

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В.А. Тютрина

аспирант, кафедра фармацевтической и токсикологической химии,
Иркутский государственный медицинский университет
E-mail: ultr4vox@yandex.ru

Н.В. Чмелевская

к.фарм.н., зав. судебно-химическим отделением,
Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы

Е.А. Илларионова

д.х.н., профессор, зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии,
Иркутский государственный медицинский университет

Цель исследования – разработка и валидация методик количественного определения фторсодержащих лекарственных препаратов в таблетках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. **Материал и методы.** Объектами исследования являлись фармацевтическая субстанция и таблетки линезолида, эфавиренза и офлоксацина, отвечающие требованиям нормативных документов. Для разработки методики обнаружения и количественного определения линезолида, эфавиренза и офлоксацина в таблетках использовали обращенно-фазовый вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии в режиме градиентного элюирования, условия которого подобраны экспериментально. Оптимальные хроматографические условия: размер колонки – 75×2 мм, полимерный сорбент – ProntoSil 120-5C AQ, подвижная фаза – элюент А: 0,2 М LiClO₄ – 0,005 М HClO₄ (pH 2,8), элюент Б: ацетонитрил, градиент: 3700 мкл от 5 до 70% элюент Б, скорость потока – 100 мкл/мин, температура колонки – 40 °С, объем пробы – 2 мкл, длина волны – 210 нм. **Результаты.** Найденные условия были применены для разработки методик количественного содержания данных веществ в таблетках. Времена удерживания офлоксацина – 15,39 мин, линезолида – 16,12 мин и эфавиренза – 34,49 мин. Относительная ошибка количественного определения по разработанным методикам не превышает 1,22% для офлоксацина, 1,08% для линезолида и 1,39% для эфавиренза. **Выводы.** Разработаны и валидированы унифицированные методики количественного определения фторсодержащих гетероциклических лекарственных средств – линезолида, эфавиренза и офлоксацина в таблетках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, которые позволяют получить достаточно надежные и воспроизводимые результаты для предполагаемой области применения и могут быть рекомендованы для фармацевтического, химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Ключевые слова: офлоксацин, линезолид, эфавиренз, высокоэффективная жидкостная хроматография, количественное определение.

Для цитирования: Тютрина В.А., Чмелевская Н.В., Илларионова Е.А. Разработка и валидация методики количественного определения фторсодержащих лекарственных препаратов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(12):29–33. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-12-04>

В настоящее время в мире остро стоит проблема по распространению ретровирусных и бактериальных инфекций. Благодаря разработкам в области фармацевтической химии, в медицинскую практику внедряются лекарственные вещества гетероциклического ряда с различными заместителями. Данные лекарственные вещества обладают противовирусным и антибактериальным действием, но отличаются механизмами действия. Так, офлоксацин относится к группе антибактериальных препаратов, является

представителем фторхинолонов II поколения; линезолид – синтетический антибиотик группы оксазолидинонов; эфавиренз – антиретровирусный препарат. Эти препараты содержат в структуре атом фтора, который усиливает их ценное фармакологическое действие и делает эти лекарственные вещества более стабильными. Исследование фторсодержащих гетероциклических соединений необходимо для более полного внедрения их в медицинскую практику и активного использования для лечения инфекций.

Существующий метод оценки качества офлоксацина [1, 2], линезолида [3, 4] и эфавиренза [5] в субстанции и таблетках – высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) предлагает методику количественного определения, применяемую с использованием стандартных образцов и аппаратуры импортного производства [6–8]. Следовательно, разработка унифицированных методик обнаружения и количественного определения линезолида, эфавиренза и офлоксацина методом ВЭЖХ на хроматографе отечественного производства является актуальной задачей.

Цель исследования – разработка и валидирование методик количественного определения фторсодержащих лекарственных препаратов в таблетках методом ВЭЖХ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали фармацевтическую субстанцию и таблетки линезолида, эфавиренза и офлоксацина, отвечающие требованиям нормативных документов. Исследования проводили на микроколлонном жидкостном хроматографе с ультрафиолетовым многоволновым спектрофотометрическим детектором «Миличром А-02» отечественного производства (ЗАО «ЭкоНова», Новосибирск), оснащенный колонкой (75 × 2 мм); использовали рН-метр «Анион 4100» и центрифугу «Eppendorf» (13200 об/мин). Исследуемые образцы растворяли в спирте метилового, перегнанном перед использованием. Для приготовления смеси элюентов подвижной фазы применялись следующие растворители: хлорная кислота и перхлорат лития квалификации не ниже «х.ч.»; ацетонитрил «о.с.ч.» (сорт 1) фирмы «Криохром» (Санкт-Петербург). Результаты экспериментальных исследований статистически обрабатывали с применением пакета программ для Windows XP (Microsoft Excel), используя *t*-критерий Стьюдента [9]. Различия считали значимыми при доверительной вероятности $p < 0,05$.

Методика количественного определения офлоксацина в таблетках по 0,2 г методом ВЭЖХ. Точную навеску таблеточной массы 0,7500 г помещали в пробирку вместимостью 10 мл, прибавляли 10 мл спирта метилового, плотно закрывали, взбалтывали в течение 20 мин и обрабатывали в течение 10 мин на ультразвуковой бане. Аликвоту суспензии объемом 1 мл переносили в пробирку и центрифугировали (5 мин 13400 об/мин). Аликвоту полученного раствора объемом 100 мкл переносили в чистую пробирку, добавляли 900 мкл спирта метилового. Полученный раствор вводили в колонку в объеме 2 мкл.

Полученный раствор вводили в колонку в объеме 2 мкл.

Методика приготовления раствора рабочего стандартного образца офлоксацина. Точную массу субстанции офлоксацина 0,0500 г помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 80 мл спирта метилового, объем раствора доводили до метки этим же растворителем, перемешивали. Полученный раствор вводили в колонку в объеме 2 мкл.

Методика количественного определения линезолида в таблетках по 0,6 г методом ВЭЖХ. Точную навеску таблеточной массы 0,2500 г помещали в пробирку вместимостью 10 мл, прибавляли 10 мл спирта метилового, плотно закрывали, взбалтывали в течение 20 мин и обрабатывали в течение 10 мин на ультразвуковой бане. Аликвоту суспензии объемом 1 мл переносили в пробирку и центрифугировали (5 мин 13400 об/мин). Аликвоту полученного раствора объемом 100 мкл переносили в чистую пробирку, добавляли 900 мкл спирта метилового. Полученный раствор вводили в колонку в объеме 2 мкл.

Методика приготовления раствора рабочего стандартного образца линезолида. Точную массу субстанции линезолида 0,0500 г помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 80 мл спирта метилового, объем раствора доводили до метки этим же растворителем, перемешивали. Полученный раствор вводили в колонку в объеме 2 мкл.

Методика количественного определения эфавиренза в таблетках по 0,6 г методом ВЭЖХ. Точную навеску таблеточной массы 0,2500 г помещали в пробирку вместимостью 10 мл, прибавляли 10 мл спирта метилового, плотно закрывали, взбалтывали в течение 20 мин и обрабатывали в течение 10 мин на ультразвуковой бане. Аликвоту суспензии объемом 1 мл переносили в пробирку и центрифугировали (5 мин 13400 об/мин). Аликвоту полученного раствора объемом 100 мкл переносили в чистую пробирку, добавляли 900 мкл спирта метилового. Полученный раствор вводили в колонку в объеме 2 мкл.

Методика приготовления раствора рабочего стандартного образца эфавиренза. Точную массу субстанции эфавиренза 0,0500 г помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 80 мл спирта метилового, объем раствора доводили до метки этим же растворителем, перемешивали. Полученный раствор вводили в колонку в объеме 2 мкл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке методик количественного анализа методом ВЭЖХ оценивали устойчивость аналитической системы к изменениям температуры термостата колонки, соотношения элюентов и скорости потока подвижной фазы, значения pH. Неподвижную и подвижную фазы выбирали исходя из химических свойств линезолида, эфавиренза и офлоксацина. На основании полученных экспериментальных данных были определены оптимальные условия хроматографирования (табл. 1).

Установлено, что в предложенной смеси элюентов пики исследуемых фторсодержащих соединений хроматографируются в форме симметричных пиков. Коэффициент асимметрии для офлоксацина равен 1,04, для линезолида – 0,95, для эфавиренза – 1,08, что не превышает величину 1,5.

Это доказывает отсутствие значимых ионообменных взаимодействий в системе.

Для регистрации ультрафиолетовых спектров использовали стандартные растворы линезолида, эфавиренза и офлоксацина в спирте метиловом с концентрацией 0,5 мг/мл в интервале длин волн 190–360 нм, измеренные с шагом 2 нм. Для удобства применяли нормирование ультрафиолетовых спектров, так как нормированный ультрафиолетовый спектр не зависит от концентрации соединения. В качестве базовой для нормирования спектров выбрана длина волны 210 нм. Подлинность исследуемых лекарственных веществ устанавливали сравнением времени удерживания испытуемого раствора с временем удерживания (T_R) стандартных образцов офлоксацина (15,39 мин), линезолида (16,12 мин) и эфавиренза (34,49 мин).

Таблица 1. Хроматографические условия обнаружения и количественного определения линезолида, эфавиренза и офлоксацина в таблетках методом ВЭЖХ

Размер колонки	75×2 мм
Полимерный сорбент	ProntoSil 120-5C AQ
Подвижная фаза	Элюент А 0,2 М LiClO ₄ – 0,005 М HClO ₄ (pH 2,8), элюент Б: ацетонитрил
Градиент	3700 мкл от 5% до 70% элюент Б
Скорость потока	100 мкл/мин
Температура колонки	40 °С
Объем пробы	2 мкл
Длина волны	210 нм

Таблица 2. Количественное определение линезолида, эфавиренза и офлоксацина в таблетках методом ВЭЖХ

Лекарственная форма	№ серии	\bar{X} , мг	Метрологические характеристики (n = 7, p = 95%)						
			\bar{X} , %	S ²	S	S \bar{x}	ΔX , %	E, %	S _r
Таблетки офлоксацина 0,2 г	030516	201,33	100,67	1,96	1,28	0,48	1,18	1,18	0,013
	020116	197,5	98,75	1,70	1,30	0,49	1,21	1,22	0,013
	010218	199,33	99,67	1,16	1,08	0,41	1,00	1,00	0,011
Таблетки линезолида 0,6 г	150916	601,15	100,19	1,38	1,17	0,44	1,09	1,08	0,012
	120916	598,32	99,72	0,96	0,98	0,37	0,91	0,91	0,010
	140916	598,97	99,83	1,28	1,13	0,43	1,05	1,05	0,011
Таблетки эфавиренза 0,6 г	393116	595,75	99,29	2,21	1,49	0,56	1,38	1,39	0,015
	322116	596,03	99,34	1,42	1,19	0,45	1,10	1,11	0,012
	371116	595,52	99,25	1,52	1,23	0,47	1,14	1,15	0,012

Длины волн (220, 230, 240, 280 нм) используются для расчета спектральных отношений. Данная дополнительная характеристика позволяет идентифицировать исследуемые лекарственные вещества и повысить надёжность их определения.

Для установления диапазона применения методики определяли линейность с использованием растворов рабочих стандартных образцов изучаемых лекарственных веществ. Метод характеризуется хорошей линейностью с коэффициентом корреляции 1,0 для офлоксацина; 0,998 – для линезолида и 1,0 – для эфавиренза в интервале от 0,05 до 0,6 мг/мл.

Найденные условия были применены для разработки методик количественного содержания данных веществ в таблетках. Расчеты проводились по-

средством сравнения измеренных величин площадей пиков растворов стандартных образцов (фармацевтических субстанций линезолида, эфавиренза и офлоксацина) с площадями пиков исследуемых веществ при соответствующих длинах волн (табл. 2).

Из полученных данных следует, что относительная ошибка количественного определения по разработанным методикам не превышает 1,22% для офлоксацина, 1,08% – для линезолида и 1,39% – для эфавиренза.

Проведенная валидационная оценка разработанных оптимальных условий для количественного определения исследуемых фторсодержащих веществ в таблетках подтверждает их пригодность (табл. 3).

Таблица 3. Результаты валидационной оценки методики количественного определения линезолида, эфавиренза и офлоксацина в таблетках методом ВЭЖХ

Параметры	Критерии	Результаты испытания		
		Офлоксацин	Линезолид	Эфавиренз
Специфичность	–	Методика специфична	Методика специфична	Методика специфична
Пригодность хроматографической системы				
Эффективность колонки	Не менее 3000 т.т.	4000 т.т.	4000 т.т.	4000 т.т.
Коэффициент асимметрии пика	Не более 2	1,04	0,95	1,08
Прецизионность: сходимость воспроизводимость	RSD ≤ 2,0%	1,18	1,08	1,39
	RSD ≤ 3,0%	1,68	1,37	1,59
Линейность результатов	$r \geq 0,990$	$r = 1,0$ $y = 58,40x$	$r = 0,998$ $y = 90,34x$	$r = 1,0$ $y = 85,87x$
Стабильность раствора	Индивидуально	В течение суток	В течение суток	В течение суток

ВЫВОДЫ

Методом ВЭЖХ разработаны и валидированы методики количественного анализа исследуемых фторсодержащих гетероциклических лекарственных веществ, позволяющие выполнять обнаружение и определение количества линезолида, эфавиренза и офлоксацина в таблетках. Разработанные методики позволяют получить достаточно надежные и воспроизводимые результаты для предполагаемой области применения и могут быть рекомендованы для фармацевтического, химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нормативный документ ФС 42-14653-00. Офлоксацин. М. 2000. 13 с.
2. Нормативный документ ФС 42-12212-02. Офлоксацин, таблетки покрытые оболочкой 200 мг. М. 2002. 19 с.
3. Нормативный документ ФС 000704-120913. Линезолид. М. 2013. 17 с.
4. Нормативный документ ФС 002276-111013. Линезолид, таблетки покрытые оболочкой 200 мг. М. 2013. 2 с.
5. Нормативный документ ФС 000520-260313. Эфавиренз. М. 2013. 15 с.
6. Amini M., Abdi Kh., Darabi M., Shafiee A. Determination of Ofloxacin in Plasma by HPLC with UV Detection. Journal of Applied Sciences. 2005; 5(9):1655–1657. DOI: 10.3923/jas.2005.1655.1657.

7. Cios A., Kus K., Szymura-Oleksiak J. Determination of Linezolid in Human Serum by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography with Ultraviolet and Diode Array Detection. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2013; 70(4): 631–641.
8. Hamrapurkar P., Phale M., Shah N. Quantitative Estimation of Efavirenz by High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Young Pharmacists*. 2009; 1(4):369–373. DOI:10.4103/0975-1483.59328
9. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. МЗ РФ. М. 2015. Т. 1. 1470 с.

Поступила 16 июля 2019 г.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLUORINE-CONTAINING DRUGS BY THE METHOD OF HIGHLY EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY

© Authors, 2019

V.A. Tyutrina

Post-graduate Student, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Irkutsk State Medical University
E-mail: ultr4vox@yandex.ru

N.V. Chmelevskaya

Ph.D. (Pharm.), Head of Head of the Department of Forensic Chemistry, Irkutsk Regional Bureau of Forensic Medicine

E.A. Illarionova

Dr.Sc. (Chem.), Professor, Head of Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Irkutsk State Medical University

Objective. To develop and validate methods for the quantitative determination of fluorine-containing drugs in tablets by high performance liquid chromatography. **Material and methods.** In the work we used: pharmaceutical substance and tablets of linezolid, efavirenz and ofloxacin, which meet the requirements of regulatory documents. To develop methods for detecting and quantifying linezolid, efavirenz, and ofloxacin in tablets, a reverse-phase version of high-performance liquid chromatography in gradient elution was used, the conditions of which were selected experimentally. Optimal chromatographic conditions: column size - 75 × 2 mm, polymer sorbent - ProntoSil 120-5C AQ, mobile phase - Eluent A: 0.2 M LiClO₄ - 0.005 M HClO₄ (pH 2,8), Eluent B: Acetonitrile, gradient: 3700 µl from 5% to 70% eluent B, flow rate 100 µl / min, column temperature 40 ° C, sample volume 2 µl, wavelength 210 nm. **Results.** The conditions found were used to develop methods for the quantitative content of these substances in tablets. The retention times of ofloxacin were 15.39 minutes, linezolid 16.16 minutes and efavirenz 34.49 minutes. The relative error of the quantitative determination by the developed methods does not exceed 1.22% for ofloxacin, 1.08% for linezolid and 1.39% for efavirenz. **Findings.** During the study, unified methods were developed for the quantitative determination of fluorine-containing heterocyclic drugs - linezolid, efavirenz, and ofloxacin in tablets by high-performance liquid chromatography. A validation assessment of the developed methods was carried out. Thus, the developed methods make it possible to obtain sufficiently reliable and reproducible results for the intended field of application and can be recommended for pharmaceutical, chemical-toxicological, and forensic chemical analysis.

Key words: ofloxacin, linezolid, efavirenz, high performance liquid chromatography, quantitation.

For citation: Tyutrina V.A., Chmelevskaya N.V., Illarionova E.A. Development and validation of the method of quantitative determination of fluorine-containing drugs by the method of highly effective liquid chromatography. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2019;22(12):29–33. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-12-04>

REFERENCES

1. Normativnyj dokument FS 42-14653-00. Ofloksacin. М. 2000. 13 s.
2. Normativnyj dokument FS 42-12212-02. Ofloksacin, tabletki pokrytye obolochkoj 200 mg. М. 2002.19 s.
3. Normativnyj dokument FS 000704-120913. Linezolid. М. 2013. 17 s.
4. Normativnyj dokument FS 002276-111013. Linezolid, tabletki pokrytye obolochkoj 200 mg. М. 2013. 2 s.
5. Normativnyj dokument FS 000520-260313. Efavirenz. М. 2013. 15 s.
6. Amini M., Abdi Kh., Darabi M., Shafiee A. Determination of Ofloxacin in Plasma by HPLC with UV Detection. *Journal of Applied Sciences*. 2005; 5(9):1655–1657. DOI: 10.3923/jas.2005.1655.1657.
7. Cios A., Kus K., Szymura-Oleksiak J. Determination of Linezolid in Human Serum by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography with Ultraviolet and Diode Array Detection. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2013; 70(4): 631–641.
8. Hamrapurkar P., Phale M., Shah N. Quantitative Estimation of Efavirenz by High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Young Pharmacists*. 2009; 1(4):369–373. DOI:10.4103/0975-1483.59328.
9. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii. XIII izdanie. MZ RF. М. 2015. Т. 1. 1470 s.