

УДК 543.422.3:615.281.9:547.551.52

ВАЛІДАЦІЯ АНАЛІТИЧНОЇ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУЛЬФАМЕТАЗИНУ В РОЗЧИНІ “ЗИНАПРИМ”

О. Коркуна¹, М. Смолінська², Т. Врублевська¹

¹Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Кирила і Мефодія, 6, 79005 Львів, Україна

²Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок, вул. Донецька, 11, 79019 Львів, Україна
e-mail: olga_korkuna@yahoo.com

Запропоновано аналітичну методику спектрофотометричного визначення сульфаметазину в комбінованому ветеринарному препараті (розчині) “Зинаприм”, в основі якої є вимірювання світлопоглинання кольорового продукту реакції взаємодії діазосолі сульфаметазину з одним із продуктів окиснення *o,o'*-дигідроксизаміщеного азобарвника еріохрому чорного Т – незаміщеним α -нафтолом. Результати валідаційних досліджень з використанням критеріїв прийнятності для допусків відхилення вмісту від номінального значення $V = \pm 5,0\%$ підтверджують специфічність, робастність, лінійність, правильність, прецизійність, внутрішньолабораторну прецизійність та відтворюваність запропонованої методики в діапазоні її застосування.

Ключові слова: Зинаприм, сульфаметазин, еріохром чорний Т, спектрофотометрія, кількісне визначення, валідаційні характеристики.

Сучасні вимоги до контролю якості лікарських засобів регламентують необхідність валідації методик ідентифікації та кількісного визначення. Розробка та валідація цих методик контролю ліків мають важливе практичне значення для підвищення їхньої якості. Важливо, щоб вони відповідали сучасним вимогам Державної фармакопеї України, наказам Міністерства охорони здоров'я України та були відтворювані в умовах лабораторій з аналізу якості ліків.

Сульфаніламіді були першими синтетичними антибактеріальними засобами, які сьогодні часто поєднують у комбінованих лікарських препаратах (КЛП) з іншими антибактеріальними речовинами різної хімічної природи для підвищення терапевтичного ефекту [1–3]. Біологічно активні речовини, що входять до складу одного препарату, можуть заважати їхньому індивідуальному визначенню, що зумовлює необхідність вивчення вибіркової їхнього визначення з уже відомими реагентами.

Для аналізу КЛП на вміст сульфаніламідів у Британській та Американській фармакопеях, крім хроматографічних методів, прописані нітриметричне титрування чи УФ-спектрофотометричне визначення, однак лише після попереднього відокремлення аналіта та його очищення від інших діючих та допоміжних речовин, а хроматографічні методи є складними і не завжди рентабельними.

Об'єктом нашого вивчення став ветеринарний препарат розчин “Зинаприм”. Цей препарат застосовують для лікування бактеріальних інфекцій шлунково-кишкового тракту, дихальних шляхів, сечостатевої системи, захворювань шкіри і м'яких тканин у великої рогатої худоби, овець, кіз і свиней. Дія препарату зумовлена поєднанням двох активних компонентів, що входять до його складу, – сульфаметазину (СМТ) та триметоприму. Ці речовини окремо мають бактериостатичну дію, а разом надають препарату бактерицидну дію. Препарат має широкий спектр дії щодо грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів. Допоміжними речовинами досліджуваного розчину є цитратна кислота, натрій піросульфід, пропілпарабен, метилпарабен, хлоридна кислота, натрій гідроксид та вода.

Ми розробили аналітичну методику спектрофотометричного визначення СМТ, в основі якої є реакція утворення кольорового продукту діазосолі СМТ з одним із продуктів окиснення *o,o'*-дигідроксизаміщеного азобарвника еріохрому чорного Т – незаміщеним α -нафтолом при рН 8,0. Утворений азопродукт коричневого кольору має максимум світлопоглинання при $\lambda = 485$ нм ($\epsilon_{\lambda} = 4,2 \cdot 10^3$ л · моль⁻¹ · см⁻¹) [4].

У ході визначення СМТ у препараті “Зинаприм”, згідно з нормативною документацією, для відокремлення аналіту застосовують попередню екстракцію триметоприму хлороформом. Розроблена нами методика, як засвідчили попередні дослідження, не потребує екстракційного розділення компонентів.

Наше мета – розроблення та валідація методики кількісного спектрофотометричного визначення сульфаметазину в розчині “Зинаприм” з використанням еріохрому чорного Т (ЕЧ Т), тобто одержання експериментальних доказів того, що запропонована методика придатна для аналітичного контролю досліджуваного комбінованого ветеринарного сульфаніламідного препарату.

Відповідно до вимог [5–10] для аналітичної методики щодо випробування “Кількісне визначення”, необхідно визначати такі валідаційні характеристики: **специфічність, робастність, лінійність, правильність, прецизійність, внутрішньолабораторну прецизійність.**

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Об'єкт дослідження

Розчин “Зинаприм” (виробник Invesa, Іспанія), що містить діючі речовини сульфаметазин (200 ± 10 мг/мл), триметоприм (40 мг/мл), а також допоміжні речовини – цитратну кислоту (12 мг/мл), натрій піросульфід (1 мг/мл), пропілпарабен (10 мкг/мл), метилпарабен (0,7 мг/мл), хлоридну кислоту (1,2 мг/мл), натрій гідроксид (4,4 мг/мл), воду (до 1 мл).

Реагенти

У роботі використовували субстанції діючих речовин фармакопейної чистоти (не менше 99 %) фірми “Sigma-Aldrich” (Німеччина) сульфаметазин, триметоприм та допоміжні речовини: цитратну кислоту, натрій піросульфід, пропілпарабен, метилпарабен. Розчин СМТ готували розчиненням точної наважки реактиву в 0,1 М розчині натрій гідроксиду. Усі розчини зберігали за кімнатної температури в захищеному від світла місці.

Розчини ЕЧ Т готували розчиненням точної наважки реактиву фірми “Merck” (Німеччина) (не менше 95 % основної речовини) у 30% водно-спиртовому розчині.

Розчини борної кислоти, натрій нітриту, сечовини готували розчиненням точної наважки реактивів кваліфікації ч. д. а. у дистильованій воді.

Робочі розчини хлоридної, фосфатної та ацетатної кислот готували розведенням концентрованих кислот та натрій гідроксиду розчиненням точної наважки з реактивів кваліфікації х. ч. у дистильованій воді.

Обладнання

Спектрофотометричні вимірювання проводили на спектрофотометрі Specord M-40 (“Carl Zeiss Jena”, Німеччина) у кюветах з $l = 1$ см.

Значення рН вимірювали рН-метром рН-150М (РУП “Гомельський завод измерительных приборов”, Білорусь) з комбінованим скляним електродом (аргентумхлоридний електрод порівняння). Необхідне значення рН середовища створювали додаванням розчинів хлоридної кислоти та натрій гідроксиду різних концентрацій.

Методика визначення СМТ з використанням еріохрому чорного Т

Приготування робочого розчину стандартного зразка (РСЗ): 100 мг субстанції СМТ (точна наважка) розчиняють у 50 мл 0,1М розчину натрій гідроксиду в мірній колбі номінальним об’ємом 100 мл, доводять об’єм тим самим розчинником до мітки. Отриманий робочий РСЗ містить 1 мг/мл СМТ.

Приготування робочого розчину досліджуваного зразка (РДЗ): 1,0 мл препарату змішують з 50 мл 0,1М розчину натрій гідроксиду в мірній колбі об’ємом 100 мл, суміш перемішують та доводять до мітки розчином натрій гідроксиду.

Приготування робочого розчину модельного зразка (РМЗ). У хімічну склянку об’ємом 50 мл вносять сульфаметазин (5 г), триметоприм (1 г), цитратну кислоту (0,3 г), натрій піросульфат (25 мг), пропілпарабен (0,25 мг), метилпарабен (17,5 мг), хлоридну кислоту (30 мг), натрій гідроксид (110 мг), воду (18,5 г), що відповідає номінальному вмісту речовин у препараті. Отриману суміш ретельно перемішують до отримання однорідного прозорого розчину. Аліквоту об’ємом 1,0 мл вносять у мірну колбу об’ємом 100 мл, доводять до мітки 0,1М розчину натрій гідроксиду та ретельно перемішують.

Приготування робочого розчину модельного зразка плацебо (РМЗП). Змішують усі компоненти, як у випадку РМЗ, за винятком сульфаметазину. Приготування робочого РМЗП виконують аналогічно.

Визначення СМТ у розчині “Зинаприм”. До 0,4 мл робочого РДЗ (або 0,2 мл робочих РСЗ, РМЗ, РМЗП, відповідно) у мірні колби номінальним об’ємом 25 мл послідовно додають 5,0 мл 1,0 М хлоридної кислоти, 0,5 мл $5,0 \cdot 10^{-2}$ М розчину натрій нітрити. Після перемішування суміш витримують упродовж 20 хв за кімнатної температури, додають 0,5 мл 2,5 М розчину сечовини, перемішують і витримують упродовж 10 хв за кімнатної температури для руйнування надлишку нітрити, додають 1,5 мл $6,0 \cdot 10^{-3}$ М водного розчину ЕЧ Т, вносять 2,5 мл 0,04 М розчину універсальної буферної суміші (УБС), нейтралізують розчином натрій гідроксиду до рН 8,0. Вимірювання інтенсивності світлопоглинання досліджуваного розчину відносно “холостого” розчину виконують при $\lambda = 485$ нм, $l = 1$ см.

Вміст СМТ у препараті m (мг/мл) розраховують за формулою

$$m = \frac{A_x \cdot m_c}{A_c \cdot m_x},$$

де A_x – оптична густина робочого РДЗ; A_c – оптична густина робочого РСЗ; m_c – маса наважки СМТ для приготування робочого РСЗ, мг; m_x – маса досліджуваного препарату для приготування робочого РДЗ, г.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Максимально допустима невизначеність результату аналізу Δ_{As} у препараті “Зинаприм” за допусків вмісту $B = 5\%$ обчислена, згідно з [5–7], така:

$$\Delta_{As} \leq B \cdot 0,32 = 5 \cdot 0,32 = 1,6\%$$

Повна невизначеність результатів аналізу складається з невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції.

Невизначеність пробопідготовки Δ_{SP} препарату “Зинаприм” обчислювали на підставі методики пробопідготовки препарату та проведення аналітичної реакції визначення СМТ. Результати обчислень наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Результати обчислення невизначеності пробопідготовки для визначення СМТ у розчині “Зинаприм”

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність, %	
		РСЗ	РДЗ
Відбір наважки стандартного зразка СМТ (досліджуваного препарату)	m_0	0,2 мг/100 мг = 0,2	—
Відбір аликвоти досліджуваного препарату	1	—	0,6
Доведення до об'єму в мірній колбі 100 мл	100	0,12	
Відбір аликвоти піпеткою 1 мл	1	0,6	
Доведення до об'єму в мірній колбі 25 мл	25	0,23	

Обчислена згідно з [11] **невизначеність пробопідготовки**

$$\Delta_{SP} = \sqrt{2 \cdot 0,12^2 + 4 \cdot 0,6^2 + 2 \cdot 0,23^2 + 0,2^2} = \sqrt{1,6146} = 1,27\%$$

невизначеність кінцевої аналітичної операції, обчислена відповідно до [7],

$$\Delta_{FAO} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (s_A^2 + s_{cell}^2)}{3}} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (0,2^2 + 0,1^2)}{3}} = 0,3\%$$

Повна невизначеність результатів аналізу, обчислена згідно з [7],

$$\Delta_{AS} = \sqrt{(\Delta_{SP})^2 + (\Delta_{FAO})^2} = \sqrt{1,27^2 + 0,3^2} = 1,3\%$$

Обчислені значення повної невизначеності результатів аналізу за методикою не перевищують максимальної невизначеності результатів аналізу і свідчать про те, що проведена таким способом пробопідготовка та вимірювання аналітичного сигналу не вносять вагомій похибки в разі отримання результатів аналізу і їх можна застосовувати для визначення вмісту СМТ у цьому препараті.

Ми дослідили селективність взаємодії СМТ з ЕЧТ за наявності допоміжних та іншої діючої речовин досліджуваного препарату. Результати досліджень наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Результати визначення СМТ з ЕЧ Т за наявності різних кількостей речовин, які входять до складу розчину "Зинаприм", $n = 5$, $P = 0,95$; $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}$; $C_{\text{СМТ}} = 6,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$;
 $C_{\text{Сечов}} = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$; $C_{\text{ЕЧТ}} = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{УБС}} = 4,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $\text{pH} = 8,0$; $\lambda = 485 \text{ нм}$

Складник препарату	$m(\text{CA}) : m(\text{H})^*$	$m(\text{CA}) : m(\text{H})^{**}$
Допоміжні речовини		
Пропілпарабен	1:0,001	1:10
Метилпарабен	1:0,005	1:25
Цитратна кислота	1:0,1	1:5
Натрій піросульфід	1:0,01	1:2
Діюча речовина		
Триметоприм	1:0,2	1:5

* Масові співвідношення СА та допоміжних речовин у препараті.

** Максимальні масові співвідношення СА та допоміжних речовин, досліджені нами.

Як свідчать результати досліджень, допоміжні речовини заважають визначенню в разі використання їхніх кількостей, значно вищих від тих, які містяться у ветеринарному препараті, це стосується також триметоприму. Тому розроблену методику з використанням ЕЧ Т можна застосувати для аналізу препарату.

Специфічність методики кількісного визначення СМТ перевіряли, порівнюючи спектри поглинання робочих РМЗП та РМЗ препарату. Вплив плацебо не має перевищувати 0,51 % від максимально допустимої невизначеності результату аналізу (Δ_{As}), тобто

$$\max \delta \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} = 0,32 \cdot 1,6 = 0,51 \%$$

Результати показано на рис. 1.

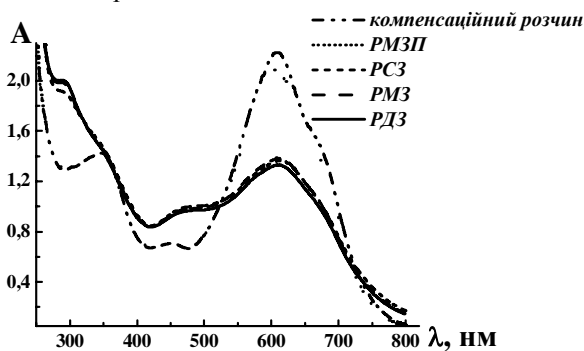


Рис. 1. Електронні спектри світлопоглинання досліджуваних розчинів після перебігу аналітичної реакції. $C_{\text{HCl}} = 1,0 \text{ M}$; $C_{\text{СМТ}} = 6,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{Сечов}} = 4,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$; $C_{\text{ЕЧТ}} = 3,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{УБС}} = 4,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $\text{pH} = 8,0$; $\lambda = 485 \text{ нм}$, $l = 1 \text{ см}$.

Як бачимо з рис. 1, на спектрі світлопоглинання розчину плацебо немає максимуму світлопоглинання за довжини хвилі $\lambda = 485 \text{ нм}$. Вплив оптичної густини розчину плацебо на результат аналізу є незначущим порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу, яка становить 0,51 % [5, 6, 11], відносно оптичної густини максимуму поглинання робочого РМЗ:

$$\delta = \frac{A_{pl}}{A_m} = \frac{0,001}{0,316} = 0,32 \% \leq 0,51 \%$$

де A_{pl} – оптична густина робочого РМЗП; A_m – оптична густина робочого РМЗ.

Отже, запропонована нами методика дає змогу визначати СМТ за наявності всіх інших компонентів розчину без їхнього розділення.

Валідаційну характеристику *робастність* частково досліджено в ході розробки методики спектрофотометричного визначення СМТ [4]. Під час дослідження взаємодії СМТ з ЕЧТ вивчено вплив різних чинників на перебіг аналітичної реакції і, відповідно, на значення аналітичного сигналу в широких межах. У табл. 3 наведено оптимальні умови перебігу реакції взаємодії СМТ з реагентом еріохромом чорним Т, за яких зміна значень оптичної густини є незначущою порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу (0,51 %).

Таблиця 3

Оптимальні умови одержання та деякі спектрофотометричні характеристики забарвленої сполуки СМТ з ЕЧТ

Умови діазування	
Концентрація HCl	1,0 моль/л
Концентрація NaNO ₂	>3-кратний надлишок до концентрації СА
Тривалість реакції	20 хв при 20 °С (10 хв за 0 °С)
Концентрація сечовини	>50-кратний надлишок до NaNO ₂
Тривалість реакції	10 хв за 20 °С
Умови азосполучення	
Надлишок азореагенту	6-кратний
Концентрація буферного розчину	0,004М моль/л розчин УБС
pH	8,0
Послідовність додавання реагентів	[СА _{діаз} (HCl + СА + NaNO ₂) _{20хв} + (Сечовина) _{10хв} + AP + Буферний розчин + NaOH] → pH
Характеристика продукту взаємодії СМТ з ЕЧТ	
Стабільність забарвлених продуктів	20 хв
λ_{max}	485 нм
$\epsilon_{\lambda} \times 10^{-4}$, л · моль ⁻¹ · см ⁻¹	4,2 · 10 ³

Під час проведення валідації ми дослідили умови максимального вилучення СМТ з розчину, яке виконували за допомогою розчинів хлоридної кислоти та натрій гідроксиду. Дослідження полягало у визначенні концентраційних меж екстрагентів.

У табл. 4 наведено результати дослідження робастності методики спектрофотометричного визначення СМТ – вплив концентрації хлоридної кислоти або натрій гідроксиду, у яких розчиняється СМТ.

Як свідчать отримані результати, зміна значень оптичної густини в разі зміни досліджуваних параметрів є незначущою порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу, якщо вилучення СМТ з препарату проводити 0,05–0,15М розчинами натрій гідроксиду або хлоридної кислоти.

Таблиця 4

Дослідження робастності методики спектрофотометричного визначення сульфаметазину у препараті "Зинаприм". $C_{\text{HCl}}=1,0\text{ M}$; $C_{\text{СМТ}}=6,0\cdot 10^{-5}\text{ M}$; $C_{\text{NaNO}_2}=8,0\cdot 10^{-4}\text{ M}$; $C_{\text{Сечов}}=4,0\cdot 10^{-2}\text{ M}$;

$C_{\text{ЕЧТ}}=3,6\cdot 10^{-4}\text{ M}$; $C_{\text{УБС}}=4,0\cdot 10^{-3}\text{ M}$; $\text{pH}=8,0$; $\lambda=485\text{ нм}$, $l=1\text{ см}$

Чинник впливу	Межі змін досліджуваних параметрів	Оптична густина	δ , %	Критерій	Висновок
Концентрація хлоридної кислоти	0,05M	0,315	0,32%	$\leq 0,51\%$	Відповідає
	0,10M	0,317	0,32%		
	0,15M	0,316	0%		
Концентрація натрій гідроксиду	0,05M	0,316	0%	$\leq 0,51\%$	Відповідає
	0,10M	0,315	0,32%		
	0,15M	0,317	0,32%		

Перевірка лінійності

Лінійну залежність досліджували в межах діапазону застосування аналітичної методики, для чого готували дев'ять розчинів (по три з однаковими концентраціями СМТ), отриманих розведенням робочого РМЗ препарату з концентраціями СМТ, що становили від 50 до 150 % відносно його номінального вмісту [8] (рис. 2). У табл. 5 наведено результати розрахунку концентрацій C_i , середніх значень оптичних густин A_i , а також значень X_i "уведено" відносно концентрації розчину порівняння (C_i/C_{Si}) та Y_i "знайдено" відносно оптичної густини розчину порівняння (A_i/A_{Si}).

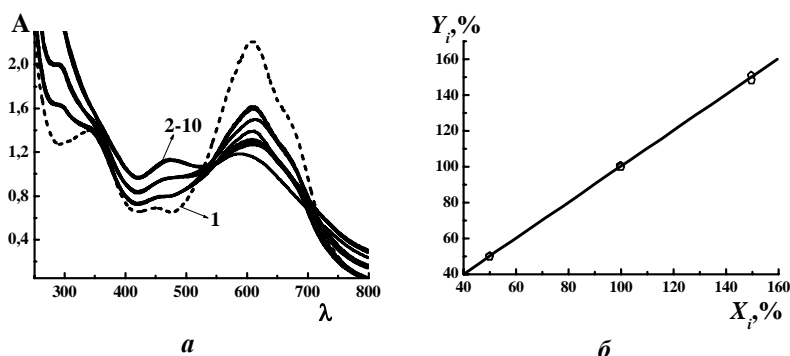


Рис. 2. Електронні спектри світлопоглинання (а) та графік лінійної залежності (б) аналітичного сигналу від концентрації СМТ: 1 – компенсаційний розчин, 2–10-кратне розведення РМЗ препарату з відповідними концентраціями СМТ. Умови перебігу аналітичної реакції: $C_{\text{HCl}}=1,0\text{ M}$, $C_{\text{СМТ}}=6,0\cdot 10^{-5}\text{ M}$, $C_{\text{NaNO}_2}=8,0\cdot 10^{-4}\text{ M}$, $C_{\text{Сечов}}=4,0\cdot 10^{-2}\text{ M}$, $C_{\text{ЕЧТ}}=3,6\cdot 10^{-4}\text{ M}$, $C_{\text{УБС}}=4,0\cdot 10^{-3}\text{ M}$, $\text{pH}=8,0$, $\lambda=485\text{ нм}$

У табл. 6 наведено критерії лінійності та обчислені параметри лінійної залежності визначення СМТ у препараті "Зинаприм".

Таблиця 5

Результати дослідження лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації СМТ у РМЗ препарату “Зинаприм” з використанням ЕЧТ

Розчин	C_i , мкг/мл	$X_i = \frac{C_i}{C_{Sr}} \cdot 100 \%$	A_i	$Y_i = \frac{A_i}{A_{Sr}} \cdot 100 \%$
Розчин порівняння	16,19	100,00	0,303	100,00
№ 1 (50 %)	8,07	49,85	0,152	50,17
№ 2 (50 %)	8,07	49,85	0,150	49,67
№ 3 (50 %)	8,07	49,85	0,151	49,84
№ 4 (100 %)	16,15	99,75	0,304	100,29
№ 5 (100 %)	16,15	99,75	0,305	100,65
№ 6 (100 %)	16,15	99,75	0,302	99,68
№ 7 (150 %)	24,22	149,60	0,456	150,65
№ 8 (150 %)	24,22	149,60	0,457	150,79
№ 9 (150 %)	24,22	149,60	0,449	148,21

Таблиця 6

Критерії лінійності та параметри лінійної залежності визначення СМТ у РМЗ препарату “Зинаприм” з ЕЧТ.

Параметри	Значення	Критерії	Висновок
b	1,002	Н. з.	
S_b	0,007	Н. з.	
a	-0,022	1) $\leq 1,410 $ 2) $\leq 1,024 $	Витримані
S_a	0,744	Н. з.	
RSD_0	0,624	Н. з.	
RSD_0/b	0,623	$\leq 0,8445 $	Витримані
RSD_y	43,31	Н. з.	
r	$ 0,9998 $	$\leq 0,9902 $	Витримані

Примітка. Н. з. – для відповідного параметра критеріїв не зазначають [7].

Як засвідчили результати проведених досліджень, простежується лінійна залежність аналітичного сигналу від концентрації СМТ у препараті, а обчислені параметри лінійної залежності відповідають критеріям, які до них ставлять.

Перевірка правильності та прецизійності

Валідаційні характеристики *правильність* та *прецизійність* розраховували з використанням результатів, отриманих у ході вивчення лінійності.

Результати аналізу модельних розчинів та їхнє статистичне опрацювання наведено в табл. 7.

Обчислене значення відносного довірчого інтервалу та систематичної похибки визначення СМТ у препараті з використанням ЕЧТ є меншим, ніж максимальне допустиме значення цих параметрів згідно з валідаційними критеріями, і свідчить про те, що розроблена методика визначення СМТ у розчині “Зинаприм” відповідає вимогам критеріїв правильності та прецизійності.

Таблиця 7

Результати аналізу РМЗ препарату “Зинаприм” з ЕЧ Т та
результати їхнього статистичного опрацювання.

Номер з/п	$X_i, \%$ (уведено)	$Y_i, \%$ (знайдено)	$D_i = \frac{\text{знайдено}}{\text{введено}} \cdot 100 \%$
1	49,85	50,17	100,64
2	49,85	49,67	99,64
3	49,85	49,84	99,97
4	99,75	100,29	100,55
5	99,75	100,65	100,90
6	99,75	99,68	99,93
7	149,60	150,65	100,70
8	149,60	150,79	100,80
9	149,60	148,21	99,07
\bar{D}			100,24
Відносне стандартне відхилення $RSD_0, \%$			0,624
Критичне значення одностороннього довірчого інтервалу, $\Delta x = 1,182$			$\Delta x \leq 1,6$
Критерій незначимості			1. $\delta \leq 0,394\%$
систематичної похибки, $\delta = 0,24\%$			2. $\delta \leq 0,512\%$
Загальний висновок щодо методики			Коректна

Перевірка внутрішньолабораторної прецизійності

Аналіз виконували різні аналітики, які використовували різний посуд і проводили по п'ять паралельних вимірювань для однієї серії препарату в різні дні в одній лабораторії. Для всіх результатів обчислювали єдине середнє значення вмісту СМТ m_{intra} , відносне стандартне відхилення S_{intra} і відносний довірчий інтервал Δ_{intra} .

У табл. 8 наведено результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності методики кількісного визначення СМТ в препараті “Зинаприм” з ЕЧ Т.

Таблиця 8

Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності методики кількісного визначення СМТ з ЕЧ Т у препараті “Зинаприм”: $C_{HCl} = 1,0M$; $C_{СМТ} = 6,0 \cdot 10^{-5} M$; $C_{NaNO_2} = 8,0 \cdot 10^{-4} M$;
 $C_{Сечов} = 4,0 \cdot 10^{-2} M$; $C_{ЕЧТ} = 3,6 \cdot 10^{-4} M$; $C_{УВС} = 4,0 \cdot 10^{-3} M$; $pH = 8,0$; $\lambda = 485 \text{ nm}$, $l = 1 \text{ cm}$

Номер аналізу	$m_i, \text{ мг/мл}$	
	1 день (дослід 1)	2 день (дослід 2)
1	202	200
2	202	202
3	200	201
4	199	200
5	200	202
\bar{m}		
Середнє \bar{m}		201
Об'єднане середнє \bar{m}_{intra}		201
S_m		1,10
$S_{intra} [12, 13]$		0,90
$\Delta_{intra} [12, 13]$		0,70

Значення Δ_{intra} , обчислене під час перевірки внутрішньолабораторної прецизійності згідно з [12, 13], для розчину “Зинаприм” з використанням ЕЧ Т становить 0,70 %, що відповідає вимозі

$$\Delta_{intra} \leq \max \delta = 0,70\% \leq 1,6\%,$$

і свідчить про те, що розроблена методика відповідає вимогам валідаційних критеріїв і придатна для кількісного визначення СМТ у досліджуваному препараті. Як бачимо із табл. 7, з урахуванням допусків кількісного вмісту діючої речовини у препараті $\pm 5\%$, отримані результати потрапляють в обумовлений діапазон вмісту, що є додатковим доказом правильності розробленої нами методики. Отже, цю методику можна рекомендувати до кількісного контролю вмісту СМТ у розчині “Зинаприм”.

Завдяки експериментальним дослідженням доведено, що спектрофотометрична методика кількісного визначення сульфаметазину як продукту взаємодії з еріохромом чорним Т у препараті “Зинаприм” придатна для контролю якості цього препарату за показником “Кількісне визначення”, що підтверджують визначені валідаційні характеристики.

1. *Бойко М., Врублевська Т., Коркуна О.* та ін. Аналіз комбінованих лікарських препаратів на вміст сульфаніламідів // Вісн. НУ “Львівська політехніка”. Хімія, технологія речовин та їх застосування. 2011. № 700. С. 89–94.
2. *Маркова В. И., Михайлов И. Б., Неженцев М. В.* Фармакология. СПб.: Фолиант, 2001.
3. *Харкевич Д. А.* Фармакология: учебник: 9-е изд., перераб., доп. и испр. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006.
4. *Бойко М. Я.* Моноазобарвники та гетероциклічні азосполуки як аналітичні реагенти для спектрофотометричного визначення сульфаніламідів: дис. ... канд. хім. наук. Львів, 2013.
5. *Гризодуб А. И.* Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // Фармаком. 2006. № 1/2. С. 35–44.
6. *Гризодуб А. И., Леонтьев Д. А., Денисенко Н. В.* и др. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта // Фармаком. 2004. № 3. С. 3–17.
1. *Державна Фармакопея України. Доп. 1.* Х.: РІГЕР, 2004.
2. *Юргель Н. В., Младенцев А. Л., Бурдейн А. В.* и др. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. М.: Спорт и Культура – 2000, 2007.
3. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (CPMP/ICH/381/95).
4. United States Pharmacopoeia. USP 30-NF25 Convention Inc. Rockville. MD XXVI. 2007.
5. *Державна Фармакопея України. Доп. 2.* Х.: Науково-експертний фармакопейний центр, 2008.
6. *Гризодуб А. И.* Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. 2002. № 3. С. 42–50.
7. *Гризодуб А. И., Зволинская Н. Н., Архипова Н. Н.* и др. Воспроизводимость фармакопейных методов спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях // Фармаком. 2004. № 2. С. 20–34.

**VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD OF SULPHAMETHAZINE
SPEKTROPHOTOMETRIC DETERMINATION IN SOLUTION "ZINAPRIM"****O. Korkuna¹, M. Smolinska², T. Vrublevska¹**¹*Ivan Franko Lviv National University,
Kyryla & Mefodiya Str., 6, 79005, Lviv, Ukraine*²*State Scientific Research Control Institute of Veterinary Preparations and Fodder
Additives, Donetska Str., 11, 79019, Lviv, Ukraine
e-mail: olga_korkuna@yahoo.com*

The paper is devoted to the development and validation of spectrophotometric methods of quantitative sulphamethazine (SMZ) determination in multicomponent pharmaceutical preparation solution "Zinaprim" (producer – Invesa, Spain) using *o,o'*-dihydroxy substituted azo dye eriochrome black T (EBT). The SMZ determination is based on sulphanilamides diazonium salts formation in chloride acid medium under the action of sodium nitrite and subsequent their azocoupling reaction with one of the products of the redox destruction of eriochrome black T, namely unsubstituted α -naphthol with formation of a colored azo compound in weakly alkaline medium (pH = 8.0).

The analysis data show that the preparation "Zinaprim" contains 201.0 mg/ml sulphamethazine. Studies of drug sample preparation for spectrophotometric sulphamethazine determination using EBT showed that the SMZ determination in preparation can be carried out without prior separation of the components.

The results of conducted validating studied with the use of criterion admissibility for the content limits $B = \pm 5.0\%$, confirmed the specificity, robustness, linearity, accuracy, precision, intermediate precision ($RSD_0 = 0.624\%$) and reproducibility of proposed method in the range of its application.

The linearity of the analytical signal in dependence on the SMZ concentration in the preparation was investigated in the range 50–150 % and calibration curve parameters ($r = |0.9998|$) was calculated.

It was shown that complete uncertainty of analysis, which consists of the uncertainty of sample preparation and final analytical operation is equal 1.3 % and does not exceed the maximum permissible uncertainty of analysis.

Calculated validation parameters are indicated that the developed methods comply with all the validation criteria and are suitable for quantitative determination of SMZ in the studied veterinary drug, and the techniques are correspond to the modern requirements to regulatory documents.

Key words: Zinaprim, sulphamethazine, eriochrome black T, spectrophotometry, quantitative determination, validation parameters.

Стаття надійшла до редколегії 13.10.2014

Прийнята до друку 30.12.2014