

Ю. В. Левачкова, О. А. Здорик  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

## РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МЕТРОНІДАЗОЛУ В ПЕСАРІЯХ

*У результаті розробки методики кількісного визначення метронідазолу в песаріях методом абсорбційної спектрофотометрії було підбрано оптимальний розчинник та розведення, досліджено стабільність оптичної густини в часі, встановлено концентраційний діапазон ( $0,7 \times 10^{-5}$ – $1,68 \times 10^{-5}$  г/мл), на якому виконується лінійна залежність оптичної густини від концентрації. Проведено валідацію розробленої методики за стандартизованою процедурою, що відповідає вимогам ДФУ.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** валідація аналітичних методик, абсорбційна спектрофотометрія, метронідазол.

ВСТУП. Метронідазол є сучасним та високо ефективним антибактеріальним препаратом, що має широкий спектр дії відносно найпростіших (трихомонад, лямблій, дизентерійних амеб, балантидій, лейшманій), а також споро- та неспоруютьчих облигатних анаеробів, тому його часто призначають гінекологі при лікуванні бактеріальних вагінозів [8]. До того ж встановлено, що вагінальний шлях лікування бактеріального вагінозу не поступається пероральній терапії і має переваги через меншу вірогідність розвитку побічних реакцій [6, 9].

На сьогодні виведення на фармацевтичний ринок нового лікарського засобу потребує його стандартизації та валідації методів контролю якості відповідно до сучасних вимог ДФУ.

З огляду на вищенаведене, метою даної роботи були експериментальне обґрунтування розробки та валідація методики кількісного визначення метронідазолу в песаріях під умовною назвою “Меланізол” методом абсорбційної спектрофотометрії.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Для проведення досліджень використовували субстанцію метронідазолу (сертифікат аналізу № 0811232, LUOTIAN HONGYAN BIOCHEMICAL CO. LTD), що відповідає вимогам Британської фармакопеї 2005, мірний посуд класу А, реактиви, що відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги AB 204 S/A METTLER TOLEDO, рН-метр PB-11

© Ю. В. Левачкова, О. А. Здорик, 2011.

“Sartorius AG”, спектрофотометр “SPECORD 200”, спектрофотометр 46 “Ломо”.

*Приготування розведення в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої.* Близько 0,07 г (т.н.) субстанції метронідазолу відважували у м.к. 100,0 мл, доводили до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої. 1,0 мл отриманого розчину поміщали у м.к. 50,0 мл та доводили до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої.

*Приготування розведення в 0,1 М розчині натрію гідроксиду.* Близько 0,035 г субстанції метронідазолу відважували у м.к. 100,0 мл, доводили до мітки 0,1 М розчином натрію гідроксиду. 1,0 мл отриманого розчину поміщали у м.к. 50,0 мл та доводили до мітки 0,1 М розчином натрію гідроксиду.

*Методика кількісного визначення метронідазолу в песаріях.* Близько 3,0 г (т.н.) розтертої маси песаріїв переносять у мірну колбу 250,0 мл, додають 100,0 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої та нагрівають на водяній бані при 60 °С до повного розчинення основи. Розчин охолоджують та доводять тим самим розчинником до мітки. 1,00 мл отриманого розчину переносять у мірну колбу 100,0 мл та доводять до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої.

*Розчин робочого стандарту (РРС).* 0,07 г (т.н.) субстанції метронідазолу переносять у мірну колбу 100,0 мл, додають 70 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої, перемішують до повного розчинення субстанції, доводять до мітки тим же розчинником. 1,00 мл отримано-

го розчину переносять у мірну колбу 50,0 мл і доводять до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої.

Оптичну густина випробуваного розчину та РРС вимірювали за довжини (277±2) нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Вміст метронідазолу в одному песарії, у грамах, на середню масу песарію розраховували за формулою:

$$X_{\text{г}} = \frac{A_i \cdot m_{\text{ст}} \cdot 250 \cdot 1 \cdot 100 \cdot m_{\text{сер.20}}}{A_{\text{ст}} \cdot 100 \cdot 1 \cdot 50 \cdot m_{\text{д/а}}} = \frac{A_i \cdot m_{\text{ст}} \cdot 5 \cdot m_{\text{сер.20}}}{A_{\text{ст}} \cdot m_{\text{д/а}}}$$

де  $A_i$  – оптична густина випробуваного розчину;

$A_{\text{ст}}$  – оптична густина розчину робочого стандарту;

$m_{\text{сер.20}}$  – середня маса двадцяти песаріїв (г);

$m_{\text{ст}}$  – маса наважки метронідазолу для приготування розчину робочого стандарту (г);

$m_{\text{д/а}}$  – маса наважки маси песаріїв, що беруть для аналізу (г).

*Приготування модельних зразків песаріїв у концентраційному діапазоні 80–120 %.* Склад: метронідазолу – 2,0000, 2,2500, 2,5000, 2,7500, 3,0000 г, олії чайного дерева – 1,0 г, твіну-80 – 0,86 г, ПЕО-1500 та ПЕО-400 (9:1) – до отримання супозиторної маси 30,00. Відважували наважку субстанції метронідазолу, подрібнювали у ступці, додавали ПЕО-400 та розтирали. До одержаної маси додавали розплавлений ПЕО-1500, перемішували до однорідності. У фарфоровій чашці змішували необхідну кількість твіну-80 та олії чайного дерева, додавали до отриманої маси і перемішували до однорідності.

*Приготування песаріїв без метронідазолу.* В ступку додавали ПЕО-400 та розтирали. До одержаної маси додавали розплавлений ПЕО-1500, перемішували до однорідності. У фар-

форовій чашці змішували необхідну кількість твіну-80 та олії чайного дерева, додавали до отриманої маси і перемішували до однорідності.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** При розробці методики кількісного визначення метронідазолу в песаріях методом спектрофотометрії до уваги брали публікації, присвячені вивченню спектральних характеристик залежно від природи розчинника та рН [3, 5, 7], згідно з якими у кислому та лужному середовищах спектри поглинання розчинів метронідазолу в діапазоні від 230–330 нм мають мінімуми та максимуми – останні можна використовувати для кількісного визначення. Літературні дані були підтверджені експериментально для розведень метронідазолу в 0,1 М кислоті хлористоводневій ( $1,4 \times 10^{-5}$  г/мл) та 0,1 М розчині натрію гідроксиду ( $0,7 \times 10^{-5}$  г/мл) (рис. 1).

У ході досліджень підбирали оптимальний розчинник, досліджували стабільність оптичної густини в часі, підбирали розведення метронідазолу таким чином, щоб показник поглинання був у межах 0,2–0,7, встановлювали концентраційний діапазон, на якому спостерігається лінійна залежність. Для обрання оптимального розчинника було вивчено *стабільність* оптичної густини розчинів метронідазолу в часі. Готували розчини субстанції метронідазолу в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої та 0,1 М розчині натрію гідроксиду і вимірювали оптичну густина при 277 та 317 нм відповідно (табл. 1).

За результатами таблиці 1, оптична густина розчину з рН 1,24 характеризується стабільністю протягом 60 хв (стандартне відхилення і довірчий інтервал не перевищують критерію максимальної систематичної похибки) на відміну від результатів для розведення метронідазолу в 0,1 М розчині натрію гідроксиду

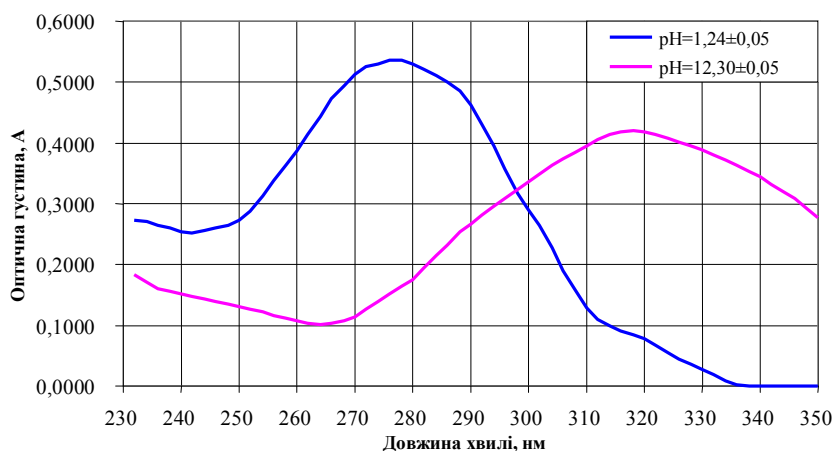


Рис. 1. Спектри поглинання метронідазолу в лужному та кислому середовищах

Таблиця 1 – Дослідження оптичної густини у часі

рН аналіт. розчину	$A_{\text{сер.}}$					RSD <sub>t</sub> , %	$\Delta_t$ , %	$\delta_{\text{max}}$ , %
	0 хв	15 хв	30 хв	45 хв	60 хв			
12,30±0,05	0,4207	0,4297	0,4247	0,4167	0,4173	1,29	2,74	1,02
1,24±0,05	0,5457	0,5457	0,5443	0,5433	0,5443	0,18	0,39	1,02

Таблиця 2 – Метрологічні характеристики методики кількісного визначення метронідазолу методом спектрофотометрії

$Z_{\text{сер.}}$ , %	$S_z$ , %	$\Delta_z$ , %	$\delta$ , %	b	$S_b$	a	$S_a$	r
99,98	0,45	0,18	0,02	1,0066	0,0030	-0,5467	0,2623	0,9999

$\Delta_t=2,74 > \delta_{\text{max}}$ , тому як розчинник було обрано 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої.

На модельних розчинах субстанції метронідазолу досліджували метрологічні характеристики спектрофотометричного методу методом стандарту, розрахунок отриманих експериментальних даних проводили у нормалізованих координатах (табл. 2). Лінійність методики досліджували у концентраційному діапазоні  $0,7 \times 10^{-5}$ – $1,68 \times 10^{-5}$  г/мл, що відповідає діапазону застосування 50–120 % у нормалізованих координатах.

Нижню межу було розширено, оскільки у подальшому методику планується використовувати для визначення вивільнення метронідазолу з песаріїв (рис. 2). За 100 % брали розведення розчину стандарту  $1,4 \times 10^{-5}$  г/мл. Проведені дослідження та отримані результати було покладено в основу розробки методики кількісного визначення метронідазолу в песаріях.

Перед проведенням валідації методики кількісного визначення метронідазолу в песаріях було розраховано критерії прийнятності методики (табл. 3) та повну невизначеність методики (табл. 4). Прогноз повної невизна-

ченості аналізу не перевищує розрахованого критерію максимально допустимої невизначеності аналізу  $1,17 \geq 3,2$  %, що свідчить про коректність запропонованої пробопідготовки.

Підтвердження специфічності для методу абсорбційної спектрофотометрії полягає у доведенні того, що відносна систематична похибка, яку вносять допоміжні речовини та інші компоненти пропису (олія чайного дерева, твін-80, ПЕО-1500 і ПЕО-400), є незначною порівняно з максимально допустимою невизначеністю аналізу [2]. Оцінку впливу компонентів пропису на оптичну густину проводили,

Таблиця 3 – Критерії прийнятності спектрофотометричної методики

Критерії прийнятності	Значення критичних величин, %
Допуски вмісту	±10
Повна невизначеність методики – $\text{max} \Delta_{As}$	3,2
Систематична похибка – $\delta_{\text{max}}$	1,02
Залишкове стандартне відхилення – $S_0$	1,81
Коефіцієнт кореляції – $R_c$	0,9924
Вільний член лінійної залежності – a	5,12

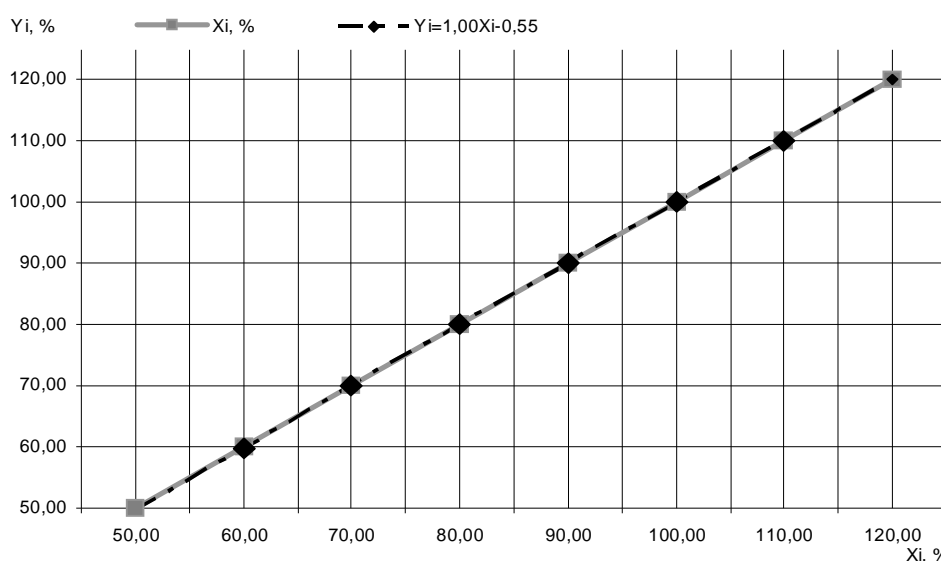


Рис. 2. Графік лінійної залежності оптичної густини від концентрації метронідазолу в нормалізованих координатах.

Таблиця 4 – Розрахунок повної невизначеності методики

Операція пробопідготовки	Невизначеність операції	Значення операції	Розрахунок невизначеності	Значення невизначеності операції, %
Приготування розчину робочого стандарту				
Зважування на аналітичних вагах $m_{\text{нав}}$ (метронідазолу)	0,2 мг	70,0 мг	0,2/70,0·100 %	0,29
Розведення у колбі 100,0 мл	–	100 мл	–	0,12
Відбір аліквоти піпеткою 1,00 мл		1 мл		0,6
Розведення у колбі 50,0 мл		50 мл	–	0,17
$\Delta_{\text{sp}} = \sqrt{0,29^2 + 0,12^2 + 0,6^2 + 0,17^2} \times 100 \% \approx 0,70 \%$				
Приготування випробовуваних розчинів				
Зважування на аналітичних вагах $m_{\text{нав}}$ (маси песаріїв)	0,2 мг	3,0 г	0,2/3000,0·100 %	0,0067
Розведення у колбі 250,0 мл	–	100 мл	–	0,08
Відбір аліквоти піпеткою 1,00 мл		1 мл		0,6
Розведення у колбі 100,0 мл		50 мл	–	0,12
Прогноз невизначеності пробопідготовки				
$\Delta_{\text{sp}} = \sqrt{0,0067^2 + 0,08^2 + 0,6^2 + 0,12^2} \times 100 \% \approx 0,62 \%$				
Прогноз повної невизначеності аналізу				
$\Delta_{\text{As}} = \sqrt{\Delta_{\text{SP}}^2 + \Delta_{\text{FAO}}^2} = 0,70^2 + 0,64^2 + 0,52^2 = 1,17 \%$				

вимірюючи оптичну густину розчину, приготованого за методикою для зразків песаріїв без метронідазолу ( $A_{\text{blank}}$ ), і розчину субстанції метронідазолу в 0,1  $M_{\text{розчин}}$  розчині кислоти хлористоводневої з розведенням  $1,07 \times 10^{-5}$  г/мл ( $A_{\text{subst}}$ ), що за вмістом відповідає кількості метронідазолу в 3,0 г лікарського засобу. Середні значення трьох вимірювань оптичної густини склали:  $A_{\text{blank}} = 0,0041$ ;  $A_{\text{subst}} = 0,4097$ . Систематична похибка складала:

$$\delta_{\text{exc}} = \frac{100 \cdot 0,0041}{0,4097} = 1,00 \%$$

Як видно, нерівність  $\delta_{\text{exc}} \leq \delta_{\text{max}}$  (1,00 % ≤ 1,024 %) виконується, отже, фонове поглинання є незначущим і методика характеризується допустимою специфічністю. До того ж нерівність  $\delta_{\text{exc}} \leq 0,32 \cdot \delta_{\text{max}}$  не виконується, таким чином, перевірку лінійності, прецизійності та правильності проводили з використанням модельних зразків песаріїв за присутності інших компонентів пропису.

Валідацію методики проводили у концентраційному діапазоні  $0,86 - 1,3 \times 10^{-5}$  г/мл, що відповідає діапазону застосування 80–120 % відносно номінального вмісту метронідазолу в песаріях [1, 2, 4].

Отримані характеристики лінійності  $b$ ,  $S_b$ ,  $a$ ,  $S_a$ ,  $S_r$ ,  $r$  (табл. 5, рис. 3) відповідають критеріям прийнятності, лінійність методики спостерігається на всьому діапазоні застосування (80–120 %).

Таблиця 5 – Валідаційні характеристики методики спектрофотометричного визначення метронідазолу в песаріях

Валідаційна характеристика	Спектрофотометричний метод	
	Лаб. 1	Лаб. 2
Вивчення правильності та збіжності		
Z, %	99,43	99,19
$S_z$ , %	0,19	0,56
$\Delta_z$ , %	0,34	0,99
$\delta$ , %	0,57	0,81
Вивчення лінійності		
b	0,9973	1,0230
$S_b$	0,0033	0,0053
a	-0,2939	-3,0421
$S_a$	0,3365	0,5352
$S_o$	0,1828	0,2907
r	0,9999	0,9998
Вивчення відтворюваності		
$Z_{\text{intra}}$ , %	99,31	
$SD_z$ , %	0,38	
$\Delta_{\text{intra}}$ , %	0,69	

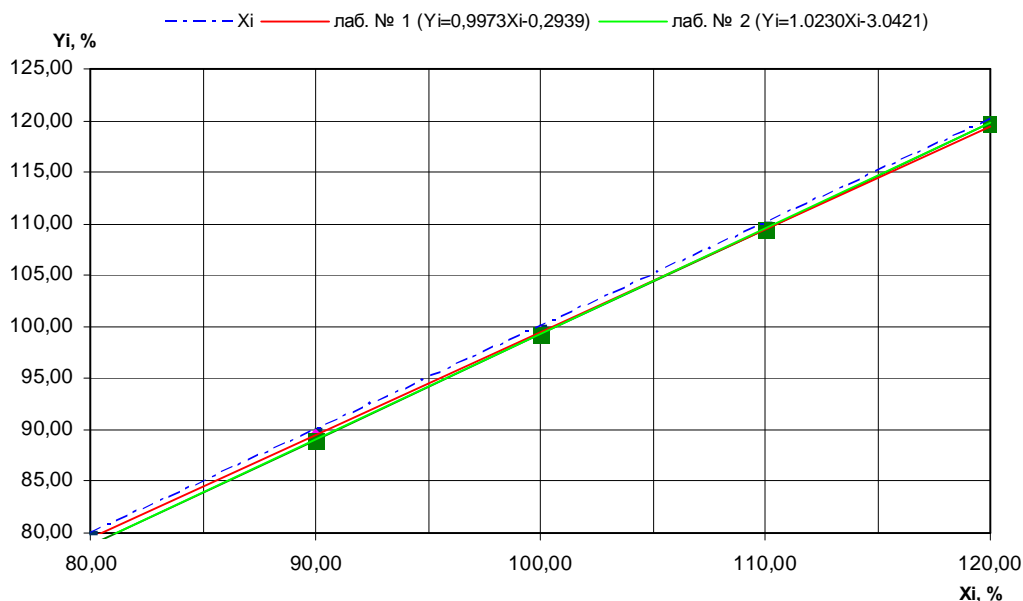


Рис. 3. Графік лінійної залежності у нормалізованих координатах.

Використовуючи підхід одночасного визначення валідаційних характеристик, *правильність та збіжність* визначали на тих же модельних зразках, що і лінійність (табл. 5). Дослідження впливу міжлабораторних варіацій – різне обладнання, різні аналітики – проводили за результатами аналізу 15 проб модельних зразків, величини  $Z_{intra}$ ,  $RSD_z$  і  $\Delta_{intra}$  наведено у таблиці 5.

**ВИСНОВКИ.** 1. За результатами вивчення стабільності оптичної густини розчинів метронідазолу в часі встановлено, що оптична гус-

тина розчину метронідазолу в 0,1 М кислоті хлористоводневій характеризується стабільністю протягом 60 хв.

2. Встановлено, що лінійна залежність оптичної густини від концентрації метронідазолу спостерігається у діапазоні  $0,7 \times 10^{-5}$ – $1,68 \times 10^{-5}$  г/мл.

3. Проведено валідацію методики кількісного визначення метронідазолу в песаріях під умовною назвою “Меланізол” методом абсорбційної спектрофотометрії, за результатами якої встановлено, що методика відповідає вимогам ДФУ та може бути внесена до МКЯ.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Державна Фармакопея України / Держ. п-во “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид., доп. 2. – Х. : РІПЕГ, 2008. – 620 с.
2. Евтифеева О. А. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения экстермпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества / О. А. Евтифеева, В. А. Георгианц // Фармаком. – 2007. – № 1. – С. 69–81.
3. Сравнительная характеристика физико-химических методов контроля качества метронидазола / Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин, Д. С. Вязова, В. Ф. Дзюба // Вестник ВГУ. – 2008. – № 1. – С. 159–162.
4. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А. И. Гризодуб, Д. А. Леонтьев, Н. В. Денисенко, Ю. В. Подпружников // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 3–17.

5. Теплых А. Н. Количественное определение метронидазола спектрофотометрическим методом / А. Н. Теплых, Е. А. Илларионова // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – № 5. – С. 48–50.
6. Тихомиров А. Л. Бактериальный вагиноз: некоторые аспекты этиологии, патогенеза, клиники, диагностики лечения / А. Л. Тихомиров, Ч. Г. Олейник // Гинекология. – 2004. – № 2. – С. 62–65.
7. Clarke’s analysis of drugs and Poisons / edited by A. C. Moffat, M. D. Osselton and B. Widdop. – London : Pharmaceutical Press, 2004. – 1632 p.
8. Mead P. B. Epidemiology of bacterial vaginosis / P. B. Mead // Am. J. Obstet. Gynecology. – 2011. – **169**, № 2. – P. 446–449.
9. The association of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy Text. / C. S. Bradshaw, S. N. Tabrizi, C. K. Fairley [et al.] // J. Infect. Dis. – 2006. – **194**, № 6. – P. 828–836.

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТРОНИДАЗОЛА В ПЕССАРИЯХ

### Резюме

В результате разработки методики количественного определения метронидазола в пессариях методом абсорбционной спектрофотометрии были подобраны оптимальный растворитель и разведения, исследована стабильность оптической плотности во времени, установлен концентрационный диапазон ( $0,7 \times 10^{-5}$ – $1,68 \times 10^{-5}$  г/мл), на котором соблюдается линейная зависимость оптической плотности от концентрации. Проведена валидация разработанной методики по стандартизованной процедуре, которая соответствует требованиям ГФУ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: валидация аналитических методик, абсорбционная спектрофотометрия, метронидазол.

Yu. V. Levachkova, O. A. Zdoryk  
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METRONIDAZOLE QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD IN PESSARIES

### Summary

As a result of the development assay method of metronidazole in pessaries by a method of an absorption spectrophotometry an optimum dissolvent and delutions have been picked up, stability of optical density in time has been investigated, the concentration range has been established ( $0,7 \times 10^{-5}$ – $1,68 \times 10^{-5}$  the g/ml) on which linear dependence of optical density on concentration is observed. The validation of the developed method according to standardized procedure which corresponds to SPU has been carried out.

KEY WORDS: validation of analytical methods, absorption spectrophotometry, metronidazole.

Отримано 02.06.11

Адреса для листування: Ю. В. Левачкова, вул. Петровського, 34, кв. 12, Харків, 61024, Україна.