

УДК 615.072

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2021.51.17.003>

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА МОКСИФЛОКСАЦИНА В ЛЕКАРСТВЕННОМ ПРЕПАРАТЕ «МОКСИФЛОКСАЗОЛЬ»

А.И. Замараева, аспирант кафедры химии, ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Тюмень, anuyta.zamaraeva@yandex.ru

Т.А. Кобелева, доктор фарм. наук, профессор, заведующий кафедрой химии, ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Тюмень, kobeleva57@yandex.ru, kobeleva@tyumsmu.ru

А.И. Сичко, доктор фарм. наук, профессор кафедры химии, ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Тюмень, sichko@tyumsmu.ru

Н.С. Бессонова, канд. биол. наук, доцент кафедры химии, ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Тюмень, bessonov21@mail.ru

Е.М. Шаповалова, доктор биол. наук, доцент, профессор кафедры химии, ФГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Тюмень, shapovalova@tyumsmu.ru

В настоящей работе изучены спектры поглощения моксифлоксацина в этаноле и установлено, что количественный анализ лекарственного препарата рационально проводить при $\lambda_{\text{max}} = 296$ нм. Приведены экспериментальные данные по количественному анализу моксифлоксацина в лекарственном препарате «Моксифлоксазоль». Относительная погрешность анализа не превышает $\pm 1,82\%$. Чувствительность определения моксифлоксацина равна $0,213$ мкг/мл. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность. Способом уравнивания градуировочного графика рассчитано содержание моксифлоксацина в мази, которое находится в пределах $0,0482$ – $0,0544$ г и соответствует нормам допустимых отклонений.

Ключевые слова: моксифлоксацин, гель «Тизоль», количественный анализ, УФ-спектрофотометрия, валидация

Моксифлоксацин является химиотерапевтическим средством группы фторхинолонов с широким спектром бактерицидного действия. Благодаря способности подавлять микроорганизмы, устойчивые к другим антибиотикам, повышается актуальность расширения номенклатуры лекарственных форм, включающих его [8,9]. Субстанция моксифлоксацина гидрохлорида представлена кристаллическим порошком от светло-желтого до желтого цвета, характеризуется умеренной растворимостью в воде, малой растворимостью или очень малой растворимостью в спирте 96%. В настоящее время Европейской фармакопеей для количественного определения субстанции моксифлоксацина гидрохлорида и его лекарственных форм рекомендуется использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [10]. Данный метод также регламентирован проектом фармакопейной статьи «ФС Моксифлоксацина гидрохлорид», рассмотренном

на Совете МЗ РФ по Государственной фармакопее. Кроме того, в ряде исследований описывается возможность применения метода УФ-спектрофотометрии для количественного анализа моксифлоксацина [2,6]. Нами предлагается мазь с условным названием «Моксифлоксазоль», содержащая 0,05 г моксифлоксацина и гель «Тизоль» до 10,0 г. Лекарственный препарат может быть востребован в терапии ряда дерматологических, стоматологических и офтальмологических заболеваний, вызванных патогенной микрофлорой. Современная малотоксичная основа «Тизоль» будет способствовать повышенной проводимости препарата к очагу поражения, а также обеспечивать противовоспалительное, антисептическое, противозудное и анальгетическое действия [5]. При разработке новых лекарственных препаратов важное значение имеет испытание «Количественное определение», позволяющее оценивать качество готового препарата [3,4].

Цель данной работы – разработка и валидация методики количественного анализа моксифлоксацина в лекарственном препарате «Моксифлоксазоль».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали субстанцию моксифлоксацина гидрохлорид («Неулэнд Лабораториз Лимитед», Индия, ФС 000-715-081118, 2018 г.), титансодержащий гель «Тизоль» (ООО «Олимп», Екатеринбург, Россия, ФСП 3157-06), растворы моксифлоксацина на 95% этиловом спирте (ЗАО «РФК», Россия, ФС.2.1.0105.18), кислоты хлористоводородной 0,01 моль/л (ОАО «Башкирская содовая компания», Россия), мазь под условным наименованием «Моксифлоксазоль», содержащую 0,5% препарата в геле «Тизоль». Исследование проводили с помощью спектрофотометра СФ-2000 (ЗАО «ОКБ СПЕКТР», г. Санкт-Петербург, Россия).

Количественное определение моксифлоксацина проводили простым в выполнении УФ-спектрофотометрическим методом, который используется в анализе лекарственного препарата в таблетках и не уступает по точности хроматографии. Массовую долю в процентах и массу моксифлоксацина в граммах рассчитывали с использованием градуировочного графика.

При построении градуировочного графика готовили 0,02% стандартный раствор (стандартный образец) лекарственного препарата в этиловом спирте. Затем вариативное количество миллилитров (от 0,2 мл до 1,2 мл) исследуемого раствора переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и этанолом доводили объем жидкости в колбе до метки. Оптические плотности полученных растворов измеряли с помощью спектрофотометра при длине волны 296 нм. На основании опытных данных строили градуировочную прямую в координатах А – С, мкг/мл (рис. 2). Для получения объективных результатов анализа провели восемь параллельных опытов, используя 0,6 мл исходного раствора. Содержание моксифлоксацина в процентах рассчитывали по формуле (1):

$$W = \frac{C(\text{мокс}) \cdot V(\text{общ}) \cdot V_1 \cdot 100}{10^6 \cdot a(\text{мокс}) \cdot V_2}, \quad (1)$$

где С (мокс) – концентрация моксифлоксацина, рассчитанная по уравнению градуировочного графика, мкг/мл; V (общ) – объем этилового спирта, содержащего массу моксифлоксацина, 100 мл; V₁, V₂ – фактор разбавления, 0,6 мл и 25 мл; а (мокс) – навеска моксифлоксацина, 0,02 г.

Модельную смесь готовили с учетом растворимости моксифлоксацина в этиловом спирте (моксифлоксацина 0,05 г, этанола 200 мл). Методика исследования: 4 мл этанольного раствора вносят в мерную колбу и этанолом доводят объем жидкости в колбе до 25 мл. Далее к 3 мл полученного раствора прибавляют этанол до общего объема 25 мл. Оптическую

плотность раствора измеряют по отношению к этанолу при длине волны 296 нм. Массу моксифлоксацина в модельном растворе находят по формуле (2):

$$m(\text{мокс}) = \frac{C(\text{мокс}) \cdot V(\text{общ}) \cdot V_2 \cdot V_3}{10^6 \cdot V \cdot V_1}, \quad (2)$$

где $m(\text{мокс})$ – масса моксифлоксацина, г; $V(\text{общ})$ – объем модельного раствора, 200 мл; V – объем модельного раствора, взятый на анализ, 4 мл; V_1, V_2, V_3 – кратность разбавления, 3 мл, 25 мл, 25 мл соответственно.

Количественный анализ моксифлоксацина в мази «Моксифлоксазоль» проводили следующим образом: к навеске мази (около 0,10 г) прибавляли 4 мл 0,01 моль/л раствора хлористоводородной кислоты и этанол до общего объема 30 мл. Смесь перемешивали и фильтровали через складчатый фильтр, отбрасывая первую порцию фильтрата. Затем к 3 мл полученного раствора прибавляли 7 мл этанола и фотометрировали смесь при длине волны 296 нм. Раствором сравнения служила этанольная вытяжка из 0,10 г геля «Тизоль», полученная аналогично исследованию моксифлоксацина. Концентрацию лекарственного препарата в пробе (мкг/мл) находили по уравнению градуировочного графика, а массовую долю в процентах и массу его в мази рассчитывали по формулам (3, 4):

$$m(\text{мокс}) = \frac{C(\text{мокс}) \cdot V(\text{общ}) \cdot V_2 \cdot P}{10^6 \cdot a(\text{мази}) \cdot V_1}, \quad (3)$$

$$W = \frac{C(\text{мокс}) \cdot V(\text{общ}) \cdot 100 \cdot V_2}{10^6 \cdot a(\text{мази}) \cdot V_1}, \quad (4)$$

где a (мази) – навеска мази, взятая на анализ, г; P – масса лекарственной формы, 10,0 г; V_1, V_2 – фактор разбавления, 3 мл и 10 мл соответственно; $V(\text{общ})$ – объем этилового спирта, содержащий навеску мази, 30 мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный спектральный анализ показал, что для количественного спектрофотометрического определения моксифлоксацина в мази «Моксифлоксазоль» рационально использовать полосы поглощения в пределах длин волн 280–310 нм с максимальным поглощением $\lambda = 296$ нм (рис. 1).

Как показали опытные данные, на этанольных спектрах поглощения моксифлоксацина совместно с гелем «Тизоль» наблюдаются аналогичные максимумы и минимумы, как и в случае отсутствия основы (рис. 1, кривые 2, 3). Также совпадают экстремальные точки на спектре поглощения этанольной вытяжки моксифлоксацина из мази (кривая 4).

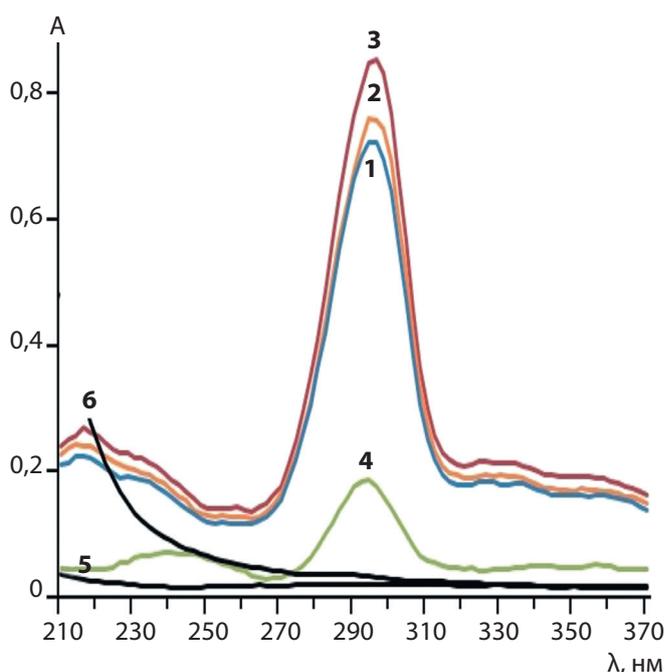


РИС. 1. Зависимость светопоглощения этанольных растворов моксифлоксацина и растворов-«плацебо» от длины волны: 1 – концентрация моксифлоксацина $2,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л; 2 – концентрация моксифлоксацина $2,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л; геля «Тизоль» $5,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л; 3 – концентрация моксифлоксацина $2,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л; геля «Тизоль» $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л; 4 – этанольная вытяжка моксифлоксацина из мази ($C = 4,3 \cdot 10^{-6}$ моль/л); 5 – этанольная вытяжка геля «Тизоль» $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л; 6 – этанол 95%

Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ РЕГРЕССИОННОГО АНАЛИЗА МОКСИФЛОКСАЦИНА

x_i , мкг/мл	y_i	$x_i y_i$	x_i^2	y_i^2	b	C, мкг/мл
1,6	0,15	0,24	2,56	0,023	0,0938	0,213
3,2	0,30	0,96	10,24	0,090		
4,8	0,45	2,16	23,04	0,203		
6,4	0,60	3,84	40,96	0,360		
8,0	0,75	6,00	64,00	0,563		
9,6	0,90	8,64	92,16	0,810		
33,6	3,15	21,84	232,96	2,049		

Валидацию методики проводили согласно Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания, ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик».

Специфичность

Для определения специфичности с помощью спектрофотометра последовательно снимали спектры: растворов-«плацебо» (этанольная вытяжка геля «Тизоль» и этанол 95%); стандартного раствора моксифлоксацина соответственно методике количественного анализа. Полученные спектры не содержали пики, характерные для стандартного раствора моксифлоксацина (рис. 1, кривые 5 и 6).

Линейность

С целью установления линейности методики экспериментально измеряли оптические плотности растворов моксифлоксацина в пределах от 1,6 мкг/мл до 9,6 мкг/мл. Проводили не менее пяти параллельных опытов,

на основании которых рассчитывали показатели регрессионного анализа (табл. 1). Оценивали статистическую незначимость свободного члена линейной зависимости. Линейность считали оптимальной при значениях коэффициента корреляции $|r| \geq 0,99$ (табл. 2).

Установили, что чувствительность анализа моксифлоксацина составляет 0,245 мкг/мл, величина коэффициента корреляции удовлетворяет условию $|r| \geq 0,99$. Значение свободного члена линейной зависимости меньше его доверительного интервала, что дает основание перейти к уравнению прямой, проходящей через начало координат (табл. 2).

В соответствии с полученными данными (табл. 1) строили градуировочный график. Между концентрацией моксифлоксацина и оптической плотностью прослеживается прямая зависимость (рис. 2). Это свидетельствует о возможности анализировать моксифлоксацин методом УФ-спектрофотометрии в мази.

Таблица 2

УРАВНЕНИЕ РЕГРЕССИИ МОКСИФЛОКСАЦИНА В МЕТОДЕ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Уравнение регрессии	Коэффициент корреляции	$ a \leq t(P; f) \cdot S_a$ при $P = 95\%$	Уравнение прямой
$y = 0,0938x - 0,00028$	0,9981	$0,00028 < 0,043$	$y = 0,0938x$

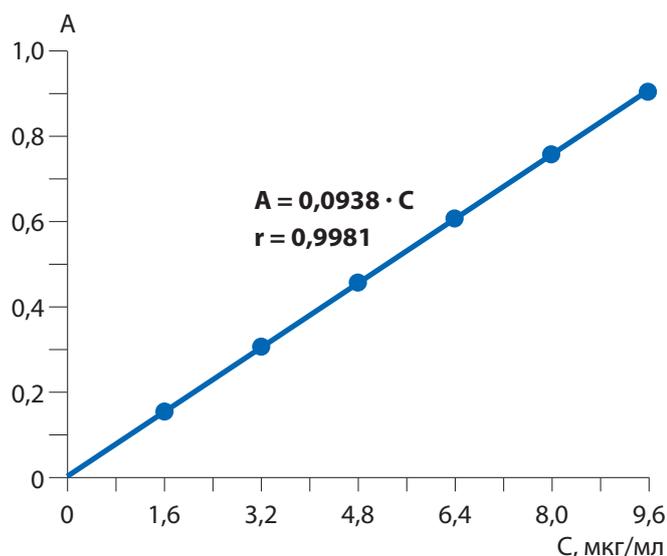


РИС. 2. Градуировочный график при анализе моксифлоксацина

Правильность и прецизионность

Повторяемость (сходимость) валидируемой методики оценивали, используя модельные смеси моксифлоксацина, в одинаковых

лабораторных условиях в короткий промежуток времени по результатам восьми параллельных опытов. Внутрилабораторную прецизионность определяли в разные дни с участием двух исследователей (аналитиков). Полученные данные статистически обработали (табл. 3).

Полученные величины стандартного отклонения (прецизионность) и относительной погрешности (правильность) не выходят за пределы $100 \pm 2,0\%$.

Аналитическая область

Интервал между верхним и нижним значением концентрации моксифлоксацина, в пределах которого доказаны приемлемые правильность, прецизионность и линейность методики, составляет от 1,6 мкг/мл до 9,6 мкг/мл.

В ходе исследования апробировали методику количественного анализа моксифлоксацина

Таблица 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ПРАВИЛЬНОСТИ И ПРЕЦИЗИОННОСТИ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МОКСИФЛОКСАЦИНА

Первый день			Второй день			Метрологические характеристики
A	Найдено		A	Найдено		
	C, мкг/мл	$x_i (W), \%$		C, мкг/мл	$x_i (W), \%$	
0,460	4,90	102,08	0,445	4,74	98,75	Первый день $x = 100,05\%$ $S = 2,182$ $Sx = 0,772$ $\epsilon_a = 1,82$ $A = \pm 1,82\%$ $\Delta = 100,05 \pm 1,82\%$ Второй день $x = 100,08\%$ $S = 1,984$ $Sx = 0,702$ $\epsilon_a = 1,66$ $A = \pm 1,66\%$ $\Delta = 100,08 \pm 1,66\%$
0,445	4,74	98,75	0,460	4,90	102,08	
0,450	4,80	100,0	0,440	4,69	97,71	
0,440	4,69	97,71	0,460	4,90	102,08	
0,445	4,74	98,75	0,440	4,69	97,71	
0,440	4,69	97,71	0,445	4,74	98,75	
0,465	4,96	103,33	0,460	4,90	102,08	
0,460	4,90	102,08	0,455	4,85	100,97	

Таблица 4

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА МОКСИФЛОКСАЦИНА В МОДЕЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ СПОСОБОМ УРАВНЕНИЯ ГРАДУИРОВОЧНОГО ГРАФИКА ($A = 0,0938 \cdot C$)

№ п/п	Оптическая плотность	Масса, мкг/мл	Найдено		Допустимые нормы	
			%	г	%	г
1	0,440	4,69	0,49	0,0489	±20,0	0,040–0,060
2	0,450	4,80	0,50	0,0500		
3	0,435	4,64	0,48	0,0483		
4	0,460	4,90	0,51	0,0510		
5	0,445	4,74	0,49	0,0494		
6	0,455	4,85	0,51	0,0505		

в модельной лекарственной форме. Экспериментальные данные приведены в табл. 4.

Масса моксифлоксацина в модельном растворе находится от 0,0483 г до 0,0510 г при допустимых пределах 0,040–0,060 г [7].

Количественный анализ моксифлоксацина в мази «Моксифлоксазоль» проводили в этанольной вытяжке, полученной из точной навески. опыты показали, что в органическую фазу переходит около 22% препарата из-за его малой

Таблица 5

ДАННЫЕ ПО ВЫБОРУ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ АНАЛИЗА МОКСИФЛОКСАЦИНА ($A = 0,0938 \cdot C$)

№ п/п	Взято				Оптическая плотность	Найдено W, %
	m (мази), г	m (тизоля), г	Объем 0,01 моль/л HCl, мл	Объем этанола, мл		
1	0,1033	0,1041	0,0	30,0	0,11	22,60
					0,12	24,76
2	0,1023	0,1041	1,0	29,0	0,32	66,60
					0,33	68,80
3	0,1047	0,1041	2,0	28,0	0,42	85,60
					0,44	89,60
4	0,1056	0,1041	3,0	27,0	0,46	92,80
					0,46	92,80
5	0,1030	0,1041	4,0	26,0	0,48	99,40
					0,50	103,60
6	0,1017	0,1041	5,0	25,0	0,62	129,80
					0,60	125,80

Таблица 6

РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА МОКСИФЛОКСАЦИНА В МАЗИ СПОСОБОМ УРАВНЕНИЯ ГРАДУИРОВАННОГО ГРАФИКА ($A = 0,0938 \cdot C$)

Взято, г		Результаты опытов				Нормы отклонений	
мази	тизоля	A	C, мкг/мл	m, г	W, %	г	%
0,1038	0,1015	0,53	5,65	0,0544	0,54	0,040–0,060	±20,0
0,1038	0,1015	0,52	5,54	0,0534	0,53		
0,1038	0,1015	0,48	5,12	0,0493	0,49		
0,1038	0,1015	0,50	5,33	0,0513	0,51		
0,1038	0,1015	0,47	5,01	0,0482	0,48		
0,1038	0,1015	0,49	5,22	0,0503	0,50		

растворимости в этаноле, при этом массовая доля (%) увеличивается в присутствии кислоты. Для определения оптимальных условий количественного анализа приготовили модельную мазь с точным содержанием моксифлоксацина и основы. Исследования проводили в присутствии различных объемов 0,01 моль/л раствора хлористоводородной кислоты, введенных в этанол. Результаты опытов приведены в табл. 5.

Установлено, что при введении в исследуемый раствор 4 мл 0,01 моль/л раствора хлористоводородной кислоты в водно-этанольную среду из геля «Тизоль» переходит около 100% моксифлоксацина. Данные условия анализа нами приняты за оптимальные.

Согласно проведенным исследованиям разработали методику количественного анализа моксифлоксацина в мази «Моксифлоксазоль». Содержание моксифлоксацина в мази находится в пределах 0,0482–0,0544 г (табл. 6).

ВЫВОДЫ

В результате изучения этанольных спектров поглощения моксифлоксацина установлены оптимальные условия проведения количественного анализа препарата в мягкой лекарственной форме.

На основании экспериментальных данных предложена методика количественного анализа моксифлоксацина в модельной смеси с относительной ошибкой ± 1,82%.

Проведена валидация разработанной методики количественного анализа моксифлоксацина в мази на основе геля «Тизоль» по следующим валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность. Изученные валидационные характеристики соответствуют критериям приемлемости.

Предлагаемую методику количественного анализа моксифлоксацина в мази «Моксифлоксазоль» рационально использовать для включения в нормативную документацию для оценки качества готового препарата.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Баранов Ю.Н., Шорманов В.К., Нестерова А.В., Коваленко Е.А. Разработка и валидация методики определения 2-диметиламино-1,3-бис (фенилсульфонилтио) пропана в ткани гнилостно измененной печени // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2018. – №1. – С. 121–127.

2. Дорофеев В.Л., Титов И.В., Арзамасцев А.П. Использование метода УФ-спектрофотометрии для количественного определения лекарственных средств группы фторхинолонов // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2004. – №2. – С. 205–209.
3. Замараева А.И., Бессонова Н.С., Кобелева Т.А., Сичко А.И. Количественный анализ и стабильность новой лекарственной формы «Метронидазол» // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2020. – Т. 19. – №2. – С. 155–162.
4. Замараева А.И., Бессонова Н.С., Кобелева Т.А., Сичко А.И. Количественный спектрофотометрический анализ лекарственного препарата «Метрокетоконазол» // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2020. – №4(30). – С. 21–27.
5. Махотина М.В., Сысуев Б.Б., Петров А.Ю., Емельянова И.В. Исследование реологических характеристик оригинальной основы Тизоль-гель и лекарственных композиций на его основе по мануальным прописям // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №3(16). – С. 44–47.
6. Меньшикова Л.А., Львова А.А., Шохин И.Е., Болдина Ю.Е., Комаров Т.Н., Медведев Ю.В. Валидация методики количественного определения моксифлоксацина для теста «Растворение» методом УФ-спектрофотометрии // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – №2 (15). – С. 94–97.
7. Приказ МЗ РФ от 26.10.2015 №751н «Об утверждении правил изготовления и отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность».
8. Сидоренко С.В. Фторхинолоны: свойства и клиническое применение // Трудный пациент. – 2011. – №5. – С. 21–27.
9. Синопальников А.И. Моксифлоксацин: фокус на профиль безопасности // Медицинский совет. – 2013. – №11. – С. 82–87.
10. European Pharmacopoeia, Strasbourg. – 2019. – 10th Ed. – P. 3306–3308.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE ANALYSIS OF MOXIFLOXACIN IN THE DRUG “MOXIFLOXAZOL”

A.I. Zamaraeva, T.A. Kobeleva, A.I. Sichko, N.S. Bessonova, E.M. Shapovalova

Tyumen State Medical University, Tyumen, Russia

In this work, the absorption spectra of moxifloxacin in ethanol were studied and it was found that the quantitative analysis of the drug is rational to carry out at $\lambda_{max} = 296$ nm. Experimental data on the quantitative analysis of moxifloxacin in the drug “Moxifloxazole” are presented. The relative error of the analysis does not exceed $\pm 1.82\%$. The sensitivity of the determination of moxifloxacin is 0.213 mcg/ml. The developed method was validated according to the following validation characteristics: specificity, linearity, correctness, precision. The content of moxifloxacin in the ointment, which is in the range of 0.0482-0.0544 g and corresponds to the norms of permissible deviations, is calculated by the method of the equation of the calibration graph.

Keywords: moxifloxacin, Tizol gel, quantitative analysis, UV spectrophotometry, validation