

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ АНАЛІТИЧНОЇ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУЛЬФАМЕТАЗИНУ В ПРЕПАРАТІ «МАСТИСАН-А-ФОРТЕ»

Ключові слова: Мастисан-А-Форте, сульфаметазин, тропеолін О, спектрофото-
метрія, кількісне визначення, валідаційні характеристики

Сульфаніламіді (сульфадиметоксин, сульфаметазин, сульфаметоксазол тощо) часто поєднують у комбінованих лікарських препаратах (КЛП) з іншим антибактеріальними субстанціями різної хімічної природи для підвищення лікувального ефекту [2, 10, 11]. Препарати на основі сульфаметазину (СМТ, синонім – сульфадимезин) найчастіше використовують при лікуванні інфекційних захворювань дихальної системи людей та тварин. СМТ є однією з активних субстанцій інтрамамарного комбінованого ветеринарного препарату «Мастисан-А-Форте» і належить до діючих речовин короткотривалої дії, що швидко всмоктуються епітелієм тварин. Декілька біологічно активних речовин, що знаходяться в одному препараті, взаємно утруднюють їх індивідуальне кількісне визначення. Це зумовлює необхідність пошуку селективної взаємодії, в тому числі сульфаніламідів (СА), з уже відомими реагентами або пошук нових специфічних реагентів.

Кількісне визначення вмісту сульфаніламідів в чистих субстанціях згідно з Європейською Фармакопеею та Державною Фармакопеею України виконується методом нітритометричного титрування [8, 15]. Для аналізу КЛП на вміст СА в Британській та Американській Фармакопеех прописані хроматографічні методи, нітритометричне титрування або УФ-спектрофотометричне визначення [14, 17]. Однак, титриметричне або спектрофотометричне визначення виконуються лише після попередніх процедур виділення аналіта та його очистки від інших діючих та допоміжних речовин, а хроматографічні методи є складними і не завжди рентабельними.

Нами розроблена аналітична методика спектрофотометричного визначення СМТ, в основі якої лежить реакція утворення кольорового продукту азосполучення діазосоли СМТ з азобарвником тропеоліном О. Утворений дисазобарвник синього кольору характеризується максимумом світлопоглинання при $\lambda = 590 - 600$ нм ($\epsilon_{\lambda} \sim 10^4$ л · моль⁻¹ · см⁻¹) [13]. Розроблену методику було використано для визначення кількісного вмісту СМТ у комбінованому ветеринарному препараті «Мастисан-А-Форте», який належить до інтрамамарних лікарських засобів, що застосовують для лікування різних форм запалення та травматичних пошкоджень вимені тварин. До складу препарату входять діючі речовини – СМТ, бензилпеніцилін, стрептоміцин і преднізолон. Всі активні компоненти препарату містять різні функціональні групи, що можуть взаємодіяти з азобарвником, тому дослідження їх впливу на кількісне визначення СМТ є важливим. Допоміжними речовинами досліджуваної суспензії є алюмінію стеарат, церезин або бджолиний віск та вазелінова олія. У роботі [2] показано, що всі ці речовини не взаємодіють з тропеоліном О, тому не впливають на кількісне визначення СМТ.

При визначенні СМТ у препараті «Мастисан-А-Форте», згідно з технічними умовами ТУ У 24.4-00483010-21:2003, для виділення аналіту застосовують попередню екстракцію діетиловим ефіром. Розроблена нами методика, як показали попередні дослідження, не потребує екстракційного розділення компонентів.

Метою даної роботи є валідація аналітичної методики кількісного спектрофотометричного визначення СМТ з використанням тропеоліну О, тобто одержання експериментальних доказів того, що запропонована методика, придатна для аналітичного контролю готової лікарської форми комбінованого ветеринарного СМТ-вмісного препарату – суспензії «Мастисан-А-Форте».

Відповідно до вимог [5, 7, 8, 12, 16, 17,] для аналітичної методики щодо випробування «Кількісне визначення» необхідно визначати такі валідаційні характеристики: *специфічність, робасність, лінійність, правильність, прецизійність, внутрішньолабораторну прецизійність та відтворюваність* у міжлабораторному експерименті.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Об'єкт дослідження

Суспензія «Мастисан-А-Форте» (виробник – Харківська біофабрика) ТУ У 24.4-00483010-21:2003, що містить діючі речовини – сульфаметазин ($70 \pm 3,5$ мг/мл), бензилпеніцилін (26 мг/мл), стрептоміцин (12 мг/мл), преднізолон (0,7 мг/мл), а також допоміжні речовини – алюмінію стеарат (30 – 40 мг/мл), церезин (10 – 40 мг/мл) або віск бджолиний (10 – 40 мг/мл), вазелінова олія (до 1 мл).

Реагенти

У роботі використовували субстанції діючих речовин фармакопейної чистоти (не менше 99%) фірми Sigma: СМТ, натрієвої солі бензилпеніциліну, стрептоміцину сульфату, преднізолону та допоміжних речовин: алюмінію стеарату, вазелінової олії, церезину. Розчини СМТ готували розчиненням точної наважки субстанції в 0,1 М розчині натрію гідроксиду.

Розчини тропеоліну О готували розчиненням точної наважки реактиву фірми «Merck» (не менше 88% основної речовини) у воді очищеній.

Розчин натрію нітриту та натрію тетраборату готували розчиненням точної наважки реактивів кваліфікації «ч.д.а.» у воді очищеній.

Робочі розчини хлористоводневої кислоти та натрію гідроксиду готували розведенням концентрованої кислоти кваліфікації “х.ч.” у воді очищеній.

Обладнання

Спектрофотометричні вимірювання проводили на скануючому спектрофотометрі CARY.WIN – UV-VIS-50 (Varian, США), спектрофотометрі CARY.WIN – UV-VIS-100 (Varian, США) та Specord M-40 («Carl Zeiss Jena», Німеччина) в кюветах $l = 1$ см.

Величину рН вимірювали рН-метром РВ 11 (Sartorius, Німеччина), Seven Multi S40-K (Mettler Toledo, Швейцарія) та рН-150 М (РУП «Гомельський завод измерительных приборов», Білорусь) з аргентум-хлоридними електродами порівняння. Необхідне значення рН середовища створювали додаванням розчинів кислоти хлористоводневої та натрію гідроксиду.

Методика визначення СМТ з використанням тропеоліну О

Приготування робочого розчину стандартного зразка (РСЗ)

100 мг субстанції СМТ (точна наважка) розчиняють у 50 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду в мірній колбі номінальним об'ємом 100 мл, доводять об'єм тим самим розчинником до мітки. Аліквоту 5 мл отриманого розчину вносять в мірну колбу

місткістю 50 мл, та доводять до мітки 0,1 М розчином натрію гідроксиду, ретельно перемішують. Отриманий робочий РСЗ містить 0,1 мг/мл СМТ.

Приготування робочого розчину досліджуваного зразка (РДЗ)

1,5 г препарату (точна наважка) змішують з 50 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду в склянці об'ємом 100 мл. Суміш нагрівають на водяній бані при температурі 70–80°C не менше 10 хв до повного розплавлення суспензії. Отриману суміш фільтрують крізь паперовий складчастий фільтр (біла стрічка) у мірну колбу номінальним об'ємом 100 мл (склянку зі сумішшю, до закінчення фільтрування утримують у гарячій водяній бані для уникнення застигання препарату). Фільтр промивають декілька разів гарячим розчином 0,1 М натрію гідроксиду. Фільтрат охолоджують і доводять вміст колби до мітки тим же розчинником. Аліквоту отриманого розчину об'ємом 5 мл доводять до мітки в мірній колбі місткістю 50 мл 0,1 М розчином натрію гідроксиду та ретельно перемішують.

Приготування робочого розчину модельного зразка (РМЗ)

У склянку об'ємом 100 мл вносять сульфаметазин (100 мг), бензилпеніцилін (186 мг), стрептоміцин (86 мг), преднізолон (4,9 мг), алюмінію стеарат (57 мг), цезин (57 мг), вазелінову олію (1 г), що відповідає номінальному вмісту речовин у препараті. До отриманої суміші додають 50 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду. Всі наступні етапи приготування зразка проводять аналогічно, як у випадку РДЗ.

Приготування робочого розчину модельного зразка плацебо (РМЗП)

Змішують всі компоненти, як у випадку РМЗ, за винятком сульфаметазину. Приготування робочого РМЗП проводять аналогічно.

Визначення СМТ у суспензії «Мастисан-А-Форте».

До 1 мл робочого РДЗ (або робочих РСЗ, РМЗ, РМЗП відповідно) в мірні колби номінальним об'ємом 25 мл послідовно додають 5 мл 0,5 М кислоти хлористоводневої та 0,5 мл $1,25 \cdot 10^{-2}$ М розчину натрію нітриту. Після перемішування суміш витримують упродовж 10 хв у льодяній бані, додають 1 мл $1,25 \cdot 10^{-3}$ М розчину тропеоліну О, 2,5 мл 0,1 М розчину натрію тетраборату, доводять рН до значення 10,5 розчином натрію гідроксиду (близько 2,5 мл 1 М NaOH) і доводять вміст колби до мітки водою очищеною [13].

Інтенсивність світлопоглинання приготовлених розчинів вимірюють відносно компенсаційного розчину барвника, проведеного через усі етапи аналізу, при $\lambda = 595$ нм, $l = 1$ см.

Вміст СМТ в препараті (m), в мг/г, розраховують за формулою:

$$m = \frac{A_x \cdot m_c}{A_c \cdot m_x} \quad (1)$$

де: A_x – оптична густина робочого РДЗ;

A_c – оптична густина робочого РСЗ;

m_c – маса наважки СМТ для приготування робочого РСЗ, мг;

m_x – маса досліджуваного препарату для приготування робочого РДЗ, г.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Максимально допустима невизначеність результату аналізу Δ_{As} при допусках вмісту $B = 5\%$, обчислена згідно літературних джерел [5, 7, 8] становить:

$$\Delta_{As} \leq B \cdot 0,32 = 5 \cdot 0,32 = 1,6\%$$

Повна невизначеність результатів аналізу складається з невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції.

Невизначеність пробопідготовки Δ_{sp} препарату «Мастисан-А-Форте» обчислю-

вали, виходячи з методики пробопідготовки препарату та проведення аналітичної реакції визначення СМТ. Результати обчислень представлені в табл. 1.

Т а б л и ц я 1

Результати обчислення невизначеності пробопідготовки для визначення СМТ у препараті «Мастисан-А-Форте»

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність	
		РСЗ	РДЗ
1. Відбір наважки стандартного зразка сульфаметазину (дослідж. препарату)	m_0	0,2мг/100мг= =0,2%	0,2мг/1500 мг= =0,01%
2. Доведення до об'єму в мірній колбі 100 мл	100		0,12%
3. Відбір аліквоти піпеткою 5 мл	5		0,6%
4. Доведення до об'єму в мірній колбі 50 мл	50		0,17%
5. Відбір аліквоти піпеткою 1 мл	1		0,6%
6. Доведення до об'єму в мірній колбі 25 мл	25		0,23%

Обчислена згідно вимогами Державної Фармакопеї [9] **невизначеність пробопідготовки** становить:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{2 \cdot 0,12^2 + 4 \cdot 0,6^2 + 2 \cdot 0,17^2 + 2 \cdot 0,23^2 + 0,01^2 + 0,2^2} = \sqrt{1,5715} = 1,25\%$$

невизначеність кінцевої аналітичної операції, обчислена відповідно до вимог [8] становить:

$$\Delta_{FAO} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (s_A^2 + s_{cell}^2)}{3}} = 1,65 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot (0,2^2 + 0,1^2)}{3}} = 0,3\%$$

Повна невизначеність результатів аналізу, обчислена згідно з вимогами [8] становить:

$$\Delta_{AS} = \sqrt{(\Delta_{SP})^2 + (\Delta_{FAO})^2} = \sqrt{1,25^2 + 0,3^2} = 1,3\%$$

Специфічність методики кількісного визначення СМТ перевіряли, порівнюючи спектри поглинання робочих РМЗП та РМЗ препарату. Вплив плацебо не має перевищувати 0,51 % від максимально допустимої невизначеності результату аналізу (Δ_{AS}), тобто:

$$\max \delta \leq 0,32 \cdot \Delta_{AS} = 0,32 \cdot 1,6 = 0,51\%$$

Результати представлені на рис. 1.

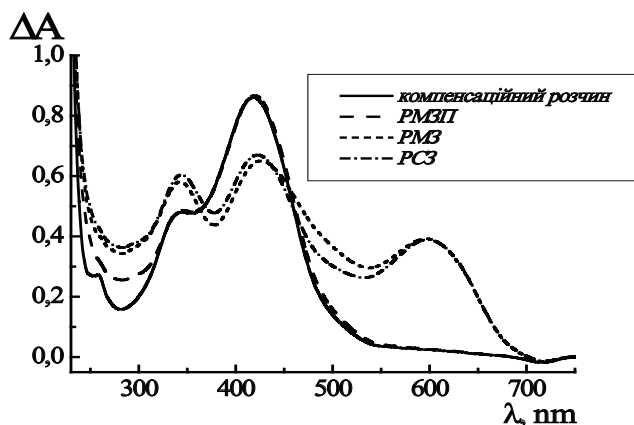


Рис. 1. Електронні спектри поглинання досліджуваних розчинів після проведення аналітичної реакції. $C(\text{HCl}) = 0,5\text{M}$; $C(\text{СМТ}) = 1,5 \cdot 10^{-5}\text{M}$; $C(\text{NaNO}_2) = 2,5 \cdot 10^{-4}\text{M}$; $C(\text{Tr O}) = 2,5 \cdot 10^{-5}\text{M}$; $C(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 0,5\text{M}$; pH 10,5; $l = 1\text{ cm}$.

Як випливає з рис 1, на спектрі світлопоглинання розчину плацебо немає максимуму світлопоглинання при довжині хвилі $\lambda = 595$ нм. Вплив оптичної густини розчину плацебо на результат аналізу є незначущим у порівнянні з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу, яка становить 0,51% [5, 7, 9] відносно оптичної густини максимуму поглинання робочого РМЗ:

$$\max \delta \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} = 0,32 \cdot 1,6 = 0,51\%$$

$$\delta = \frac{A_{pl}}{A_m} = \frac{0,0018}{0,3671} = 0,49\% \leq 0,51\%$$

де: A_{pl} – оптична густина робочого РМЗП;

A_m – оптична густина робочого РМЗ.

Отже, запропонована нами методика дозволяє визначати СМТ у присутності всіх інших компонентів суспензії без їхнього розділення.

Валідаційна характеристика **робасність** частково була нами досліджена при розробці методики спектрофотометричного визначення СМТ [2, 3, 13]. При дослідженні взаємодії СМТ з тропеоліном О було вивчено вплив різних чинників на проходження аналітичної реакції і, відповідно, на значення аналітичного сигналу у широких межах. У табл. 2 наведено оптимальні умови проходження реакції взаємодії СМТ з реагентом тропеоліном О, при яких зміна значень оптичної густини є незначущою порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу (0,51%).

Т а б л и ц я 2

Оптимальні умови отримання та деякі характеристики забарвленої сполуки сульфаметазину з кислотним моноазобарвником тропеоліном О

Умови	
Діазотування	
Концентрація HCl	0,5 – 1,0 М
Концентрація NaNO ₂	5·10 ⁻⁵ – 5·10 ⁻⁴ М
Порядок додавання реагентів	[HCl + СМТ + NaNO ₂]
Час утворення	20-30 хв
Азосполучення	
Концентрація Tr О	1,5·10 ⁻⁵ – 1·10 ⁻⁴ М
Концентрація Na ₂ B ₄ O ₇	0,005 – 0,01 М
pH	10,3 – 10,8
Порядок додавання реагентів	[СМТ _{дiaz} + TrO + Na ₂ B ₄ O ₇ + NaOH] pH
Співвідношення СА : TrO	1 : 1
Стабільність	1 год

При проведенні валідації нами було досліджено умови максимального вилучення СМТ із суспензії – встановлено тривалість нагрівання та оптимальні температурні межі водяної бані, а також концентраційні межі розчинника.

У табл. 3 наведено результати дослідження робасності методики спектрофотометричного визначення СМТ – вплив концентрації кислоти хлористоводневої або натрію гідроксиду, в яких розчиняється СМТ, вплив тривалості нагрівання та температури нагрівання суміші суспензії з розчинником у водяній бані.

Т а б л и ц я 3

Дослідження робастності методики спектрофотометричного визначення сульфаметазину у препараті “Мастисан-А-Форте”.

Чинник впливу	Межі змін досліджуваних параметрів	Оптична густина	δ , %	Критерій	Висновок
Концентрація хлористоводневої кислоти	0,05М	0,360	7,65	$\leq 0,51\%$	Не відповідає
	0,10М	0,373	4,85		
	0,15М	0,385	1,79		
Концентрація натрію гідроксиду	0,05М	0,390	0,51		Відповідає
	0,10М	0,392	0		
	0,15М	0,391	0,26		
Температура нагрівання водяної бані	70°C	0,393	0,26		Відповідає
	80°C	0,392	0		
	90°C	0,390	0,51		
Тривалість нагрівання у водній бані	10 хв	0,392	0		Відповідає
	15 хв	0,393	0,26		
	20 хв	0,394	0,51		

Умови проведення аналітичної реакції: $C(\text{HCl}) = 0,5 \text{ М}$; $C(\text{CA}) = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$; $C(\text{NaNO}_2) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$; $C(\text{Tr O}) = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$; $C(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 0,5 \text{ М}$; $\text{pH } 10,5$; $l = 1 \text{ см}$.

Як свідчать отримані результати, зміна значень оптичної густини при зміні досліджуваних параметрів є незначущою порівняно з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу, якщо вилучення СМТ проводити розчином 0,05–0,15М натрію гідроксиду, нагріваючи отриману суміш у водній бані при температурі 70–90 °С впродовж 10–20 хв.

Перевірка лінійності

Лінійну залежність досліджували в межах діапазону застосування аналітичної методики, для чого готували 9 розчинів, отриманих розведенням робочого РМЗ препарату з концентраціями СМТ, що становили від 80 до 120 % відносно його номінального вмісту. В табл. 4 представлені результати розрахунку концентрацій (C_i), середніх значень оптичних густин (A_i), а також значень X_i «уведено» відносно концентрації розчину порівняння (C_i/C_{St}) та Y_i «знайдено» відносно оптичної густини розчину порівняння (A_i/A_{St}).

Т а б л и ц я 4

Результати дослідження лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації СМТ

Назва розчину	C_p , мкг/мл	$X_i = \frac{C_i}{C_{St}} \cdot 100\%$	A_i	$Y_i = \frac{A_i}{A_{St}} \cdot 100\%$
Розчин порівняння	4,008	100,00	0,400	100,00
№1 (80%)	3,238	80,96	0,323	80,75
№2 (85%)	3,441	86,02	0,345	86,25
№3 (90%)	3,643	91,08	0,364	91,00
№4 (95%)	3,845	96,14	0,383	95,75
№5 (100%)	4,048	101,20	0,406	101,50
№6 (105%)	4,250	106,26	0,422	105,50
№7 (110%)	4,452	111,32	0,446	111,50
№8 (115%)	4,655	116,38	0,465	116,25
№9 (120%)	4,857	121,44	0,487	121,75

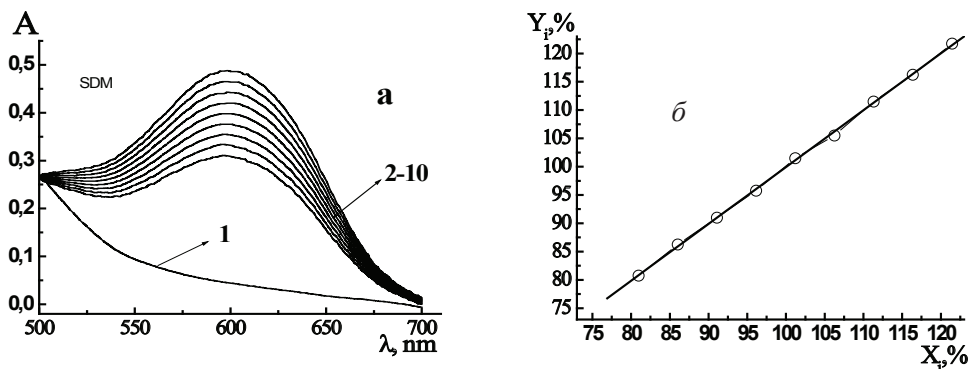


Рис. 2. Електронні спектри світлопоглинання (а) та графік лінійної залежності (б) аналітичного сигналу від концентрації СМТ. 1 – компенсаційний розчин, 2–10 –розведення РМЗ препарату з відповідними концентраціями СМТ. Умови проведення аналітичної реакції: $C(\text{HCl}) = 0,5 \text{ M}$; $C(\text{NaNO}_2) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $C(\text{Tr O}) = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $C(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7) = 0,5 \text{ M}$; $\text{pH } 10,5$; $l = 1 \text{ cm}$.

В табл. 5 наведено критерії лінійності і обчислені параметри лінійної залежності визначення СМТ у препараті «Мастисан-А-Форте».

Т а б л и ц я 5

Критерії лінійності і параметри лінійної залежності визначення СМТ у препараті «Мастисан-А-Форте»

Параметри	Значення	Критерії	Висновок
B	1,004	–	
S_b	0,010	–	
A	-0,444	1) $\leq 1,8757 $ 2) $\leq 2,5600 $	Витримуються (за першим критерієм)
S_a	0,990	–	
RSD_0	0,3519	–	
RSD_0/b	0,3504	$\leq 0,8445 $	Витримуються
RSD_y	13,89	–	
R	$ 0,9995 $	$\leq 0,9982 $	Витримуються

«–» не зазначають критерій для відповідного параметру.

Перевірка правильності та прецизійності

Валідаційні характеристики **правильність** та **прецизійність** розраховали використовуючи результати, отримані при вивченні лінійності.

Результати аналізу модельних розчинів та їх статистичну обробку наведено в табл. 6.

Т а б л и ц я 6

Результати аналізу модельних розчинів препарату «Мастисан-А-Форте» та результати їх статистичної обробки

№ з/п	$Y_p, \%$ (знайдено)	$X_p, \%$ (уведено)	$D_i = \frac{\text{знайдено}}{\text{уведено}} \cdot 100\%$
1	80,75	80,96	99,74
2	86,25	86,02	100,27
3	91,00	91,08	99,91
4	95,75	96,14	99,59
5	101,50	101,20	100,30
6	105,50	106,26	99,28
7	111,50	111,32	100,16
8	116,25	116,38	99,89
9	121,75	121,44	100,26

\bar{D}		99,93
Відносне стандартне відхилення RSD ₀ , %		0,3519
Критичне значення одностороннього довірчого інтервалу, D _x = 0,6543	$\Delta x \leq 1,6\%$	Відповідає
Критерій незначимості систематичної похибки, d = 0,07%	1. $\delta \leq 0,2181\%$ 2. $\delta \leq 0,512\%$	Відповідає (за першим критерієм)
Загальний висновок щодо методики		Коректна

Перевірка *внутрішньолабораторної прецизійності*

Аналіз проводили різні аналітики, які використовували різний посуд і при цьому виконували по 5 паралельних вимірювань для однієї серії препарату в різні дні в одній лабораторії. Для всіх результатів обчислювали єдине середнє значення вмісту СМТ (m_{intra}), відносне стандартне відхилення (S_{intra}) і відносний довірчий інтервал (Δ_{intra}).

У табл. 7 представлені результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності методики кількісного визначення (m , мг/5 мл) СМТ в препараті «Мастисан-А-Форте», обчислені згідно з рівнянням (1).

Т а б л и ц я 7

Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності методики кількісного визначення СМТ в препараті «Мастисан-А-Форте». $C(HCl) = 0,5M$; $C(NaNO_2) = 2,5 \cdot 10^{-4}M$; $C(Tr O) = 2,5 \cdot 10^{-5}M$; $C(Na_2B_4O_7) = 0,5M$; $pH 10,5$; $l = 1\text{ см}$.

№ аналізу	m , мг/5 мл		
	1 день (дослід 1)	2 день (дослід 2)	3 день (дослід 3)
1	362	357	350
2	362	352	360
3	343	359	357
4	353	360	365
5	359	366	363
середнє (\bar{m})	356	359	359
об'єднане середнє (\bar{m}_{intra})	358		
S_m	2,8	1,5	1,6
S_{intra} [4, 6]	1,7		
Δ_{intra} [4, 6]	1,35		

Перевірка *відтворюваності*

Відтворюваність перевіряли у міжлабораторному експерименті, в якому взяли участь чотири лабораторії – аналітична лабораторія хімічного факультету (ХФ) Львівського національного університету ім. І. Франка, лабораторія інструментальних методів контролю (ІМК) Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок, лабораторія Дослідного центру (ДЦ) та лабораторія Відділу контролю якості (ВКЯ) АТВ «Галичфарм».

У табл. 8 наведено результати аналізу однієї серії препарату «Мастисан-А-Форте» щодо вмісту СМТ у вищезазначених чотирьох лабораторіях, їх статистична обробка та вимоги до статистичних даних.

Т а б л и ц я 7

Результати перевірки міжлабораторної прецизійності методики кількісного визначення СМТ в препараті «Мастисан-А-Форте»

№ аналізу	$m, \text{ мг/5 мл}$			
	Лабораторія ІМК	Лабораторія ДЦ	Лабораторія ВКЯ	Аналітична лабораторія ХФ
1	357	353	350	361
2	352	363	360	354
3	359	356	355	360
4	360	356	362	352
5	366	361	354	355
Середнє значення (\bar{m})	359	358	356	357
Об'єднане середнє (\bar{m}_{intra})	357			
S_m	1,5	1,2	1,4	1,2
S_{intra} [4, 6]	1,2			
Δ_{intra} [4, 6]	0,93			

Величина Δ_{intra} не повинна перевищувати максимально допустиму невизначеність аналітичної методики 1,6%.

Величина Δ_{intra} обчислена при перевірці внутрішньолабораторної прецизійності згідно з [4, 6], становить 1,35%, а обчислена при перевірці відтворюваності – 0,93%, що в обох випадках відповідає вимозі $\Delta_{intra} \leq \max \delta = 1,35\% \leq 1,6\%$ та $\Delta_{intra} \leq \max \delta = 0,93\% \leq 1,6\%$.

В и с н о в к и

Шляхом експериментальних досліджень доведено, що спектрофотометрична методика кількісного визначення сульфаметазину, як продукту взаємодії з тропеоліном О, в препараті «Мастисан-А-Форте» придатна для контролю якості цього препарату за показником «Кількісне визначення», що підтверджують визначені валідаційні характеристики.

1. Аляутдин Р.Н. Фармакологія – 2-е изд., испр. – М.: ГОЕТАР-МЕД, 2004. – 592 с.
2. Бойко М., Врублевська Т., Коркуна О. та ін. // Вісн. НУ «Львівська політехніка» «Хімія, технологія речовин та їх застосування» – 2011. – Т. 700. – С. 89–94.
3. Бойко М., Врублевська Т., Коркуна О. та ін. // Вісник Львівського університету. Серія Хімія. – 2011. – Вип. 52. – С. 174–183.
4. Гризодуб А.И. // Фармаком – 2002. – № 3. – С. 42–50.
5. Гризодуб А.И. // Фармаком – 2006. – № 1/2. – С. 35–44.
6. Гризодуб А.И., Зволинская Н.Н., Архипова Н.Н. и др. // Фармаком – 2004. – № 2. – С. 20–34.
7. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В. и др. // Фармаком – 2004. – № 3. – С. 3–17.
8. Державна Фармакопея України. – Доп. 1. – Х.: РІГЕР, 2004. – 520 с.
9. Державна Фармакопея України. – Доп. 2. – Х.: Науково-експертний фармакопейний центр, 2008. – 620 с.
10. Маркова В.И., Михайлов И.Б., Неженцев М.В. Фармакологія – СПб.: Фолиант, 2001. – 416 с.
11. Харкевич Д. А. Фармакологія: Учебник. – 9-е изд., перераб., доп. и испр. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 736 с.

12. Юргель Н.В., Младенцев А.Л., Бурдейн А.В. и др. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств – М.: — Изд. «Спорт и Культура - 2000», 2007. – 192 с.

13. Boiko M., Vrublevska T., Korkuna O. *at all.* // Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2011. – Vol. 79A, No. 2. – P. 325-331.

14. British Pharmacopoeia, BP 2009.

15. European Pharmacopoeia (Eur. Ph.). 7-th Ed. Strasbourg: Council of Europe, 2010.

16. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (CPMP/ICH/381/95).

17. United States Pharmacopoeia, USP 30-NF25 Convention Inc., Rockville, MD XXVI, 2007.

Надійшла до редакції 19.12.2011.

*М. Я. Бойко, Т. Я. Врублевская, О. Я. Коркуна, И. Я. Коцюмбас, Г. Ю. Тесляр,
О. Г. Смалюх*

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУЛЬФАМЕТАЗИНА В ПРЕПАРАТЕ «МАСТИСАН-А-ФОРТЕ»

Ключевые слова: Мастисан-А-Форте, сульфаметазин, тропеолин О, спектрофотометрия, количественное определение, валидационные характеристики

Предложена аналитическая методика спектрофотометрического определения сульфаметазина в ветеринарном препарате (суспензии) «Мастисан-А-форте», в основе которой лежит измерение светопоглощения окрашенного продукта реакции взаимодействия диазосоли сульфаметазина с азокрасителем тропеолином О. Результаты проведенных валидационных исследований с использованием критериев приемлемости для допусков отклонения от номинального содержания $B = \pm 5,0\%$ подтверждают специфичность, робастность, линейность, правильность, прецизионность и воспроизводимость предложенной методики в диапазоне ее приложения.

*М. Ya. Boiko, T. Ya. Vrublevska, O. Ya. Korkuna, I. Ya. Kotsiumbas, G. Yu. Teslyar,
O. G. Smalyuh*

ELABORATION AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD OF SULPHAMETHAZINE SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION IN MEDICINE «MASTISANUM-A-FORTE»

Key words: Mastisanum-A-Forte, sulphamethazine, Tropaeolin O, spectrophotometry, quantitative determination, validation parameters

On the basis of absorbance measuring of the coloured azocoupling reaction products of diazotized sulphamethazine with monoazo dye tropaeolin O, the analytical method of sulphamethazine spectrophotometric determination in veterinary preparation (suspension) “Mastisanum-A-Forte” has been elaborated. Data of conducted validating studied with the use of criterion admissibility for the content limits $B = \pm 5,0\%$, confirmed the specificity, robustness linearity, accuracy, precision, intermediate precision and reproducibility of proposed method in the range of its application.