

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 18, №3

2019



ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.544.943.3.068.7:615.07

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИНЕЗОЛИДА

© Тютрина В.А.¹, Чмелевская Н.В.², Илларионова Е.А.¹

¹Иркутский государственный медицинский университет, Россия, 664003, Иркутск, ул. Красного восстания, 1

²Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы, Россия, 664022, Иркутск, Бульвар Гагарина, 4

Резюме

Цель. Разработка унифицированной методики спектрофотометрического определения линезолида в субстанции и таблетках с применением оптического образца сравнения.

Методика. Исследовались оптические свойства линезолида, его растворимость и стабильность. На основании полученных данных осуществлялся выбор оптимального оптического образца сравнения, с применением которого проводился количественный анализ линезолида в субстанции и таблетках спектрофотометрическим методом.

Результаты. Обоснованы оптимальные условия определения: растворитель – спирт этиловый 95%, оптический образец сравнения – гексацианоферрат (III) калия (калия феррицианид); аналитическая длина волны – 258 нм. Определен коэффициент пересчета. Проведен валидационный анализ предложенной методики. Критерии, по которым была валидирована методика и доказана её пригодность: аналитическая область методики, сходимость, линейность, специфичность, воспроизводимость. Относительное стандартное отклонение для субстанции линезолида составило не более 0,01, для таблеток не более 0,02. Относительная ошибка определения линезолида для субстанции не превышает 0,68%, для таблеток 1,28%.

Заключение. Полученные результаты подтвердили пригодность методики для осуществления целей, для которых она предназначена.

Ключевые слова: ультрафиолетовый спектр, линезолид, оптический образец сравнения, спектрофотометрическое определение, калия феррицианид, коэффициент пересчёта

SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS OF LINEZOLID

Tyutrina V.A.¹, Chmelevskaya N.V.², Illarionova E.A.¹

¹Irkutsk State Medical University, 1, Krasnogo vosstaniya St., 664003, Irkutsk, Russia

²Irkutsk Regional Forensic Bureau, 4, Gagarina Boulevard, 664022, Irkutsk, Russia

Abstract

Objective. To develop a unified method for the spectrophotometric determination of linezolid in substance and tablets using an optical reference sample.

Methods. The optical properties of linezolid, its solubility and stability were investigated. On the basis of the obtained data, the choice of the optimal optical reference sample was carried out, with the use of which the quantitative analysis of linezolid in the substance and tablets was carried out by the spectrophotometric method.

Results. Optimal conditions for determination were substantiated: solvent - 95% ethyl alcohol, optical reference sample – potassium hexacyanoferrate (III) (potassium ferricyanide); analytical wavelength – 258 nm. The conversion factor was determined. Validation analysis of the proposed method was conducted. The criteria by which the methodology was validated and proved its suitability are the analytical area of the methodology, convergence, linearity, specificity, reproducibility. The relative standard deviation for the linezolid substance was below 0.01, for tablets – below 0.02. The relative error in the determination of linezolid for the substance did not exceed 0.68%, for tablets - 1.28%.

Conclusion. The results obtained confirmed the suitability of the methodology for the implementation of the purposes for which it is intended.

ed the suitability of the methodology for the implementation of the purposes for which it is intended.

Keywords: ultraviolet spectrum, linezolid, optical reference sample, spectrophotometric determination, potassium ferricyanide, conversion factor

Введение

Антибактериальные препараты являются важнейшим компонентом в терапии инфекционно-воспалительных заболеваний. Учитывая, что бактерии способны адаптироваться к воздействию таких средств и в дальнейшем проявлять резистентность к ним, разрабатываются новые, более сильные и эффективные медикаменты. Одновременно с этим, к их качеству предъявляются особые требования. Следовательно, совершенствование существующих и разработка новых методов контроля качества современных препаратов является актуальной и важной задачей фармацевтического анализа.

Линезолид – первый представитель нового класса антибиотиков – оксазолидинонов [5, 6]. Механизм действия данного синтетического противомикробного средства обусловлен селективным ингибированием синтеза белка путём нарушения процесса трансляции в бактериальной рибосоме [7]. Благодаря уникальному механизму его действия, перекрестная резистентность с антибиотиками других классов не развивается. Это положительное свойство линезолида делает его ценным препаратом для лечения тяжелых инфекций, вызванных бактериями, устойчивыми к другим антибиотикам.

Проведя анализ нормативных документов [3, 4], было установлено, что для количественной оценки субстанции и препаратов линезолида, зарубежными фармакопеями рекомендуется использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Данный метод позволяет получить надёжные результаты, но его применение ограничено, так как он является дорогостоящим и требующим большого количества государственных стандартных образцов (ГСО) и различных реактивов. Помимо этого, данный метод оценки качества линезолида обладает некоторыми недостатками: применение токсичных растворителей, трудоёмкость, длительность выполнения. Это указывает на то, что разработка альтернативного метода анализа линезолида является значимой.

Такой оптический метод анализа как спектрофотометрия, в ряде случаев имеет существенное преимущество перед другими методами. В частности, отличается простотой методик анализа, экспрессностью, доступностью, отсутствием высокотоксичных реактивов. Его применение позволит уменьшить стоимость, токсичность и погрешность анализа, повысить воспроизводимость. Следовательно, использование спектрофотометрического метода анализа для осуществления поставленной цели является перспективным, но может быть затруднено дефицитом или малодоступностью ГСО линезолида. Производство ГСО является дорогостоящим, поэтому часто возникает необходимость применять оптические образцы сравнения, которые могут их заменить.

Целью работы явилось проведение оптимизации условий спектрофотометрического анализа линезолида в субстанции и таблетках с применением оптического образца сравнения.

Методика

Аналізу подвергались: отвечающие требованиям нормативных документов фармацевтическая субстанция-порошок и таблетки 200 мг линезолида 2-х серий выпуска, калия феррицианид квалификации «ч.д.а.». Применяемые реактивы: вода очищенная, спирт этиловый 95%, раствор 0,1М HCl (приготовлен из фиксанала) и раствор 0,1М NaOH (приготовлен из фиксанала). Показатель величины pH контролировался универсальным ионометром ИТ-1101 (ООО «Измерительная техника», г. Москва). Для измерения оптической плотности растворов и регистрации электронных спектров применялся спектрофотометр СФ-2000 (ЗАО @ОКБ СПЕКТР@, г. Санкт-Петербург). Исследование проводилось в кварцевых кюветах (толщина слоя 1 см) на фоне растворителя. Результаты экспериментальных исследований статистически обработаны с применением пакета программ для Windows XP (Microsoft Excel), используя t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при доверительной вероятности $p < 0,05$. [1].

Методика количественного анализа линезолида в субстанции: точную навеску субстанции линезолида (около 0,0500 г) количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл спирта этилового 95%, доводят объём раствора до метки водой очищенной и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают аликвотную часть раствора 1 мл,

доводят до метки спиртом этиловым 95% и перемешивают. Измерение оптической плотности испытуемого раствора проводят на спектрофотометре в кюветах с толщиной слоя 1 см при длине волны 258 нм. Спирт этиловый 95% используют в качестве раствора сравнения. Одновременно проводят измерение оптической плотности раствора калия феррицианида.

Методика приготовления раствора калия феррицианида: точную навеску калия феррицианида (около 0,1900 г) количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл раствора 0,1М хлористоводородной кислоты, доводят этим же растворителем объём раствора до метки и перемешивают. В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают аликвотную часть раствора 5 мл, доводят объём раствора спиртом этиловым 95% до метки и перемешивают.

Методика количественного анализа линезолида в таблетках: точную массу растёртых таблеток (0,0696 г для дозировки 0,2 г) количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл спирта этилового 95%, доводят объём раствора водой очищенной до метки и перемешивают. Раствор фильтруют, первые 10-15 мл фильтрата отбрасывают и 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят спиртом этиловым 95% объём раствора до метки и перемешивают.

Результаты исследования и их обсуждение

Для разработки методики количественного определения исследуемого лекарственного вещества необходимо провести оптимизацию условий спектрофотометрического анализа.

Линезолид по химической структуре относится к производным ароматического и гетероциклического рядов, что обуславливает его способность в ультрафиолетовой области спектра поглощать энергию. Проведённые исследования показали, что в диапазоне длин волн 200-400 нм спектры поглощения линезолида при различных значениях pH (в интервале от 1,0 до 12,5) характеризуются одной полосой поглощения и имеют максимумы: 258±1 нм в спирте этиловом 95% при pH 5,5; 244±1 нм в растворе 0,1 М HCl при pH 1,0; 251±1 нм в воде очищенной при pH 6,4; 250±1 нм в растворе 0,1 М NaOH при pH 12,5 (рис.).

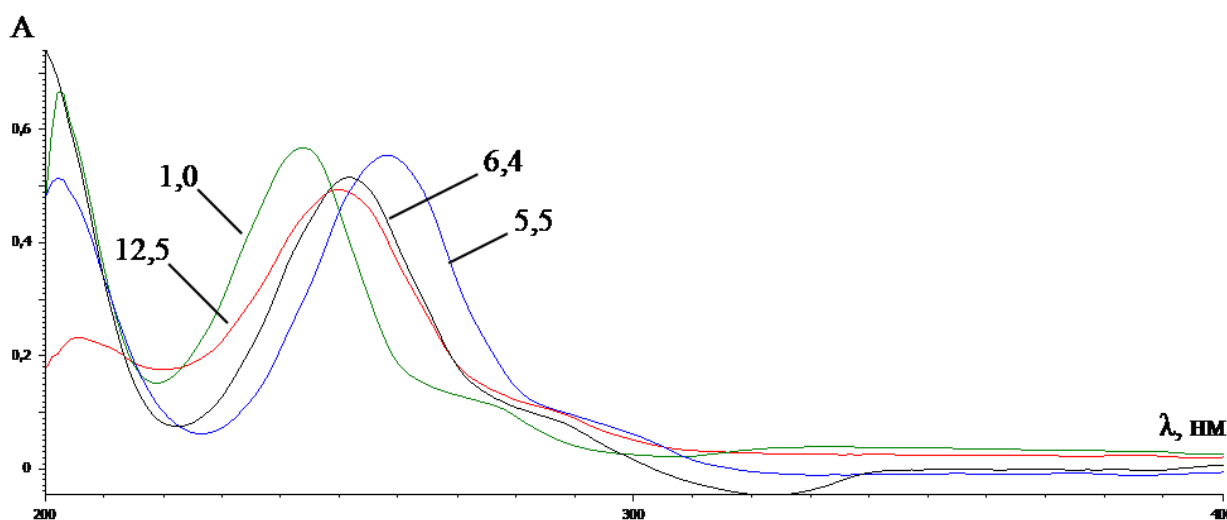


Рис. Спектры поглощения 0,001% раствора линезолида при различных pH. Номер кривой соответствует значению pH

Важное значение для разработки оптимальных условий количественного определения спектрофотометрическим методом имеет стабильность приготовленного испытуемого раствора. Для изучения стабильности были приготовлены растворы исследуемого вещества в таких растворителях, которые не поглощают ультрафиолетовые лучи. Анализ зависимости спектральных характеристик линезолида от pH в течение суток показал, что для растворов с pH 1,1; 5,5 и 6,4, не наблюдается существенных изменений, что свидетельствует о стабильности линезолида в данных растворителях. При pH 12,5 происходит постепенное снижение оптической плотности во времени. На основании полученных результатов, спирт этиловый 95% и вода очищенная являются наиболее подходящими растворителями и были выбраны для спектрофотометрического анализа в качестве оптимальных. Использование спирта этилового 95% также обусловлено тем, что линезолид в нём

обладает хорошей растворимостью. Водой очищенной доводится до объёма приготовленный раствор первого разведения. Растворитель для приготовления раствора второго разведения – спирт этиловый 95%.

Следующим этапом для разработки методики количественного определения линезолида в субстанции и таблетках является выбор оптического образца сравнения. В ходе эксперимента, учитывая выше перечисленные влияющие факторы, предложен калия феррицианид. Данный оптический образец сравнения выпускается промышленностью квалификации «ч.д.а.» и имеет ГОСТ 4206-75. Оптимальным интервалом, при котором можно его применять как оптический образец сравнения, является диапазон 255-267 нм [2]. Обязательным условием выбора оптического образца сравнения является тот факт, что аналитическая длина волны исследуемого вещества должна попадать в данный оптимальный интервал. Длина волны 258 нм является максимумом поглощения линезолида в спирте этиловом 95% и входит в выше представленный интервал. Это указывает на то, что для количественного определения исследуемого вещества спектрофотометрическим методом при использовании спирта этилового 95% как растворителя, в качестве оптимального оптического образца сравнения можно предложить калия феррицианид. Так как линезолид и калия феррицианид отличаются по химическому составу и их удельные показатели поглощения не совпадают, необходимо произвести расчёт коэффициента пересчёта (табл. 1).

Таблица 1. Расчёт коэффициента пересчёта по калия феррицианиду для спектрофотометрического определения линезолида

Метрологические характеристики (n=10, P = 0,95%)						
$K_{пер}$	S^2	S	$S \bar{X}$	$\Delta \bar{X}$	$\bar{E} \%$	S_r
0,0524	$2,41 \cdot 10^{-7}$	$4,91 \cdot 10^{-4}$	$1,55 \cdot 10^{-4}$	$3,51 \cdot 10^{-4}$	0,67	0,0094

Применяя оптимальные условия для количественного определения линезолида, полученные в ходе эксперимента, была разработана методика спектрофотометрического анализа субстанции и таблеток линезолида. В табл. 2 представлены результаты количественного анализа линезолида в субстанции.

Таблица 2. Количественное определение по калия феррицианиду линезолида субстанции методом УФ-спектрофотометрии

Оптический образец сравнения	Метрологические характеристики (n = 10, p = 95%)						
	$\bar{X}, \%$	S^2	S	S_x	$\Delta \bar{X}$	$\bar{E}, \%$	S_r
Калия феррицианид	99,92	0,8973	0,9473	0,2996	0,68	0,68	0,0094

Методика, используемая для количественного определения линезолида в таблетках, аналогична разработанной методике анализа линезолида в субстанции. Отличие состоит только в методике приготовления испытуемого раствора. В табл. 3 представлены результаты количественного анализа линезолида в таблетках. Для того чтобы аналитическая методика гарантировала достоверные и точные результаты анализа, необходимо провести её валидацию. Результаты, представленные в табл. 4, свидетельствуют о пригодности методики.

Таблица 3. Количественное определение по калия феррицианиду линезолида в таблетках 200 мг методом УФ-спектрофотометрии

Серия	Метрологические характеристики (n = 10, p = 95%)						
	\bar{X}	S^2	S	S_x	ΔX	E, %	S_r
150916	100,38	3,2104	1,7918	0,5666	1,28	1,28	0,018
120916	99,06	2,6107	1,6158	0,5110	1,15	1,17	0,016

Заключение

Разработана унифицированная методика спектрофотометрического определения линезолида в субстанции и таблетках с применением оптического образца сравнения. Данный метод отличается тем, что он доступен и не трудоёмок, для его проведения не требуются дорогостоящие и токсичные реактивы. Его использование позволит уменьшить стоимость, токсичность и погрешность анализа, повысить воспроизводимость. Установлено, что разработанная методика количественного определения линезолида спектрофотометрическим методом позволяет получить достаточно надежные и воспроизводимые результаты для предполагаемой области применения.

Таблица 4. Валидационная оценка методики спектрофотометрического определения линезолида

Параметр	Критерий валидности	Результаты испытания линезолида	
		В субстанции	В таблетках
Специфичность	Стандартный образец линезолида	Специфична	Специфична
Сходимость	$RSD < 2\%$ $t_{\text{табл}} \geq t_{\text{выч}}$	$RSD=0,60$, $t_{\text{выч}}=0,19$ ($t_{\text{табл}}=2,26$), $n=10$	$RSD=0,78$, $t_{\text{выч}}=1,01$ ($t_{\text{табл}}=2,26$), $n=10$
Воспроизводимость	$RSD < 3\%$ $t_{\text{табл}} \geq t_{\text{выч}}$	$RSD=0,73$, $t_{\text{выч}}=0,77$ ($t_{\text{табл}}=2,26$), $n=10$	$RSD=1,28$, $t_{\text{выч}}=0,67$ ($t_{\text{табл}}=2,26$), $n=10$
Линейность	$r \geq 0,999$	$R^2 = 0,9995$; $y = 54,22x + 0,017$	$R^2 = 0,9995$; $y = 54,22x + 0,017$
Аналитическая область методики	Интервал концентраций	2,5-15 мкг/мл	2,5-15 мкг/мл

Примечание: RSD – стандартное отклонение; R^2 – коэффициент корреляции

Литература (references)

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. – М., 2015. – Т.1. – 1470 с. [*Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federatsii. 13-e izd. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13nd ed. – Moscow, 2015. – V.1. – 1470 p. (in Russian)*]
2. Илларионова Е.А., Кузнецова А.Н. Разработка методики количественного определения клотримазола // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2014. – Т.124, №1. – С. 75-77. [Illarionova E.A., Kuznecova A.N. *Sibirskij Medicinskij Zurnal (Irkutsk)*. Siberian Medical Journal (Irkutsk). – 2014. – V.124, N1. – P. 75-77. (in Russian)]
3. Нормативный документ ФС 000704-120913. Линезолид. – М., 2013. – 17 с. [*Normativnyj dokument FS 000704-120913. Linezolid. Normative document FS 000704-120913. Linezolid. – Moscow, 2013. – P. 17. (in Russian)*]
4. Нормативный документ 002276-111013. Линезолид, таблетки покрытые оболочкой 200 мг. – М., 2013. – 2 с. [*Normativnyj dokument 002276-111013. Linezolid, tabletki pokrytye obolochkoj 200 mg. Normative document 002276-111013. Linezolid, coated tablets 200 mg. – Moscow, 2013. – P. 2. (in Russian)*]
5. Cepeda J.A., Whitehouse T., Cooper B. et al. Linezolid versus teicoplanin in the treatment of gram-positive infections in the critically ill: a randomized, doubt-blind, multicentre study // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2004. – N53. – P. 345-355.
6. Moellering R.C. Linezolid: The first oxazolidinone antimicrobial // *Annals of Internal Medicine*. – 2003. – N138. – P. 135-142.
7. Shinabarger D.L., Merotti K.R., Murray A.H. et al. Mechanism of action of oxazolidinones: effect of Linezolid and eperezolid on translation reactions // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1997. – N41. – P. 2132-2136.

Информация об авторах

Тютрина Вера Александровна – аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: ultr4vox@yandex.ru

Чмелевская Наталья Владимировна – кандидат фармацевтических наук, заведующая судебно-химическим отделением ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы». E-mail: ultr4vox@yandex.ru

Илларионова Елена Анатольевна – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: illelena24@mail.ru