

DOI: <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2020-86-6-73-78>

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУЛЬФАТА ФРАМИЦЕТИНА В ЛЕКАРСТВЕННОМ ПРЕПАРАТЕ «ФРАМИДЕКС» МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© Дильшодбек Давронбекович Гаппаров^{1*}, Зулайхо Асаналиевна Сманова¹, Юрий Валерьевич Тимченко², Андрей Владимирович Пирогов²

¹ Национальный университет Узбекистана им. Мирзо Улугбека, Узбекистан, 100174, Ташкент, ул. Университетская, 4; *e-mail: d.d.gapparov@mail.ru

² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, 1.

*Статья поступила 22 апреля 2020 г. Поступила после доработки 22 апреля 2020 г.
Принята к публикации 22 апреля 2020 г.*

Разработан способ определения фрамицетина сульфата в препарате «Фрамидекс» (капли глазные и ушные) методом ВЭЖХ-УФ ($\lambda = 365$ нм) с применением 2,4-динитрофторбензола в качестве дериватизирующего агента. Приведены характеристики аналитических методик, определяемые в целях их валидации, и соответствующие критерии пригодности валидируемых методик, предназначенных для контроля качества лекарственных средств (фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов). По результатам внутрилабораторного эксперимента по валидационной оценке метода по таким параметрам, как специфичность, предел определения, линейность (коэффициент корреляции — не менее 0,99), правильность (среднее значение — 97,5 – 102,5 %; коэффициент вариации — не более 2,0 %; доверительный диапазон должен включать 100 % значений), сходимость (коэффициент вариации — не более 1,5 %), промежуточная прецизионность (коэффициент вариации — не более 1,5 %), было установлено, что полученные значения метрологических характеристик не превышают валидационных критериев и разработанная методика удовлетворяет всем общеизвестным требованиям GMP (Good Manufacturing Practice).

Ключевые слова: сульфат фрамицетина; ВЭЖХ; «Фрамидекс» капли глазные и ушные; валидация.

VALIDATION OF THE FRAMYCETIN SULFATE DETERMINATION TECHNIQUE BY HPLC IN A FRAMIDEX MEDICINAL PREPARATION

© Dilshodbek D. Gapparov^{1*}, Zulaikho A. Smanova¹, Yuri V. Timchenko², Andrey V. Pirogov²

¹ National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek, 4 Universitetskaya ul., Tashkent, 100174, Republic of Uzbekistan; *e-mail: d.d.gapparov@mail.ru

² M. V. Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia.

Received April 22, 2020. Revised April 22, 2020. Accepted April 22, 2020.

A method for determination of framycetin sulfate in a Framidex preparation (eye and ear drops) by HPLC-UV ($\lambda = 365$ nm) using 2, 4-dinitrofluorobenzene as a derivatizing agent has been developed. The characteristics of analytical methods determined for the purpose of their validation and relevant criteria for the validity of validated methods with the goal of the quality control of drugs (pharmaceutical substances and drugs) are presented. According to the results of an intralaboratory experiment on the validation assessment of the method by the parameters of the specificity, limit of determination (LOD), linearity, precision and laboratory accuracy, it is shown that the LOD decreases by an order of magnitude, the correlation coefficient is not less than 0.99 correctness (average value — 97.5 – 102.5%; variation coefficient — not more than 2.0%; the confidence range should include 100% of values), convergence (variation coefficient — not more than 1.5%), intermediate precision (variation coefficient — not more than 1.5%). It is shown that the obtained values of metrological characteristics do not exceed the validation criteria and the developed method matches all the well-known requirements of GMP (Good Manufacturing Practice).

Keywords: framycetin sulfate; HPLC; “Framidex” eye and ear drops; validation.

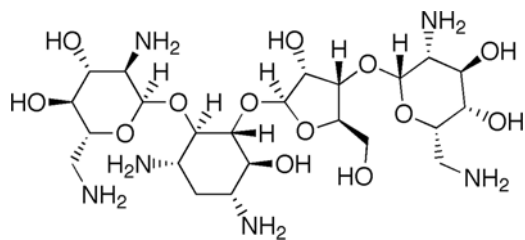


Рис. 1. Структурная формула фрамицетина

Fig. 1. Structural formula of framycetin

Введение

В настоящее время аминогликозидные антибиотики занимают ведущее место в лечении тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваний. Аминогликозиды оказывают бактерицидное действие независимо от фазы размножения микроорганизмов, в том числе и на микроорганизмы, находящиеся в фазе покоя. Поэтому терапевтическая эффективность аминогликозидов, в отличие от бета-лактамов, не снижается при одновременном назначении антибиотиков [1, 2].

Структурная формула фрамицетина — 2-дезоксид-4-О-(2,6-диамино-2,6-дидезокси- α -D-глюкопиранозил)-5-О-[3-О-(2,6-диамино-2,6-дидезокси- β -L-идопиранозил)- β -D-рибофуранозил]-D-стрептамина (неомицина В) — приведена на рис. 1.

Глазные капли «Фрамидекс» производства компании Aseptica (Узбекистан) — комбинированный препарат, который наряду с аминогликозидом фрамицетином содержит также антибиотик грамицидин и кортикостероидное противовоспалительное средство дексаметазон.

Контроль качества субстанций и готовых лекарственных форм препаратов является на сегодняшний день актуальной задачей [3, 4]. Для определения фрамицетина обычно используют микробиологический метод и ВЭЖХ с амперометрическим детектированием. В случае микробиологического метода проведение анализа занимает 4 – 5 дней, а погрешность полученных результатов составляет 15 %. Для ВЭЖХ погрешность составляет приблизительно 2 – 3 %, результат можно получить быстро, но жидкостной хроматограф с амперометрическим детектором доступен не для всех лабораторий.

В процессе приготовления лекарственных препаратов нельзя применять неэкспрессный микробиологический метод, поскольку производственный процесс должен быть непрерывным, а реализация метода ВЭЖХ с амперометрическим детектированием невозможна на фармацевтическом предприятии [5, 6].

В связи с этим необходимо было найти более доступный экспрессный способ определения фрамицетина в препарате. Мы разработали ме-

тодику определения фрамицетина методом ВЭЖХ-УФ, включающую дериватизацию с применением 2,4-динитрофторбензола в качестве дериватизирующего агента, поскольку фрамицетин не обладает способностью светопоглощения.

Цель работы заключалась в оценке метрологических характеристик разработанной методики определения фрамицетина и ее валидации по таким параметрам, как специфичность, предел определения, линейность, правильность, сходимость, внутрилабораторная точность.

Характеристики аналитических методик, определяемые в целях валидации, и соответствующие критерии пригодности валидируемых методик, предназначенных для контроля качества лекарственных средств (фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов) регламентированы в ряде нормативных документов [7 – 11]. Валидации подлежат методики определения примесей и методики определения предельно допустимой концентрации. Методики проверки подлинности подвергаются валидации при необходимости подтвердить их специфичность. Отсутствие специфичности одной аналитической методики может быть компенсировано использованием другой. Доказательство специфичности валидируемой методики обычно основано на рассмотрении данных анализа модельных смесей известного состава, полученных с ее использованием.

Экспериментальная часть

Объектом исследования явились глазные и ушные капли «Фрамидекс», содержащие 5,0 мг/мл фрамицетина сульфата.

Использовали высокоэффективный жидкостной хроматограф LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) (диапазон длин волн — от 190 до 700 нм, длина волны детектирования — 365 нм). Исследования проводили с использованием мерных посуды класса А, аналитических весов (диапазон измерения: от 0,0001 г до 220 г) модель: CY 224 CITIZEN (Индия), pH-метр модель: WTW 7110 (Германия).

В качестве подвижной фазы в ВЭЖХ применяли трехкомпонентные смеси ацетонитрил: 0,5 М серная кислота: буферный раствор трис-(гидроксиметил)аминометана (0,25 %-ный водный раствор) в соотношении 59:1:40 по объему. Хроматографический анализ выполняли в изократическом режиме, применяя колонку Shim-Pack VP-ODS (150 × 4,6 мм, 5 мкм).

Препарат «Фрамидекс» (содержание фрамицетина сульфата — 5,0 мг/мл), соответствующий фармакопейной статье предприятия (ФСП) 42 Уз-26491354-3457-2018, готовили растворением его 80 % (4,0 мг/мл), 90 % (4,5 мг/мл), 100 %

(5,0 мг/мл), 110 % (5,5 мг/мл), 120 % (6,0 мг/мл). В качестве рабочего стандартного образца (PCO) использовали субстанцию фрамицетина сульфата Suzhou Pharmaceutical Technology Co., Ltd (Китай) (содержание активного вещества — 99,85 %). Готовили растворы PCO фрамицетина сульфата с концентрацией 0,2 мг/мл. Проводили дериватизацию полученных растворов PCO, анализируемых растворов и воды (контрольный опыт). В три мерные колбы на 50 мл помещали по 5 мл раствора PCO, анализируемого раствора и воды. В каждую колбу добавляли по 10 мл раствора 2,4-динитрофторбензола и по 10 мл трис-реактива (0,3 %-ный раствор в диметилсульфоксиде). Все три колбы одновременно помещали на водяную баню на 50 мин при температуре 60 °С. Затем колбы охлаждали до комнатной температуры и доводили объем растворов до метки ацетонитрилом. Полученные растворы вводили в хроматограф (объем пробы — 20 мкл), получая не менее 6 хроматограмм для каждого из них [12].

Обсуждение результатов

В ходе разработки методики проводили подбор подвижной фазы, исходя из величины разрешения пиков для разбавленных растворов и литературных данных о разрешении пиков фрамицетина сульфата в ацетонитриле и буферном растворе трис-(гидроксиметил)аминометана [13, 14]. Хроматографирование растворов проводили в оптимизированных условиях, приведенных в работе. Полученные хроматограммы (рис. 2) подтверждают, что условия хроматографирования оптимизированы, пики фрамицетина сульфата и других компонентов препарата разрешены.

Пик, зарегистрированный на хроматограмме в интервале t_r от 1,5 до 5,0 мин (см. рис. 2, а), принадлежит 2,4-динитрофторбензолу, содержание которого в растворе контрольного опыта составляет примерно 20 %.

На хроматограмме PCO (см. рис. 2, б) время удерживания фрамицетина составляет 12,328 мин, а на хроматограмме исследуемого раствора (см. рис. 2, в) — 12,352 мин.

Из рис. 2 видно, что растворители и реактивы, используемые для подготовки пробы, не искажают результат хроматографирования в интервале t_r от 6,0 до 20,0 мин; значения времени удерживания фрамицетина сульфата PCO и исследуемого раствора при хроматографировании в выбранных условиях одинаковы и составляют 12,3 мин (площади пиков — 1 807 609 и 1 792 856 мВ · мин соответственно).

Это указывает на то, что условия определения фрамицетина сульфата *специфичны*.

Линейность. Анализировали растворы препарата с концентрацией действующего вещества

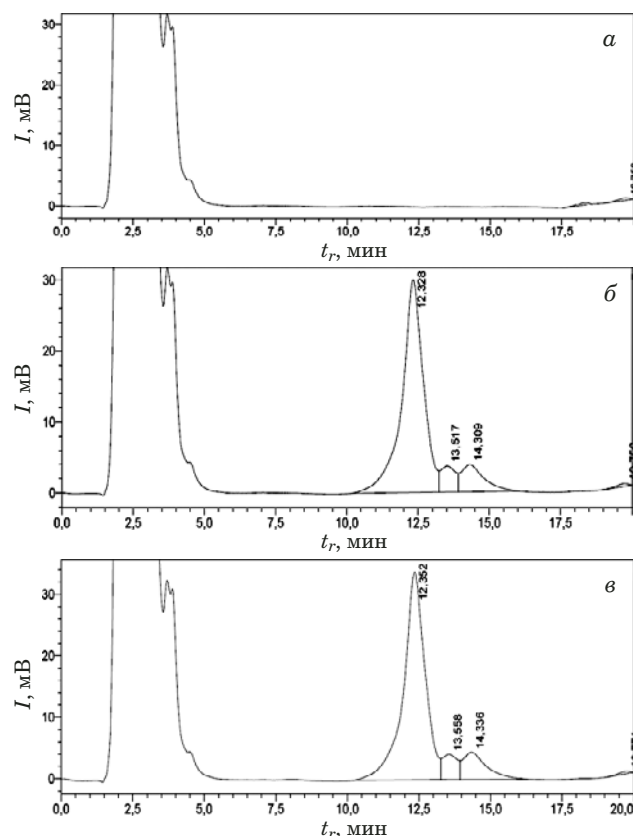


Рис. 2. Хроматограммы раствора контрольного опыта (а), PCO (б) и исследуемого раствора фрамицетина сульфата (в)

Fig. 2. Chromatograms of the blank solution (a), CRS (b) and analyzed solution of framycetin sulfate (c)

от 80 до 120 %: 80, 90, 100, 110, 120 % (по 2 раствора одинаковой концентрации). Результаты анализа приведены в табл. 1.

По полученным данным строили зависимость площади пиков от концентрации фрамицетина

Таблица 1. Площади хроматографических пиков фрамицетина сульфата для растворов разной концентрации

Table 1. Peak areas of the chromatogram obtained at different concentrations of framycetin sulfate

Номер раствора	Уровень концентрации, %	Найденная концентрация, мг/мл (х)	Площадь пика, мВ · мин (у)
1	80	4,03	1 449 012
2	80	4,01	1 436 421
3	90	4,52	1 641 002
4	90	4,51	1 622 530
5	100	5,01	1 802 914
6	100	5,00	1 792 856
7	110	5,50	1 989 072
8	110	5,52	2 000 836
9	120	6,00	2 161 075
10	120	6,02	2 190 531

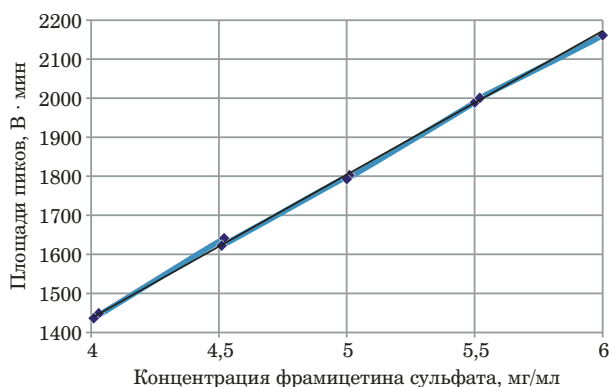


Рис. 3. Зависимость площади пиков от концентрации фрамицетина сульфата (критерий оценки линейности — коэффициент корреляции $\geq 0,99$)

Fig. 3. Dependence of the peak area on the concentration of framycetin sulfate (linearity assessment criteria: correlation coefficient $\geq 0,99$)

сульфата в растворе (рис. 3): $y = 367\,820x - 34\,889$ ($R^2 = 0,9991$).

Сходимость. Для исследования готовили 6 растворов препарата, содержащих 100 % дейст-

вующего вещества. Анализ каждой пробы проводили в разные дни два аналитика с использованием разной мерной посуды (табл. 2).

Результаты статистической обработки полученных данных приведены в табл. 3.

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. Анализировали растворы с концентрацией фрамицетина сульфата от 80 до 120 %: 80, 90, 100, 110, 120 % (по 3 раствора одинаковой концентрации). Результаты анализа приведены в табл. 4.

Результаты статистической обработки полученных данных (%):

среднее значение — 100,14; стандартное отклонение — 0,67; коэффициент вариации — 0,67; границы доверительного интервала ($P = 95\%$) — 99,77 и 100,5 %.

Критерии оценки правильности: коэффициент вариации $\leq 2,0\%$, фактор отклика — среднее значение от 97,5 до 102,5 %.

Таблица 2. Результаты анализа раствора фрамицетина сульфата, полученные двумя аналитиками

Table 2. The results of analysis of framycetin sulfate solutions obtained by chemists 1 and 2

Номер пробы	Площадь пика фрамицетина сульфата, мВ · мин		Определенное содержание фрамицетина сульфата, мг/мл		$X_i - X_{cp}$		$(X_i - X_{cp})^2$	
	1*	2**	1	2	1	2	1	2
1	1 802 914	1 783 571	5,00	4,94	-0,01504	-0,03504	0,00023	0,00123
2	1 792 856	1 860 091	4,97	5,16	-0,04294	0,17708	0,00184	0,03136
3	1 791 271	1 714 473	4,97	4,75	-0,04733	-0,22657	0,00224	0,05134
4	1 762 654	1 799 964	4,89	4,99	-0,12670	0,01041	0,01605	0,00011
5	1 890 257	1 744 258	5,24	4,84	0,22721	-0,14401	0,05162	0,02074
6	1 810 066	1 874 904	5,02	5,20	0,00480	0,21814	0,00002	0,04758
X_{cp}			5,02	4,98				

* Масса навески фрамицетина сульфата — 50,21 мг, площадь пика для PCO фрамицетина сульфата — 1 807 609 мВ · мин.

** Масса навески — 50,04 мг, площадь пика — 1 802 507 мВ · мин.

Таблица 3. Статистические характеристики результатов определения фрамицетина сульфата двумя аналитиками

Table 3. Statistical characteristics of the results of framycetin sulfate determination by chemists 1 and 2 (calculation results obtained after statistical data processing of the convergence parameter)

Характеристика, %	Результаты аналитика 1	Результаты аналитика 2
Наименьшее значение, мг/мл	4,89	4,75
Наибольшее значение, мг/мл	5,24	5,20
Среднее значение	5,02	4,98
Стандартное отклонение	0,02	0,02
Коэффициент вариации	0,41	0,44
Нижняя граница доверительного интервала ($P = 95\%$)	99,88	99,58
Верхняя граница доверительного интервала ($P = 95\%$)	100,74	99,58
$t_{kp}(5\%, 10)$ 2,228		0,214
$F(5\%, 5,5)$ 5,05		1,18

Заключение

Таким образом, разработанная методика определения фрамицетина сульфата методом ВЭЖХ-УФ в препарате «Фрамидекс» (капли глазные и ушные) валидирована в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи (ЕР) и Британской фармакопеи (ВР). По результатам внутрилабораторного эксперимента было установлено, что метрологические характеристики методики (специфичность, сходимость, линейность, правильность и внутрилабораторная прецизионность) не хуже валидационных критериев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гурченко П. А., Околов И. Н. Опыт применения антибактериальных глазных капель в профилактике осложнений фактоэмульсификации катаракты / Материалы II Всероссийской научной конференции. — СПб., 2009. С. 71 – 72.
2. Козлов Р. С., Дехнич А. В. Справочник по антимикробной терапии. — Смоленск: МАКМАХ, 2010. — 416 с.
3. Руководство ВОЗ по требованиям GMP — надлежащей практике организации производства. Ч. 2. Валидация. — Женева, 1999. — 165 с.
4. Злобин В. А., Букреева Л. П., Кузнецов П. Е. и др. Использование ВЭЖХ в анализе опиатов с применением косвенного СФМ-детектирования / Хим.-фарм. журн. 2000. № 5. С. 55 – 56.
5. Рейхарт Д. В., Барам Г. И., Гольдберг Е. Д. и др. Высокоскоростная жидкостная хроматография в контроле качества лекарственных средств / Фарматека. 2005. № 2. С. 77 – 78.
6. McCormick T. J., Foley J. P., Riley C. M., Lloyd D. K. The effect of stationary-phase pore size on retention behavior in micellar liquid chromatography / Anal. Chem. 2000. Vol. 72. N 2. P. 294 – 301.

7. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств. Т. 2 / Под ред. В. П. Георгиевского. — Харьков: НТМТ, 2011. — 474 с.
8. Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / Фармаком. 2006. № 1/2. С. 35 – 44.
9. Береговых В. В. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. — М.: Литтерра, 2008. — 132 с.
10. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B. (Eds.) Clarke's analysis of drugs and poisons. — London: Pharmaceutical-Press, 2004. — 1632 p.
11. Gapparov D. D. Quantitative determination of framycetine sulphate content in the medicine using HPLC method / Proc. of XI International Conference on Chemistry for Young Scientists "Mendeleev 2019". — 457 p. [in Russian].
12. ФСЦ 42 Уз-26491354-3457-2018 на препарат «Фрамидекс» капли глазные и ушные, производитель: ООО «Aseptica». — Ташкент, 2018.
13. European Pharmacopoeia. 8.0. Framycetine sulfate. — Council of Europe, Strasbourg, 2014. P. 2305.
14. Fabre H., Sekkat M., Blanchin M. D., Mandrou B. Determination of aminoglycosides in pharmaceutical formulations — II. High-performance liquid chromatography / J. Pharm. Biomed. Anal. 1989. Vol. 7. N 12. P. 1711 – 1718. DOI: 10.1016/0731-7085(89)80185-2.

REFERENCES

1. Gurchenok P. A., Okolov I. N. The experience of using antibacterial eye drops in the prevention of complications of cataract phacoemulsification: Materials of the II All-Russian Scientific Conference. — St. Petersburg, 2009. P. 71 – 72 [in Russian].
2. Kozlov R. S., Dehnic A. V. Handbook of Antimicrobial Therapy. — Smolensk: MAKMAKh, 2010. 416 p. [in Russian].
3. A WHO guide good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2. Validation. — Geneva, World Health Organization, 1997. — 100 p.

Таблица 4. Результаты оценки правильности определения фрамицетина сульфата

Table 4. The results of assessing the correctness of framycetin sulfate determination

Уровень концентрации, %	Концентрация фрамицетина сульфата, мг/мл	Площадь пика, мВ · мин	Определенное содержание фрамицетина сульфата, мг/мл	Отклонение, %
80	4,03	1 449 012	4,02	0,47
80	4,01	1 436 421	3,98	–0,40
80	4,00	1 429 005	3,96	–0,92
90	4,52	1 641 002	4,55	1,14
90	4,51	1 622 530	4,50	0,00
90	4,51	1 630 117	4,52	0,47
100	5,01	1 802 914	5,00	0,01
100	5,00	1 792 856	4,97	–0,55
100	5,01	1 791 271	4,97	–0,64
110	5,50	1 989 072	5,52	0,30
110	5,52	2 000 836	5,55	0,90
110	5,53	1 973 991	5,47	–0,46
120	6,00	2 161 075	5,99	–0,10
120	6,02	2 190 531	6,08	1,26
120	6,01	2 177 034	6,04	0,63
Среднее				–0,14

Примечание. Масса навески фрамицетина сульфата для РСО — 50,21 мг, площадь пика — 1 807 609 мВ · мин.

4. **Zlobin V. A., Bukreeva L. P., Kuznetsov P. E., et al.** Analysis of opiates by HPLC with indirect spectrophotometric detection / *Pharm. Chem. J.* 2000. Vol. 34. N 5. P. 279 – 280. DOI: 10.1007/BFO.2524642.
5. **Reichart D. V., Baram G. I., Goldberg E. D., et al.** High-performance liquid chromatography in drug quality control / *Farmateka*. 2005. N 2. P. 77 – 78 [in Russian].
6. **McCormick T. J., Foley J. P., Riley C. M., Lloyd D. K.** The effect of stationary-phase pore size on retention behavior in micellar liquid chromatography / *Anal. Chem.* 2000. Vol. 72. N 2. P. 294 – 301.
7. **Georgievsky V. P., Ed.** Analytical chemistry in the creation, standardization and quality control of medicines. Vol. 2. — Khar'kov: NTMT, 2011. — 474 p. [in Russian].
8. **Grizodub A. I.** Standardized validation procedures for drug quality control methods / *Farmakom*. 2006. N. 1/2. P. 35 – 44 [in Russian].
9. **Beregovykh V. V.** Validation of analytical techniques for drug manufacturers: a model guide for a pharmaceutical manufacturing company. — Moscow: Litterra, 2008. — 132 p. [in Russian].
10. **Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B. (Eds.)** Clarke's analysis of drugs and poisons. — London: Pharmaceutical-Press, 2004. — 1632 p.
11. **Gapparov D. D.** Quantitative determination of framycetine sulphate content in the medicine using HPLC method / *Proc. of XI International Conference on Chemistry for Young Scientists "Mendeleev 2019"*. — 457 p. [in Russian].
12. FSP 42 Uz-26491354-3457-2018 for the drug "Framidex" eye and ear drops, manufacturer: LLC "Aseptika", Tashkent, 2018.
13. *European Pharmacopoeia*. 8.0. Framycetine sulfate. — Council of Europe, Strasbourg, 2014. P. 2305.
14. **Fabre H., Sekkat M., Blanchin M. D., Mandrou B.** Determination of aminoglycosides in pharmaceutical formulations — II. High-performance liquid chromatography / *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1989. Vol. 7. N 12. P. 1711 – 1718. DOI: 10.1016/0731-7085(89)80185-2.