

ВСТУП

На кафедрі промислової фармації Національного фармацевтичного університету розроблено новий препарат у формі супозиторіїв на поліетиленоксидній основі для лікування кандидозних та змішаних урогенітальних інфекцій жінок. Вагінальні супозиторії «Флугедин» мають виражену фунгіцидну та протимікробну дію. До складу розробленого препарату входять флуконазол та хлоргексидину біглюконат, які взаємопотенціюють дію один одного, забезпечуючи досить могутню протимікробну дію.

На сьогоднішній день не існує ніякого офіційного аналітичного методу для виявлення флуконазолу та хлоргексидину біглюконату у фармацевтичній продукції на території України, оскільки ця лікарська речовина ще не занесена до ДФУ, хоча препарати з вмістом цих речовин вже досить тривалий час реалізуються на вітчизняному фармацевтичному ринку та призначаються для лікування [2, 3, 5]. Однак Європейська фармакопея та фармакопея США вже містять монографію (фармакопейну статтю) на флуконазол та хлоргексидину біглюконат [7].

В умовах прагнення вітчизняної фармацевтичної промисловості до стандартів GMP лікарський препарат повинен мати надійну методику аналізу усіх діючих речовин, які входять до його складу. Тобто для проведення кіль-

кісного аналізу складу супозиторіїв «Флугедин» методика має бути валідована, відповідно та достатньо швидко проводиться в умовах виробництва, причому аналіз повинен мати низьку помилку [3, 4, 6]. Серед усіх запропонованих методів визначення самим специфічним, точним і швидким виявився метод високоефективної рідинної хроматографії [2, 3]. Він може бути застосований як для ідентифікації, так і для кількісного визначення лікарських засобів, надає можливість отримувати результати швидко, з високою точністю і надійністю. Тому під час дослідження кількісного складу компонентів нового препарату у формі супозиторіїв ми вирішили скористатися методом високоефективної рідинної хроматографії [2, 3].

Дослідження проводили на рідинному хроматографі Waters Alliance 2690 з УФ-детектором UV 486.

МЕТОДИКА

В результаті проведених досліджень запропоновано наступну методику кількісного аналізу діючих речовин.

4 супозиторія (маса кожного 2,00 г) вміщують у мірну колбу ємністю 200 мл, доводять об'єм розчину сумішшю метанол-вода (50:50) до мітки, обробляють на протязі 10 хв. на УЗ бані, охолоджують, 10 хв. перемішують та фільтрують крізь скляний фільтр ПОР 16 (випробуваний розчин).

ТАБЛИЦЯ 1

Програма градієнтного елюювання

Час, хв.	Потік, мл/хв.	Вміст РФ А, %	Вміст РФ Б, %	Режим елюювання
0	0,8	100	0	Ізократичний
5	0,8	100	0	Ізократичний
22	0,8	30	70	Лінійний градієнт
29	1	30	70	Ізократичний
30	1	100	0	Лінійний градієнт
35	1	100	0	Ізократичний

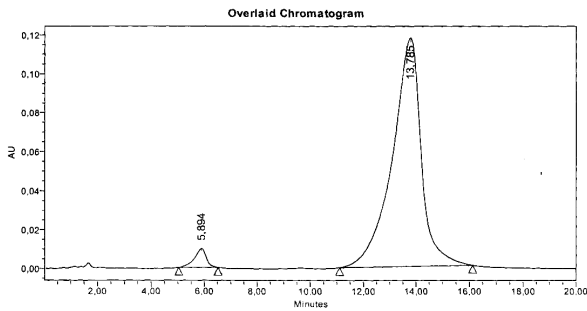


Рис. 1. Хроматограма розчину супозиторіїв.

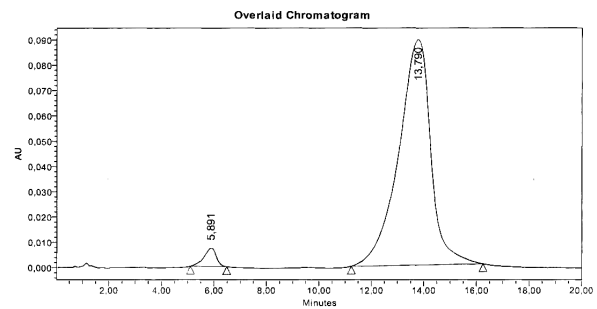


Рис. 2. Хроматограма розчину сумарного СЗ.

Приготування розчину сумарного СЗ: 0,04 г (точна наважка) ФСЗ ДФУ хлоргексидину біглюконату, 0,05 г (точна наважка) ФСЗ ДФУ флуконазолу вміщують в мірну колбу ємністю 50 мл, додають 20 мл метанолу та обробляють на УЗ бані протягом 10 хвилин. Після чого отриманий розчин доводять до мітки та обробляють на УЗ бані протягом 10 хв. Отриманий розчин перемішують та фільтрують крізь фільтр ПОР 16. Розчин зберігають у темному, прохолодному місці. Термін його придатності 7 діб.

Вміст діючих речовин у перерахунку на середню масу супозиторію має бути в таких межах: для флуконазолу – 0,045-0,055 г, хлоргексидину біглюконату – 0,036-0,044 г. Результати аналізу є достовірними, якщо виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи» [2-4].

По 5 мкл випробуваного розчину препарату і розчину сумарного СЗ (стандартного зразка) почергово хроматографують не менше 5 разів на рідинному хроматографі в таких умовах: колонка розміром 250*4,6 мм, заповнена сорбентом з привитою фазою октадецилсилікагель, зернення 5 мкм; рухома фаза: розчин, що вміщує 2 г/л октансульфонату натрію, 120 мл льодяної оцтової кислоти, 270 мл води Р і 730 мл метанолу, дегазований будь-яким зручним способом; у процесі хроматографування застосовували градієнтне елюювання, програму якого представлено у табл. 1; довжина хвилі – 254 нм; швидкість потоку – 1 мл/хв.; температура термостату колонки – 30°C.

Вміст флуконазолу та хлоргексидину біглюконату (X) в одному супозиторії (г) розрахову-

вали за формулою: $X = (S_i \cdot m_o \cdot 200 \cdot P) / (S_o \cdot 3 \cdot 100 \cdot 100)$, де S_i – середнє значення площин піків флуконазолу та хлоргексидину біглюконату, розраховане з хроматограм випробуваного розчину препарату; S_o – середнє значення площин піків флуконазолу та хлоргексидину біглюконату, розраховане з хроматограм розчину сумарного СЗ; m_o – маса наважки флуконазолу та хлоргексидину біглюконату в сумарному СЗ (г); P – вміст основної речовини (флуконазол або хлоргексидину біглюконат) у зразку, взятому для виготовлення сумарного СЗ.

Хроматограма розчину супозиторіїв з вмістом усіх діючих речовин наведена на рис. 1 та рис. 2.

Проведені дослідження по визначенню піків діючих речовин як в складі препарату, так і окремо показали, що поліетиленоксидна основа не впливає на час виходу піків аналізуємих компонентів.

З отриманих даних розраховували концентрацію діючих речовин в препараті за зазначеною формулою. Дослідження проводили 5 разів з метою визначення відносного стандартного відхилення. Результати проведених розрахунків наведені у табл. 2.

Згідно з наведеними даними відносно стандартне відхилення, розраховане для площ піків, є не більше 2,37%, що відповідає вимогам до величини RSD для паралельних вимірів методом ВЕРХ [2-4, 8].

Для підтвердження коректності методики при відтворенні її в інших умовах слід зробити прогноз повної невизначеності методики [1, 3, 4, 6]. Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати макси-

ТАБЛИЦЯ 2

Метрологічні характеристики методу аналізу, n=5

Речовина	X_{cp}	S^2	S_{cp}	P	t (P, v)	Вірогідний інтервал	$\epsilon, \%$
Флуконазол	0,0501	0,00000090	0,0004	0,95	2,78	0,0501±0,001	1,9895
Хлоргексидину біглюконат	0,04	0,000000532	0,0003	0,95	2,78	0,04±0,0008	1,9167

Примітки: X_{cp} – середній арифметичний результат; S^2 – дисперсія виборки; S_{cp} – стандартне відхилення середнього результату; P – вірогідність довіри; (P, v) – табличне значення критерію Ст'юдента; ϵ_{-} – відносна помилка окремої варіанти.

ТАБЛИЦЯ 3

Метрологічні дані для прогнозу повної невизначеності хроматографічних методик кількісного визначення діючих речовин у супозиторіях «Флугедин»

Речовина	$\Delta_M, \%$	$\Delta_S, \%$	$\Delta_{SPet}, \%$	$\Delta_{SPob}, \%$	$\Delta_{SP}, \%$	$\Delta_{FAO}, \%$	$\Delta_{AS}, \%$	$\Delta_{ASmax}, \%$
Флуконазол	0,4	0,17	0,4346	0,093	0,4500	3,08	3,11	3,2
Хлоргексидину біглоконат	0,5	0,17	0,5381	0,093	0,5362	3,08	3,13	3,2

Примітки: Δ_M — помилка зважування, %; Δ_S — помилка мірного посуду, %; Δ_{SPet} — невизначеність пробопідготовки СЗ, %; Δ_{SPob} — невизначеність пробопідготовки розчину препарату, %; Δ_{SP} — невизначеність пробопідготовки, %; Δ_{FAO} — прогнозована невизначеність кінцевої аналітичної операції; Δ_{AS} — прогнозована повна невизначеність результатів аналізу, %; Δ_{ASmax} — максимально припустима повна відносна невизначеність методики аналізу лікарських засобів, %.

мально допустимої невизначеності результатів аналізу Δ_{ASmax} , отже дана методика придатна для отримання результатів, що мають достатню точність і може бути використана для проведення аналізу в інших лабораторіях [1, 3, 4, 6, 8].

Метрологічні дані для прорахунків Δ_{ASr} та Δ_{ASmax} представлені у табл. 3.

Передбачувана невизначеність кінцевої аналітичної операції Δ_{FAO} дорівнює 3,08% для 5 випробувань готового лікарського засобу [3].

Помилка аналітичної методики незначно впливає на результат кількісного аналізу флуконазолу та хлоргексидину біглоконату, оскільки величина максимально допустимої повної відносної невизначеності методики аналізу лікарського засобу не перебільшує теоретичного значення. Шляхом аналізу деяких валідаційних характеристик розробленої хроматографічної методики кількісного визначення діючих речовин супозиторіїв «Флугедин» спрогнозовано значення невизначеності аналітичної методики.

ВИСНОВКИ

1. Розроблена методика якісного та кількісного визначення діючих речовин препарату «Флугедин» методом вискоефективної рідинної хроматографії, що дозволяє провести дослідження всього складу лікарського засобу в одній системі.

2. Проведене визначення деяких валідаційних характеристик розроблених хроматографічних методик кількісного визначення діючих речовин супозиторіїв «Флугедин», які свідчать, що даний метод придатний для отримання результатів достатньої точності.

ЛІТЕРАТУРА

- Атестація стандартних зразків. Повідомлення 1. Атестація вторинних стандартних зразків для кількісного хроматографічного аналізу лікарських засобів / О.І.Гриздуб, М.Г.Левін, Д.А.Леонтьєв [та ін.] // Фармаком. — 1999. — №2. — С. 26-30.
- Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
- Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний

центр». — 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — Доповнення 1. — 2004. — 520 с.

- Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 2008. — 620 с.
- Компендиум 2009 — лекарственные препараты / Под ред. В.Н.Коваленко, А.П.Викторова. — К.: Морион, 2009. — 2224 с.
- Леонтьев Д.А. К созданию государственной фармакопеи Украины. К вопросу о валидации аналитических методик // Фармаком. — 1999. — №6. — С. 56-58.
- European Pharmacopoeia. — 4 ed. — Strasburg: Council of Europe, 2002. — 2416 p.
- An optimized analytical method of fluconazole in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and its application to a bioequivalence study / S.S.Kim, H.T.Im, I.M.Kang [et al.] // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. — 2007. — Vol. 852. — №1-2. — P. 174-179.

В.А.Ханин, Е.А.Бурьян, А.А.Бурьян. Разработка количественного анализа действующих веществ супозиториев «Флугедин». Харьков, Украина.

Ключевые слова: количественный анализ, супозитории, флуконазол, хлоргексидин.

В ходе работы был предложен метод качественного и количественного анализа действующих веществ препарата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разработанная методика является универсальной и позволяет определить все действующие вещества в одной системе.

V.A.Hanin, K.O.Bur'yan G.O.Bur'yan. Development of quantitative analysis of the operating matters suppositories «Flugedinum». Kharkiv, Ukraine.

Key words: quantitative analysis, suppository, fluconazol, chlorhexidine.

During the work, the method for qualitative and quantitative analysis of active substances of the drug by high performance liquid chromatography was proposed. The developed methodology is universal and allows to identify all active ingredients in one system.

Надійшла до редакції 23.06.2010 р.