

УДК 615.072

3.4.1 Промышленная фармация и технология получения лекарств

DOI: 10.37903/vsgma.2024.1.29 EDN: RJNTTB

ИЗУЧЕНИЕ И ВАЛИДАЦИЯ УСЛОВИЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ**© Коновалова С.С., Илларионова Е.А.***Иркутский государственный медицинский университет, Россия, 664003, Иркутск, ул. Красного Восстания, 1**Резюме*

Цель. Изучение условий идентификации и количественной оценки противотуберкулезных препаратов рифабутин, перхлорзон и теризидон методом ВЭЖХ на приборе отечественного производства.

Методика. Объектами исследования являлись субстанции рифабутин, перхлорзон и теризидон и готовые лекарственные формы их содержащие. Исследование проводилось на микроколоночном хроматографе российского производства «Милихром А-02».

Результаты. В ходе работы изучены оптимальные условия хроматографического определения исследуемых веществ, разработаны селективные и экспрессные методики их количественного определения в капсулах (рифабутин и теризидон) и таблетках (перхлорзон). Данные, полученные в результате анализа с применением разработанных методик, статистически обработаны, относительная ошибка не превышала 1,18 % для рифабутин; 1,19 % для перхлорзона и 1,34 % для теризидона.

Заключение. Пригодность разработанных методик подтверждена в ходе валидационной оценки, получаемые результаты надежны и воспроизводимы.

Ключевые слова: туберкулез, перхлорзон, рифабутин, теризидон, высокоэффективная жидкостная хроматография

STUDY AND VALIDATION OF THE CONDITIONS FOR THE CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF ANTI-TUBERCULOSIS DRUGS**Konvalova S.S., Illarionova E.A.***Irkutsk State Medical University, 1, Krasny Vosstaniya St. 664003, Irkutsk, Russia**Abstract*

Objective. To study the conditions for the identification and quantification of anti-tuberculosis drugs rifabutin, perchlorosone and terizidone by HPLC on a domestic device.

Methods. The objects of the study were the substances rifabutin, perchlorosone and terizidone and ready-made dosage forms containing them. The study was carried out on a microcolumn chromatograph manufactured in Russia «Milichrome A-02».

Results. In the course of the work, optimal conditions for the chromatographic determination of the studied substances were assessed, selective and express methods for their quantitative determination in capsules (rifabutine and terizidone) and tablets (perchlorosone) were developed. The data obtained as a result of the analysis using the developed methods were statistically processed, the relative error did not exceed 1,18% for rifabutin; 1,19% for perchlorosone and 1,34% for terizidone.

Conclusions. The suitability of the developed methods has been confirmed during the validation assessment, the results obtained are sufficiently reliable and reproducible.

Keywords: tuberculosis, perchlorosone, rifabutine, terizidone, high-performance liquid chromatography

Введение

Туберкулез – опасное инфекционное заболевание, до сих пор являющееся одной из ведущих причин смертности. Несмотря на снижение общей заболеваемости, с каждым годом увеличивается число более опасных форм туберкулеза – с широкой и множественной устойчивостью [9]. Причины возникновения резистентности микобактерий к существующей терапии различны. Залог эффективной терапии – обеспечение точности дозирования лекарственного препарата за счет количественного состава лекарственной формы, соответствующей требованиям нормативной документации [3].

Основа безопасности и эффективности любого лекарственного препарата – его качество. Для оценки данной характеристики современный фармацевтический анализ располагает широким спектром методов, основанных на протекании физических и химических процессов и их комбинации. В первую очередь Государственная фармакопея РФ предлагает к использованию именно физико-химические методы, как более чувствительные и селективные. Но далеко не все из существующих методов доступны абсолютно всем лабораториям. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволяет комплексно проводить оценку качества субстанций и лекарственных форм. Для количественной оценки исследуемых препаратов рифабутина, перхлорона и теризидона в литературе [1, 4, 15] и нормативной документации [5, 6, 7, 8, 10, 11] предложены методики, ориентированные на использование импортного оборудования и комплектующих, однако высокая стоимость хроматографов, расходных материалов и реактивов особой степени очистки и в целом приостановление сотрудничества с зарубежными производителями оборудования в виду антироссийских санкций может стать серьезным препятствием для широкого использования метода в небольшой лаборатории [13]. Одним из шагов к повышению доступности может стать применение прибора отечественного производства и микроколонок. Уменьшение размеров колонки позволяет сократить расход элюентов и сорбентов, временные затраты на осуществление анализа, а снижение рабочего давления позволяет предъявлять менее жесткие требования к оборудованию [12].

Целью исследования являлось изучение особенностей хроматографического определения, разработка и валидация методик количественной оценки рифабутина, перхлорона и теризидона в субстанции и лекарственной форме с применением хроматографического оборудования российского производства.

Методика

В качестве объектов исследования выступали субстанции противотуберкулезных препаратов: рифабутин, перхлорон и теризидон и их лекарственные формы: капсулы Фарбутин 150 мг (производство АО «Фармасинтез»); таблетки, покрытые пленочной оболочкой Перхлорон 200 мг и 400 мг (производство АО «Фармасинтез»); капсулы Локсидон 150 мг, 250 мг и 300 мг (производство АО «Фармасинтез»). Хроматографирование выполняли на отечественном микроколоночном жидкостном хроматографе с УФ-спектрофотометрическим детектором «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», Новосибирск) с колонкой (75 x 2 мм), заполненной обращенной фазой ProntoSIL-120-5-C18 AQ («Bischoff Analysentechnik und Gerate GmbH», Германия). Для приготовления растворов и приготовления элюентов использовали растворители: метанол (перегоняли перед использованием), ацетонитрил (НПК «Криохром», сорт 0, г. Санкт-Петербург, Россия), диметилсульфоксид (АО «Усолье-Сибирский химфармзавод», г Усолье-Сибирское, Россия), ацетат аммония (ООО «Компания Хеликон», Москва, Россия) и дистиллированную воду и оборудование: центрифугу «Eppendorf» (13200 об./мин); pH-метр «Анион 4100»; ванну ультразвуковую «Sonorex» («Bandelin», Германия). Обработку данных осуществляли с помощью программы МультиХром. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью методов вариационной статистики, регрессионного анализа в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [2].

С применением методов вариационной статистики оценивали однородность выборки и расчет показателей: среднего значения, дисперсии S^2 , стандартного отклонения S , стандартного отклонения среднего результата S_r , полуширины доверительного интервала Δx , относительной ошибки результата единичного определения $E, \%$ и относительного стандартного отклонения S_x . Регрессионный анализ применяли для оценки линейности методик с помощью метода наименьших квадратов.

Методика приготовления разведения лекарственной формы рифабутин. Точную навеску содержимого капсул рифабутин (около 0,2500 г) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл,

растворяли в 20 мл метанола и доводили до метки тем же растворителем. Аликвоту 1 мл помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят до метки метанолом. Аликвоту суспензии объемом около 1 мл переносили в пробирку и центрифугируют (5 мин., 13400 оборотов/минуту). Супернатант использовали для хроматографического анализа. Раствор готовили перед использованием.

Методика приготовления рабочего стандартного образца рифабутина. Точную навеску субстанции рифабутина (около 0,0500 г) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл метанола и доводили до метки тем же растворителем. Раствор готовили перед использованием. Хранят в темноте.

Методика приготовления разведения лекарственной формы перхлозона. Точную навеску растертых таблеток перхлозона около (0,1000 г) помещали в мерную колбу объемом 100 мл, добавляют 50 мл метанола, обрабатывали в УЗ ванне (подробнее об этом 15 мин, $T_{\text{комн.}}$) и доводили до метки метанолом. Аликвоту 5 мл помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили до метки тем же растворителем. Аликвоту суспензии объемом около 1 мл переносили в пробирку и центрифугируют (5 мин., 13 400 об/мин). Супернатант использовали для хроматографического анализа. Раствор готовили перед использованием.

Методика приготовления разведения рабочего стандартного образца перхлозона. Точную навеску субстанции перхлозона (около 0,1500 г) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл метанола и доводили до метки тем же растворителем. Аликвоту 25 мл помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки тем же растворителем.

Методика приготовления разведения лекарственной формы теризидона. Точную навеску содержимого капсул теризидона (около 0,1000 г) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 1,5 мл диметилсульфоксида (ДМСО), 20-25 мл раствора ацетонитрил : вода (50:50), обрабатывали в УЗ ванне (15 мин., $T_{\text{комн.}}$) и доводили до метки тем же растворителем. Аликвоту 5 мл помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл доводили до метки раствором ацетонитрил: вода (50:50). Аликвоту суспензии объемом около 1 мл переносили в пробирку и центрифугировали (5 мин., 13400 оборотов/минуту). Супернатант использовали для хроматографического анализа. Раствор готовили перед использованием.

Методика приготовления разведения рабочего стандартного образца теризидона. Точную навеску субстанции теризидона (около 0,0100 г) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 1,5 мл диметилсульфоксида (ДМСО), 25 мл раствора ацетонитрил: вода (50:50), обрабатывали в УЗ ванне (15 мин, $T_{\text{комн.}}$) и доводили до метки раствором ацетонитрил: вода (50:50).

Результаты исследования и их обсуждение

В процессе подбора оптимальных условий хроматографирования (табл. 1) исследуемых веществ было учтено влияние различных факторов. С целью минимизации взаимодействий образцов с неподвижной фазой в виду наличия в структуре атомов азота, имеющих не поделенную электронную пару, использовался полимерный сорбент ProntoSIL-120-5 C18 AQ с гидрофильным эндкеппингом. Растворители, предлагаемые в качестве подвижной фазы, обладали высокой прозрачностью и не содержали примесей поглощающих УФ-излучение. Экспериментально подобранные оптимальные условия хроматографирования исследуемых веществ представлены в табл. 1.

Использование данных составов подвижной фазы обеспечивает получение симметричных пиков на хроматограмме (рис. 1-3), что подтверждают данные расчета коэффициента асимметрии пиков (не более 1,5). Подтверждение идентичности исследуемых веществ производилось по соответствию объемов удерживания исследуемых и стандартных растворов. Повышение точности определения достигалось расчетом спектральных отношений. Параметры пригодности хроматографической системы представлены в табл. 2.

Таблица 1. Оптимальные хроматографические условия определения рифабутина, перхлозона и теризидона

Хроматографический параметр	Рифабутин	Перхлозон	Теризидон
-----------------------------	-----------	-----------	-----------

Колонка	2×75 мм; ProntoSIL-120-5 C18 AQ	2×75 мм; ProntoSIL-120-5 C18 AQ	2×75 мм; ProntoSIL-120-5 C18 AQ
Состав подвижной фазы	Элюент А: Аммония ацетата раствор 0,02 М (рН 6,5); Элюент Б: Ацетонитрил	Элюент А: Аммония ацетата раствор 0,02 М (рН 6,5); Элюент Б: Ацетонитрил	Элюент А: 0,1% раствор трифторуксусной кислоты в воде; Элюент Б: 0,1% раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле
Режим элюирования	изократический, 70% Б	изократический, 15% Б	изократический, 25% Б.
Скорость потока	150 мкл/мин	150 мкл/мин	150 мкл/мин
Температура термостата	35°C	35°C	35°C
Объем вводимой пробы	2 мкл	2 мкл	2 мкл
Длина волны	240	312	260

Таблица 2. Характеристики пригодности хроматографической системы.

Препарат	Площадь пика	Коэффициент асимметрии	Количество теоретических тарелок	Объем удерживания, мкл
Перхлозон	73,38	1,11	6630	698
Рифабутин	40,55	0,90	3716	902
Теризидон	25,72	1,0	2548	865

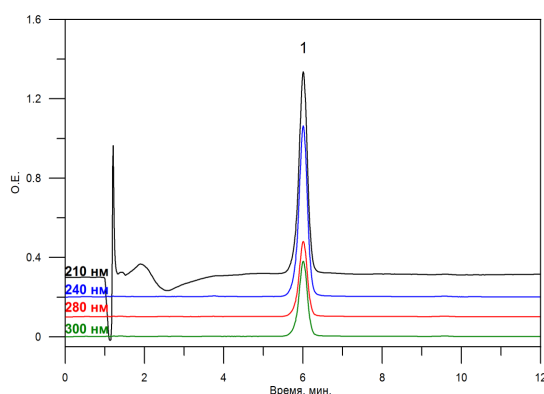


Рис. 1. Хроматограмма разведения рабочего стандартного образца рифабутина: пик 1 – рифабутин

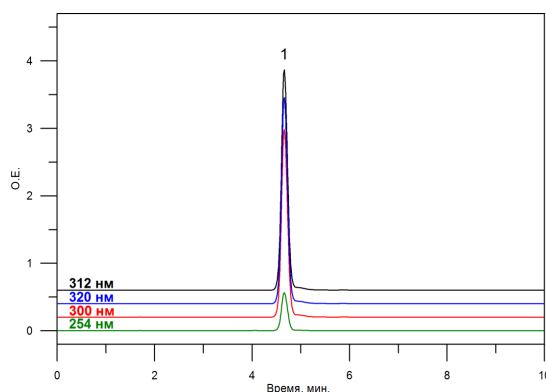


Рис. 2. Хроматограмма разведения рабочего стандартного образца перхлозона: пик 1 – перхлозон

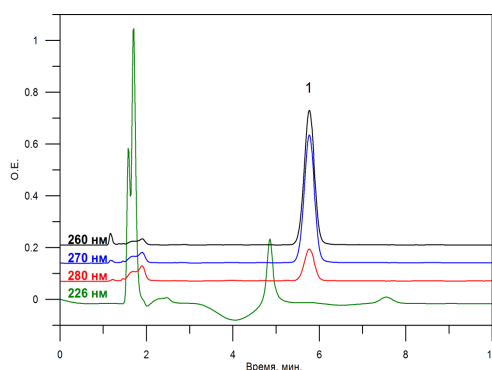


Рис. 3. Хроматограмма разведения рабочего стандартного образца теризидона: пик 1 – теризидон

Вышеописанные условия были использованы для количественной оценки лекарственных форм, содержащих определяемые вещества (табл. 3). Все полученные экспериментальные данные статистически обработаны, относительная ошибка определения не превышает 2%.

Таблица 3. Результаты количественного анализа содержания рифабутина, перхлозона и теризидона в лекарственных формах.

ГЛФ	Содержание, г	Серия	X, г	Метрологические характеристики (n=10, P=95%, t _{табл} =2,26)
Фарбутин, капсулы	150 135-165	191118	0,1503	S ² =6,23×10 ⁻⁶ ; S=0,0025; Sx=0,0019; Δx=0,0018; E,%=1,18; Sr=0,0166
		180621	0,1501	S ² =5,43×10 ⁻⁶ ; S=0,0023; Sx=0,0017; Δx=0,0017; E,%=1,10; Sr=0,0155
		100321	0,1507	S ² =4,01×10 ⁻⁶ ; S=0,002; Sx=0,0022; Δx=0,0013; E,%=0,95; Sr=0,0150
Перхлозон, таблетки покрытые оболочкой	200 190-210	41220	0,2009	S ² =1,12×10 ⁻⁵ ; S=0,0033; Sx=0,0025; Δx=0,0024; E,%=1,19; Sr=0,0167
		41020	0,1999	S ² =8,54×10 ⁻⁵ ; S=0,0029; Sx=0,0023; Δx=0,0021; E,%=1,04; Sr=0,0146
	400 380-420	31220	0,4036	S ² =3,73×10 ⁻⁵ ; S=0,0061; Sx=0,0048; Δx=0,0044; E,%=1,08; Sr=0,0151
		60918	0,4033	S ² =4,05×10 ⁻⁵ ; S=0,0064; Sx=0,0051; Δx=0,0045; E,%=1,13; Sr=0,0158
Локсидон, капсулы	150 135-165	10422	0,1499	S ² =4,54×10 ⁻⁶ ; S=0,0021; Sx=0,0015; Δx=0,0015; E,%=1,02; Sr=0,014
		10022	0,1504	S ² =3,82×10 ⁻⁶ ; S=0,0019; Sx=0,0015; Δx=0,00139; E,%=0,92; Sr=0,0129
	250 225-275	30422	0,2501	S ² =1,33×10 ⁻⁵ ; S=0,0037; Sx=0,0024; Δx=0,0026; E,%=1,04; Sr=0,0146
		29522	0,2502	S ² =1,55×10 ⁻⁵ ; S=0,0039; Sx=0,0026; Δx=0,0028; E,%=1,12; Sr=0,0157
	300 270-330	260219	0,3024	S ² =3,25×10 ⁻⁵ ; S=0,0057; Sx=0,0044; Δx=0,0041; E,%=1,34; Sr=0,0189
		240519	0,3026	S ² =2,74×10 ⁻⁵ ; S=0,0052; Sx=0,0042; Δx=0,0037; E,%=1,23; Sr=0,0173

Примечание: n – объем выборки, t_{табл} – табличное значение критерия Стьюдента, при доверительной вероятности 95%, \bar{X} – среднее значение результата, S² – дисперсия, S – стандартное отклонение, Sx – стандартное отклонение среднего результата, Δx – полуширина доверительного интервала величины, E,% – относительная ошибка среднего результата, Sr – относительное стандартное отклонение

Работоспособность разработанных методик подтверждена в процессе валидации. Полученные данные не превышают допустимых значений и характеризуют такие валидационные параметры, как специфичность, линейность, правильность, прецизионность (табл. 4) [14].

Таким образом, анализ приведенных данных свидетельствует, что разработанные методики характеризуются селективностью и экспрессивностью, позволяют идентифицировать и количественно оценить содержание действующего вещества в лекарственных формах,

содержащих рифабутин, перхлозон и теризидон. Внедрение описанных методик в практику позволит снизить стоимость и трудоемкость анализа.

Таблица 4. Параметры валидационной оценки методик количественного определения перхлозона, рифабутина и теризидона

Критерии валидности	Допустимые значения	Полученные результаты		
		Перхлозон	Рифабутин	Теризидон
Специфичность	-	Специфична	Специфична	Специфична
Прецизионность: Сходимость	RSD \leq 2,0%	1,51	1,32	1,72
Воспроизводимость	RSD \leq 2,0%	1,94	1,89	1,97
Правильность	$t_{\text{выч}} < t_{\text{табл}}$ ($t_{\text{табл}}=2,26$)	1,86	1,10	1,57
Линейность	$r^2 \geq 0,990$	$r^2=0,9988$	$r^2=0,9996$	$r^2=0,9969$
Стабильность	Индивидуальна	В течение суток	В течение суток	В течение суток

Заключение

В ходе исследований изучены особенности хроматографической оценки идентичности и количественного содержания противотуберкулезных лекарственных средств в субстанции и лекарственной форме с использованием отечественного оборудования..... Результаты, полученные по данным методикам, воспроизводимы и с помощью валидации подтверждена их пригодность для фармацевтического анализа.

Литература (references)

1. Власов А.М., Башкатов Ю.М., Савченко А.Ю. и др. Определение перхлозона в плазме крови с использованием ВЭЖХ масс-спектрометрическим детектированием // Биомедицина. – 2011. – № 2. – С. 73-78. [Vlasov A.M., Bashkatova Ju.N. Savchenko A.Ju. i dr. *Biomedicina*. Biomedicine. – 2011. – N2. – P. 73-78. (in Russian)]
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. – URL: https://femb.ru/record/pharmacopea_14 [Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiiskoi Federatsii XIV izdaniya. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition. – URL: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (in Russian)]
3. Денисюк Д.А., Сукачинская Н.В., Самко Г.Н. Фармакотерапия лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза в Приднестровье // Сборник научных трудов по материалам V Международной научно-практической конференции «Фармакология разных стран», посвященной 85-летию кафедры Курского государственного медицинского университета и 10-летию Института международного образования Харбинского медицинского университета, 18-19 октября 2022. – Курск, 2022. – С. 105-111. [Denisjuk D.A., Sukachinskaja N.V., Samko G.N. *Sbornik nauchnyh trudov po materialam V Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii «Farmakologija raznyh stran», posvjashhennoj 85-letiju kafedry Kurskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta i 10-letiju Instituta mezhdunarodnogo obrazovaniya Harbinskogo medicinskogo universiteta, 18-19 oktjabrja 2022*. Collection of scientific papers on the materials of V The International scientific and practical conference «Pharmacology of different countries», dedicated to the 85th anniversary of the Department of Kursk State Medical University and the 10th anniversary of the Institute of International Education of Harbin Medical University, October 18-19, 2022. – Kursk, 2022. – P. 105-111. (in Russian)]
4. Косман В.М., Карлина М.В., Макарова М.Н. Опыт разработки биоаналитических методик методом ВЭЖХ с УФ-детектированием // Фармация. – 2020. – Т.69, №.3. – С. 23. [Kosman V.M., Karlina M.V., Makarova M.N. *Farmacija*. Pharmacia. – 2020. – V.69, N3. – P. 23. (in Russian)]

5. Нормативная документация ЛП-001899-070920 Перхлозон, таблетки, покрытые оболочкой 200 мг, 400мг [Normativnaja dokumentacija LP-001899-070920 Perhlozone, tabletki, pokrytye obolochkoj 200 mg, 400 mg. Normative document LP-001899-070920 Perhlozone, coated tablets 200 mg, 400mg (in Russian)]
6. Нормативная документация ЛП 002373-140214 Локсидон, капсулы 150 мг, 250 мг, 300 мг [Normativnaja dokumentacija LP 002373-140214 Loksidon, kapsuly 150 mg, 250 mg, 300 mg. Normative document LP 002373-140214 Loksidon, capsules 150 mg, 250 mg, 300 mg (in Russian)]
7. Нормативная документация ЛСР-005929/08-280708 Теризидон [Normativnaja dokumentacija LSR-005929/08-280708 Terizidone. Normative document LSR-005929/08-280708 Terizidone (in Russian)]
8. Нормативная документация ЛСР-007034/09-200919 Фарбутин, капсулы 150 мг [Normativnaja dokumentacija LSR-007034/09-200919 Farbutin, kapsuly 150 mg. Normative document LSR-007034/09-200919 Farbutin, capsules 150 mg (in Russian)]
9. Сюнякова Д.А. Особенности эпидемиологии туберкулеза в мире и в России в период 2015-2020 гг. Аналитический обзор // Социальные аспекты здоровья населения. – 2021. – Т.67, №3. – С. 11. [Sjunjakova D.A. // Social'nye aspekty zdorov'ja naselenija. Social Aspects of Health Population. – 2021. – V.67, N3. – P. 11. (in Russian)]
10. Фармакопейная статья предприятия ФС 001704-011117 Перхлозон [Farmakopejnaja stat'ja predprijatija FS 001704-011117 Perhlozone. Pharmacopoeia article of the company FS001704-011117 Perhlozone (in Russian)]
11. Фармакопейная статья предприятия ФС 000184-280911 Рифабутин [Farmakopejnaja stat'ja predprijatija FS 000184-280911 Rifabutine. Pharmacopoeia article of the company FS 000184-280911 Rifabutine (in Russian)]
12. Федорова Г.А., Кожанова Л.А., Полянская Е.М. Применение микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии в медицине // Вестник восстановительной медицины. – 2008. – Т.23, №1. – С.35-41. [Fedorova G.A., Kozhanova L.A., Poljanskaja E.M. Vestnik vosstanovitel'noj mediciny. Bulletin of Rehabilitation Medicine. – 2008. – V.23, N1. – P.35-41. (in Russian)]
13. Фомкин Ф. С. Влияние санкций на науку и научное импортозамещение в России //Международный журнал гуманитарных и естественных наук. – 2023. – Т.86, №11-3. – С. 179-185. [Fomkin F. S. Mezhdunarodnyj zhurnal gumanitarnyh i estestvennyh nauk. International Journal of humanities and natural sciences – 2023. – V. 86, N11-3. – P. 179-185. (in Russian)]
14. Эпштейн, Н. А. О требованиях к пригодности хроматографической системе при контроле качества лекарственных субстанций и препаратов методом ВЭЖХ // Химико-фармацевтический журнал – 2008. – Т.42, №11. – С.34-40. [Jepshtejn, N. A. Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2008. – V.42, N11. – P.34-40. (in Russian)]
15. Singh G., Srivastava A.K. High-performance liquid chromatography method validation and development strategy for rifabutin // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2018. – V.9, N9. – P. 3903-3907.

Информация об авторах

Коновалова Светлана Сергеевна – аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: svetlanakonovalova987@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

Конфликт интересов: автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 18.09.2023

Принята к печати 15.03.2024