РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИЗНАЧАННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ НЕОМІЦИНУ СУЛЬФАТУ У ВЕТЕРИНАРНИХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ ВЕРХ З ДЕРИВАТИЗАЦІЄЮ ПЕРЕД КОЛОНКОЮ І ФЛУОРЕСЦЕНТНИМ ДЕТЕКТУВАННЯМ

*Р. Д. Остапів, канд. біол. наук,
С. Л. Гуменюк, старший науковий співробітник,
В. І. Ткаченко, канд. біол. наук,
С. Ю. Чіпак, старший лаборант з вищою освітою*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок,
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна,
romostapiv@scivp.lviv.ua

Мета роботи полягала у розробці методики ідентифікації та кількісного визначання неоміцину сульфату в інтрацистернальних ветеринарних препаратах. Методику розробили та валідували за показниками вибіркової, лінійності та параметрами придатності хроматографічної системи. У якості зразку-об'єкту для розробки використовували чотирикомпонентний інтрацистернальний препарат із вмістом неоміцину 25 мг/г. Стандартний зразок та випробну пробу розчиняли у воді, очищеній до концентрації 100 мкг/мл, після чого проводили дериватизацію за допомогою 9-флуоренілметоксикарбонілу хлориду за кімнатної температури. Сумарна невизначеність аналізу становила 1,62 %, що є в межах, рекомендованих у ДФУ 2.0. Зразки розділяли на хроматографі Dionex Ultimate 3000, оснащеному хроматографічною колонкою Acclaim C18 150×4,6, 5 μм. Рухомою фазою служила суміш ацетонітрилу та води в об'ємному співвідношенні 95:5. Неоміцину сульфат детектували флуоресцентно за довжин хвиль λ_{ex} – 254 нм, λ_{em} – 303 нм.

За вищевказаних умов вдалось повністю розділити дві ізоформи неоміцину (час затримки виходу хроматографічних піків – 6,57 хв та 6,98 хв), 9-флуоренілметоксикарбонілу хлорид та інші компоненти досліджуваного препарату (час затримки виходу відповідних хроматографічних піків – 2–5 хв). При цьому, параметри придатності хроматографічної системи не виходили за межі, зазначені в рекомендаціях USA Food and Drug Association. Для піків неоміцину сульфату ефективність хроматографічної системи становила 7700–7950 теор. тарілок. Відносний стандартний відхил (RSD) для площ піків діючої речовини становив $\pm 0,33\%$, а коефіцієнт розділення піків (R_s) неоміцину сульфату від піків дериватизаційного реагенту та інших компонентів препарату становив 11,9. Коефіцієнт симетрії піку становив – 1,18. Калібрувальні криві були лінійними у рекомендованому ДФУ 2.0 діапазоні (80–120 % від номінальної концентрації відповідної діючої речовини). Коефіцієнт лінійності (R^2) для суми площ піків неоміцину сульфату становив – 0,9991.

Ключові слова: ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, ДЕРИВАТИЗАЦІЯ, НЕОМІЦИНУ СУЛЬФАТ, ІНТРАЦИСТЕРНАЛЬНІ ПРЕПАРАТИ, 9-ФЛУОРЕНІЛМЕТОКСИКАРБОНІЛУ ХЛОРИД, ВЕТЕРИНАРНІ ПРЕПАРАТИ.

DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF NEOMYCIN SULPHATE IN VETERINARY PREPARATIONS WITH PRECOLUMN DERIVATIZATION AND FLUORESCENT DETECTION

R. D. Ostapiv, S. L. Humeniuk, V. I. Tkachenko, S. Yu. Chipak

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11, Donetska str., Lviv, 79019, Ukraine
romostapiv@scivp.lviv.ua

The aim of work was to develop a method for the identification and quantification of neomycin sulfate in intracisternal veterinary preparations. The method was developed and validated by: selectivity, linearity and suitability parameters of the chromatographic system. A four-component intracisternal drug with a 25 mg/g neomycin content was used as an object sample for method development. The standard sample and the test sample were dissolved in purified water to a concentration of 100 µg/ml, followed by derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride at room temperature. The total uncertainty of the analysis was 1.62 %, which is within the limits recommended in SFU 2.0. The samples were separated on a Dionex Ultimate 3000 chromatograph equipped with an Acclaim C18 150 × 4.6.5 µm chromatographic column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and water in a volume ratio of 95:5. Neomycin sulfate was detected fluorescently at wavelengths λ_{ex} - 254 nm, λ_{em} - 303 nm.

Under the above conditions, it was possible to completely separate the two isoforms of neomycin (retention time of chromatographic peaks - 6.57 min and 6.98 min), 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride and other components of the study drug (retention time of the corresponding chromatographic peaks - 2-5 min). In this case, the parameters of the suitability of the chromatographic system did not exceed the limits specified in the recommendations of the USA Food and Drug Association. For peaks of neomycin sulfate, the efficiency of the chromatographic system was 7700–7950 theoretical plates. The relative standard deviation (RSD) for the peak areas of the active substance was $\pm 0.33\%$, and the coefficient of separation of the peaks (RS) of neomycin sulfate from the peaks of the derivatization reagent and other components of the drug was 11.9. The coefficient of peak symmetry was 1.18. The calibration curves were linear in the recommended SFU 2.0 range (80–120% of the nominal concentration of the corresponding active substance). The coefficient of linearity (R^2) for the sum of neomycin sulfate peak areas was – 0.9991.

Keywords: HIGHLY EFFICIENT LIQUID CHROMATOGRAPHY, DERIVATIZATION, NEOMYCIN SULPHATE, INTRACISTRAL PREPARATIONS, 9-FLUORENYL METHOXYCARBONYL CHLORIDE, VETERINARY PREPARATIONS.

Аміноглікозиди – група сполук, багато з яких володіють антибактеріальною активністю. Характерною рисою аміноглікозидів є наявність аміносахаридів, що з'єднані глікозидним зв'язком із агліконовим циклічним фрагментом. Аміноглікозиди є ефективними проти аеробних грам-негативних бактерій та кількох десятків видів підкласу анаеробних бактерій *Bacilli*. Механізм дії антибіотиків – через інгібування синтезу протеїнів і необоротним зв'язуванням з бактерійними рибосомами (Krause et al., 2016). Першим синтезованим аміноглікозидом є стрептоміцин, отриманий з *Streptomyces griseus*. Іншими представниками цього класу, які застосовуються у ветеринарній медицині, є неоміцин, канаміцин та гентаміцин. Переважно аміноглікозиди застосовуються у багатокомпонентних препаратах разом з пеніцилінами, сульфаніламидами, цефалоспорином та триметопримом для посилення ефективності боротьби з бактерійною інфекцією (Kotsiumbas, 2015).

Неоміцин входить до різних за формою виготовлення та способом застосування класів препаратів – порошок для перорального застосування, ін'єкційних та інтрацистернальних

препаратів зі складними матрицями, що може утруднити їх екстракцію (Hari, 2019). Неоміцин має низьке поглинання в ультрафіолетовій ділянці спектру, дві ізоформи, високу хроматографічну рухливість, що ускладнює його пряме визначання методом рідинної хроматографії чи спектрофотометрії (Morovatdar et al., 2021). Тому у більшості методик для визначання цього антибіотику використовують дериватизацію з орто-фталевим діальдегідом та флуоресцентним детектуванням (Glinka et al., 2020). Однак, ця дериватизація є часозатратною (у різних джерелах літератури від 30 до 90 хв) та ресурсоємною (необхідна інкубація за точної температури на водяній бані). Крім цього, при визначенні кількісного вмісту цих речовин застосовується складна рухома фаза (Shaikh et al., 1991).

Метою роботи є розробка простішої, швидшої та точної методики визначання кількісного вмісту неоміцину у ветеринарних препаратах із застосуванням рідинної хроматографії з дериватизацією перед колонкою 9-флуоренілметоксикарбоніл хлоридом та флуоресцентним детектуванням.

Матеріали і методи. У роботі використовували стандартний зразок неоміцину сульфату, виробництва Sigma-Aldrich. Вихідний розчин неоміцину з концентрацією 1 мг/мл готували з урахуванням чистоти зразка, зазначеній у сертифікаті, шляхом розчинення у воді очищеній *P*. Вихідний розчин розводили тим самим розчинником до концентрацій робочих розчинів стандартних зразків (80 – 120 мкг/мл). Після цього 0,1 мл відповідного робочого розчину стандартного зразку вносили у колбу, об'ємом 10 мл, додавали 2,0 мл розчину 0,01 М кислоти борної, дотитрованого до значення рН 9,5 та додавали 0,2 мл 0,01 М розчину 9-флуоренілметоксикарбоніл хлориду в ацетонітрилі. Отриманий розчин змішували протягом 1 хвилини на орбітальному змішувачі та витримували протягом 15 хв за кімнатної температури. Дериватизований зразок доводили до позначки ацетонітрилом та фільтрували через фільтри шприцеві з порами розміром 0,45 мкм.

У якості зразку-об'єкту розробки використовували чотирикомпонентний інтрацистернальний препарат з вмістом неоміцину 25 мг/г. Основний розчин зразку концентрацією 1 мг/мл готували шляхом розчинення у воді очищеній *P*, з наступним розбавлянням аліквоти зразку до концентрації 100 мкг/мл тим самим розчинником та піддаванням описаній вище процедурі дериватизації, як і розчинів робочих стандартних зразків. Контрольну пробу готували додаванням 0,1 мл води очищеної *P* замість робочого розчину стандартного зразку/препарату і проведенням дериватизації аналогічно до стандартного зразку/препарату.

Дослідження проводили на хроматографі Dionex Ultimate 3000, оснащеному насосом LPG-3400SD, автосемплером ACC-3000 та детектором флуоресценції FLD-3100. Зразки розділяли на хроматографічній колонці Acclaim C18 150×4,6, 5 μm. Рухомою фазою слугувала суміш ацетонітрил : вода у співвідношенні 95:5. Об'єм інжекції складав 0,005 мл, швидкість потоку рухомої фази – 1,0 мл/хв, температура колонки становила 30 °С, час одного розділення – 10 хвилин. Довжини хвиль: λ_{ex} – 254 нм, λ_{em} – 303 нм. Обчислення результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Chromeleon 7.2. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel 2010. Валідацію методики проводили за показниками вибірковості, лінійності та параметрів придатності хроматографічної системи.

Результати й обговорення. Згідно з ДФУ 2.0, 2015, максимально допустима невизначеність методу аналізу не має перевищувати 3,2 % за формулою (Derzhavna farmakoreia Ukrainy 2.0. 2015a):

$$\max \Delta_{As} \leq B \cdot 0,32 = 10 \cdot 0,32 = 3,2\%$$

де: *B* – допуски відхилення від декларованого вмісту діючої речовини, які закладаються виробником препарату (найчастіше ±10 % за специфікаціями виробників препаратів).

У таблиці 1 наведені значення невизначеностей для процедур готування розчинів зразку препарату із вмістом неоміцину сульфату та стандарту діючої речовини, які встановлені калібруванням ваг, колб та дозаторів.

Таблиця 1

Бюджет загальної невизначеності при випробуваннях препарату із вмістом неоміцину сульфату

Операція готування проб	Параметр формули обчислення	Невизначеність
PPC3 (неоміцину сульфату)		
1. Відбір наважки СЗ неоміцину сульфату	m_0	0,40%
2. Доведення до об'єму в мірній колбі 50 мл	50	0,17%
3. Відбір аліквоти піпеткою 1 мл	1	0,98%
4. Доведення до об'єму в мірній колбі 10 мл	10	0,50%
PPВП		
5. Відбір об'єму досліджуваного препарату	10	0,98%
6. Доведення до об'єму в мірній колбі 200 мл	200	0,17%
7. Відбір аліквоти піпеткою 1 мл	1	0,98%
8. Доведення до об'єму в мірній колбі 10 мл	10	0,50%

Невизначеність процедур готування проб (Δ_{SP}), згідно з ДФУ 2.0, 2015 обчислювали за формулою:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{2 \cdot 0,17^2 + 2 \cdot 0,50^2 + 0,4^2 + 2 \cdot 0,98^2} = \sqrt{2,6386} = 1,62\% \\ 1,62\% \leq 3,2\%$$

Невизначеність вимірювання стандартного зразка ($\Delta_{FAO\tau}^{STD}$), згідно з ДФУ 2.0, 2015, обчислювали, підставивши значення невизначеностей автосемплера та детектора хроматографа згідно з сертифікатами їх калібрування (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0, 2015a):

$$\Delta_{FAO,r}^{STD} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2,13 \times 0,18 = 0,17$$

Невизначеність вимірювання досліджуваних зразків ($\Delta_{FAO\tau}^{SMPL}$), згідно з ДФУ 2.0, 2015, обчислювали, підставивши значення похибок автосемплера та детектора хроматографа (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0, 2015a):

$$\Delta_{FAO,r}^{SMPL} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2,13 \times 0,18 = 0,17$$

Обчислена сумарна невизначеність вимірювання ($\Delta_{FAO\tau}$) становить:

$$\Delta_{FAO,r} = (0,17)^2 + (0,17)^2 = 0,06$$

Обчислена сумарна невизначеність аналізу ($\Delta_{AS,r}$), згідно з ДФУ 2.0, 2015 становить (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0, 2015a):

$$\Delta_{AS,r} = \sqrt{1,62^2 + 0,06^2} = 1,62$$

Отже, $\Delta_{AS,r} (1,62\%) < \max \Delta_{AS,r} (3,2\%)$, а значить методика є придатною для подальшого оптимізування та валідації.

Наступним кроком було проведення валідації методики за параметром вибірковості. Визначання вибірковості проводили, порівнюючи хроматограми робочого розчину стандартного зразку (PPC3), робочого розчину випробної проби (PPВП) і розчину плацебо (PPПл). Жоден пік на хроматограмі РРПл повністю або частково не перекривається за часом затримки з піками неоміцину на хроматограмах PPC3 та PPВП (рис. 1) (ДФУ 2.0, 2015 (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0, 2015b)).

Рис. 1. Співставлені хроматограми контрольної проби (А), дериватизованого розчину стандартного зразку неоміцину сульфату (Б) та інтрацистернального препарату з вмістом неоміцину сульфату (В).

Оскільки, обраний режим хроматографічного розділення забезпечував виконання вимоги ДФУ 2.0 (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0, 2015b) до параметру вибірковість, проводили дослідження параметрів хроматографічних піків неоміцину сульфату та найближчого піку дериватизаційного реагенту (табл. 2).

Параметри придатності хроматографічної системи

Параметри	Характеристики хроматографічних піків			Вимоги до показника
	Дериватизаційний реагент	Неоміцин 1	Неоміцин 2	
Час затримки, хв.	3,9	6,6	7,0	—
Ефективність хроматографічної колонки (N)	10240	7950	7700	Не менше 2000
Коефіцієнт симетрії піку (As)	1,27	1,18	1,18	Від 0,8 до 1,5
Відносний стандартний відхил (RSD), %	-	0,33	0,14	Не більше 1,43 %
Ширина піку, хв.	0,2	0,34	0,40	—
Ступінь розділення R_s	11,91	1,34	1,34	Не менше 1,5

Ступінь розділення хроматографічного піку за рекомендаціями FDA повинен бути не менше 1,5, однак у випадку, коли обидва піки належать до неоміцину, цими рекомендаціями можна знехтувати. За всіма іншими параметрами, характеристики хроматографічних піків співпадають з рекомендаціями FDA по розробці хроматографічних методик (Validation of Chromatographic Methods, 1994).

Після визначення параметрів придатності хроматографічної системи проводили дослідження за параметром лінійності. Графік залежності площі хроматографічних піків від концентрації аналіту представлено на рис. 2.

Рис. 2. Графік залежності площі хроматографічних піків від концентрації аналіту у розчині.

Коефіцієнт R^2 для суми площ піків неоміцину сульфату був у межах, рекомендованих ДФУ 2.0 (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. 2015b).

В И С Н О В К И

Досліджувані характеристики методу ідентифікації та кількісного визначання вмісту неоміцину сульфату у ветеринарному препараті не виходять за межі критеріїв, зазначених у директиві FDA (Validation of Chromatographic Methods, 1994) та ДФУ 2,0, 2015 (Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0, 2015a,b), тому метод придатний для продовження валідації за параметром прецизійності та внутрішньолaboratorна повторюваність.

Перспективи досліджень. Продовження валідації методики за параметрами прецизійності та внутрішньолабораторна повторюваність.

References

- Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. (2015a). Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr» Kharkiv: RIREH, Vol 1. P. 922–929 [In Ukrainian].
- Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. (2015b). Derzhavne pidpriemstvo «Naukovo-ekspertnyi farmakopeinyi tsentr» Kharkiv: RIREH, Vol 1. P. 910–916 [In Ukrainian].
- Glinka M., Wojnowski W., Wasik A. (2020). Determination of aminoglycoside antibiotics: Current status and future trends. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 131: 1–19. DOI: 10.1016/j.trac.2020.116034.
- Hari R., Taherunnisa S., Raut S.Y., Mutalik S., Koteshwara K.B. (2019). Challenges in the development of analytical test procedure for aminoglycosides: A critical review. *J. Appl. Pharm. Sci.* 9(11): 145–152. DOI: 10.7324/JAPS.2019.91118
- Kotsiumbas I. Ya., Kosenko Yu. M., et al. (2015). *Dovidnyk kormovykh dobavok i premiksiv*. Lviv: TzOV VF «Afisha»; 1408 p. [In Ukrainian]
- Krause K. M., Serio A. W., Kane T. R., Connolly L. E. (2016). Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 6: 1–8. DOI: 10.1101/cshperspect.a027029.
- Morovatdar S., Khameneh B., Khashyarmanesh Z, Fazly B. S. (2021). An overview of different methods for aminoglycoside residue determination. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 33 (28A), 1–30. DOI: 10.9734/jpri/2021/v33i28A31506
- Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, USA: FDA, 1994. – 33.
- Shaikh B., Jackson J., Guyer G., Ravis W. R. (1991). Determination of neomycin in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. Application to a preliminary pharmacokinetic study. *J. Chromatogr.* 571(1-2): 189-198. Doi: 10.1016/0378-4347(91)80445-i.