

Dezvoltarea și validarea unei metode HPLC pentru determinarea amoxicilinei trihidrat, colistinului sulfat, nipaginului și nipasolului dintr-o suspensie injectabilă

Development and validation of a HPLC method for the determination of amoxicillin trihydrate, colistin sulphate, nipagin and nipasol in an injectable suspension

Violeta Tauber, Viorica Chiurciu

Romvac Company S.A.

Corespondență: violeta.tauber@outlook.com

Cuvinte cheie: *amoxicilina trihidrat, colistin sulfat, nipagin, nipasol, metoda HPLC.*

Key words: *amoxicillin trihydrate, colistin sulphate, nipasol and nipagin, HPLC method.*

Rezumat

A fost dezvoltată și validată o metoda cromatografică de determinare simultană a amoxicilinei trihidrat, colistinului sulfat, nipaginului și nipasolului dintr-o suspensie injectabilă. Separarea cromatografică eficientă a fost realizată pe o coloana Hypersil Gold (150mm x 4.6mm, 5.0 μm) cu o fază mobilă formată din sulfat de sodiu 4.46 g‰, pH 2.5 (ajustat cu acid sulfuric diluat) și acetonitril, folosind un debit de 1 mL/min. Detecția compusilor s-a făcut la diferite lungimi de undă folosind un detector DAD. Eluția s-a făcut în 42 de minute cu un gradient în șapte etape. Metoda HPLC propusă a fost validată urmărind parametrii: specificitate, liniaritate, limită de detecție și de cuantificare, precizie și acuratețe. Metoda HPLC a fost aplicată unei suspensii injectabile în care analiții au fost cuantificați cu succes fără interferențe din partea excipientilor.

Abstract

A liquid chromatographic method has been developed and validated for simultaneous determination of amoxicillin trihydrate, colistin sulphate, nipagin and nipasol in injectable suspension. Efficient chromatographic separation was achieved on a Hypersil Gold (150mm x 4.6mm, 5.0 μm) with mobile phase containing 4.46 g‰, pH 2.5 (adjusted with dilute sulphuric acid) in gradient with acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL/min. detection of the analyses was performed at different wavelengths using a DAD detector. The elution was a seven step gradient elution program in 42 minutes. The proposed HPLC method was statistically validated with respect to specificity, linearity, limits of detection and quantification, ranges, precision and accuracy. The HPLC method was applied to injectable suspension in which the analyses were successfully quantified with no interfering peaks from excipients.

Introducere

Amoxicilina este o penicilina de sinteză cu spectru larg și toxicitatea redusă, care are o puternică acțiune bactericidă.

Colistinul sulfat (din clasa polimixinelor) este un antibiotic de eluție pentru germenii Gram-negativi.

Amestecul celor două antibiotice se recomandă în infecții acute, primare sau secundare: colibaciloza, salmoneloza, stări septicemice, enterite infecțioase, infecții urogenitale.

Un mililitru de suspensie injectabilă conține cantități diferite de substanțe active, după cum urmează 100 mg de amoxicilina trihidrat și 12,5 mg de colistin sulfat.

În urmărire, principalul obiectiv al acestui studiu a fost de a dezvolta o metodă pentru cuantificarea a celor două substanțe active precum și a nipaginului și nipasolului într-o singură rulare.

După validarea, metoda a fost folosită cu succes pentru analiza produsului Amoxicolistin - suspensie injectabilă.

Materiale și metodă

Materiale de referință și reactivi

Standardele amoxicilina trihidrat, colistin sulfat, nipagin, nipasol au fost achiziționate Farmacopeea Europeană.

Produsul farmaceutic supus studiului, Amoxicolistin – suspensie injectabilă a fost furnizat de Romvac Company.

La prepararea tuturor soluțiilor s-a folosit:

- apă ultrapură, obținută cu un sistem Milli-Q Integral (Merck Millipore).
- acetoneitrilul grad HPLC (Merck).
- sulfatul de sodiu (Sigma).
- acidul sulfuric 50% folosit pentru ajustarea pH-ului (Fluka).

Sistem și condiții cromatografice

Sistemul cromatografic folosit a fost Ultimate 3000 Thermo Scientific LC Surveyor (Thermo Electron Corporation, USA), echipat cu pompa cuaternară de înaltă presiune prevăzută cu degazor, autosampler cu buclă de 100 μ L, termostat pentru coloană, termostat pentru autosampler și detector UV-VIS– diode array. Întregul sistem cromatografic este controlat cu softul Chromeleon.

Separarea cromatografică s-a realizat pe o coloană Hypersil Gold, L= 150 mm, ID=4,6 mm, 5 μ m.

Faza mobilă folosită este formată din amestecul acetoneitril : sulfat de sodiu 4.46 g% cu pH=2.5 cu acid sulfuric.

Debitul de 1 mL/min și volumul de injecție de 10 μ L sunt parametrii utilizați pentru această metodă.

Prepararea soluțiilor standard stoc

Soluția standard stoc de amoxicilina trihidrat (1 mg/mL) – Într-un balon cotate de 10 ml s-au cântărit 10 mg de amoxicilina trihidrat, s-au adăugat 4 mL de apă, iar după dizolvare s-a completat volumul cu apă. Soluția s-a ultrasonat pentru omogenizare.

Soluția standard stoc de colistin sulfat (5 mg/mL) – Într-un balon cotate de 5 ml s-au cântărit 25 mg de colistin sulfat, s-au adăugat 4 mL de amestec acetoneitril / apă 2 / 8 și după dizolvare s-a completat volumul cu amestec. Soluția s-a ultrasonat pentru omogenizare.

Soluția standard stoc de nipagin (0,6 mg/mL) – Într-un balon cotate de 20 ml s-au cântărit 12 mg de nipagin, s-au adăugat 4 mL de metanol și după dizolvare s-a completat volumul cu metanol. Soluția s-a ultrasonat pentru omogenizare.

Soluția standard stoc de nipasol (0,2 mg/mL) – Într-un balon cotate de 25 ml s-au cântărit 5 mg de nipasol s-au adăugat 4 mL de metanol și după dizolvare s-a completat volumul cu metanol. Soluția s-a ultrasonat pentru omogenizare.

Prepararea probelor

Soluția stoc de Amoxicolistin- suspensie injectabilă - Într-un balon cotate de 50 ml s-a dizolvat 1 mL de suspensie injectabilă, (echivalent cu 100 mg de amoxicilină trihidrat, 12,5 mg colistin sulfat, 0,75 mg de nipagin și 0,25 mg de nipasol), s-au adăugat 25 mL de amestec acetoneitril/ apă 2/8 și după dizolvare s-a completat volumul cu amestec acetoneitril / apă 2 / 8. Soluția s-a ultrasonat pentru omogenizare.

Pentru determinarea cantitativă de colistin sulfat, nipagin, nipasol, soluția stoc Amoxicolistin s-a injectat ca atare.

Pentru determinarea cantitativă de amoxicilina, 1 mL de soluția stoc de Amoxicolistin s-a diluat cu amestec acetoneitril / apă 2 / 8 într-un balon cotate de 10 mL.

Înainte de injectarea în sistemul cromatografic, soluția a fost filtrată prin filtru PVDF 0.45 μ m.

Validarea metodei cromatografice

Validarea metodei HPLC pentru determinarea simultană a amoxicilinei trihidrat, colistinului sulfat, nipaginului și nipasolului din produsul veterinar, s-a făcut în conformitate cu ghidurile ICH.

Parametrii evaluați au fost:

- specificitate,
- liniaritate,
- limită de detecție și cuantificare,
- precizie și
- acuratețe.

Specificitatea a fost verificată calculând parametrii ca: timp de retenție, talere teoretice, asimetrie, rezoluție.

Linearitatea metodei propuse, a fost stabilită pe baza curbelor de calibrare, obținute prin reprezentarea grafică a ariilor vs concentrațiile substanțelor active, în domeniul 10% - 200%.

Curbele de calibrare efectuate au fost folosite pentru determinarea limitelor de detecție și de cuantificare.

Precizia metodei a fost verificată atât din punct de vedere al repatabilității, cât și al reproductibilității intermediare prin calcularea deviației standard.

Acuratețea metodei poate fi evaluată prin procente de recuperare ale substanțelor active.

Studiul de recuperare a fost realizat folosind soluții de probă cu concentrațiile în domeniul 80% - 120%.

Rezultate și discuții

În dezvoltarea metodei HPLC pentru a obține o separare eficientă a celor patru substanțe din produsul Amoxicilina au fost variate coloanele, compoziția și pH-ul fazei mobile.

Separarea izocratică experimentată inițial s-a dovedit a fi insuficientă, și prin urmare s-a recurs la gradient pentru o separare mai bună a substanțelor active.

Reprezentarea eluției în gradient în șapte etape este prezentată în Tabelul 1.

Tabelul 1

Reprezentarea eluției în gradient în șapte etape

Timp (min)	Debit (mL/min)	% solvent	
		B acetonitril	C Na ₂ SO ₄
0	1	5	95
20	1	25	75
26	1	25	75
30	1	50	50
33	1	50	50
37	1	5	95
42	1	5	95

Identificarea substanțelor active, a fost făcută cu ajutorul soft-ului, cu care s-au calculat și alți parametri de performanță ca rezoluția, asimetria, timpul de retenție și talerele teoretice.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.

În condițiile experimentale descrise mai sus au fost trasate curbele de calibrare pentru amoxicilina trihidrat, colistin sulfat, nipagin și nipasol în intervalul 10%-200% față de concentrațiile de lucru.

Calculul statistic efectuate pe baza curbelor de calibrare: ecuația de regresie și coeficientul de corelație sunt prezentate în Tabelul 3.

Rezultatele preciziei sunt prezentate în Tabelul 4, și se poate observa că valorile deviației standard relative sunt în limitele specificate (% RSD < 2).

Acuratețea, reflectată prin procente de recuperare a celor trei substanțe active, este ilustrată în Tabelul 5.

Procente de recuperare pentru amoxicilina trihidrat, colistin sulfat, nipagin și nipasol sunt mai mari de 90%.

Specificitatea metodei a fost atestată de separarea cromatografică a celor două substanțe active în prezența excipientilor.

Peak-urile obținute au fost bine definite și separate la nivelul liniei de bază, după cum se poate observa și din figura 1.

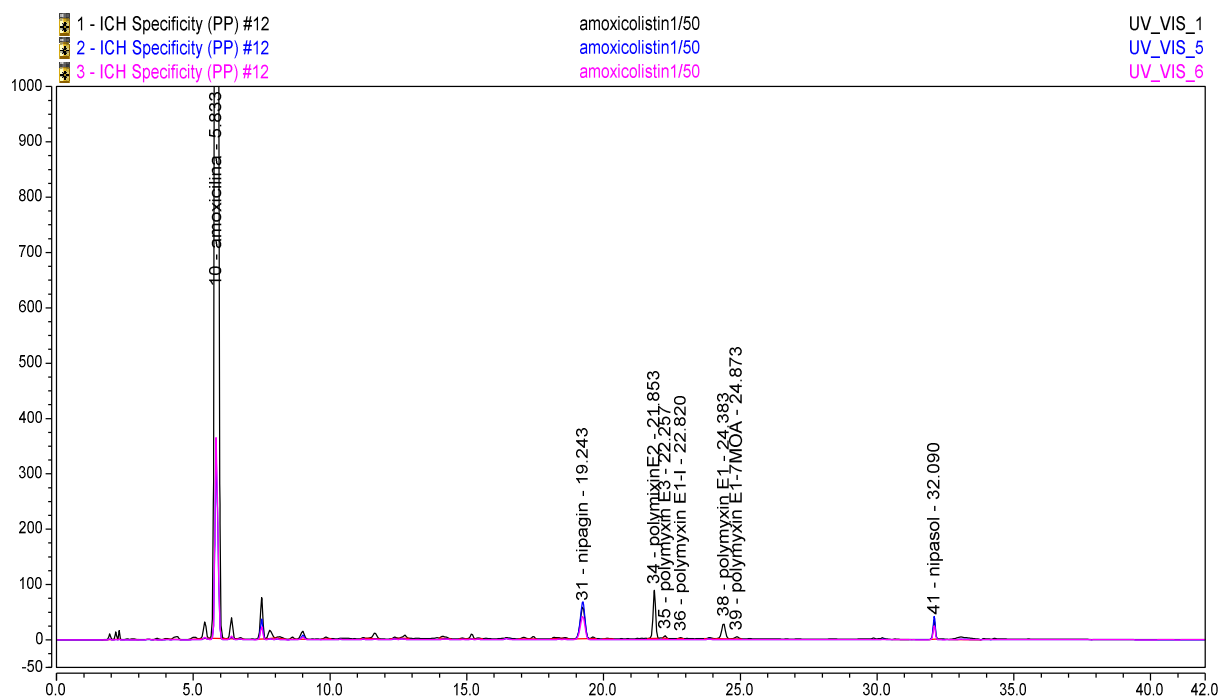


Figura 1. Cromatograma tipică a produsului Amoxicolistin –suspensie injectabila

Tabelul 2

Parametrii calculați pentru amestecul din figura 1.

Peak Name	Retention Time (min)	Resolution (EP)	Asymmetry (EP)	Plates (EP)
UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1	UV_VIS_1
polymixinE2	21.853	2.41	0.95	269142
polymyxin E3	22.257	3.22	0.97	284806
polymyxin E1-I	22.82	4.64	0.92	245353
polymyxin E1	24.383	1.95	0.94	165231
polymyxin E1-7MOA	24.873	20.63	0.93	141957
Peak Name	Retention Time (min)	Resolution (EP)	Asymmetry (EP)	Plates (EP)
UV_VIS_5	UV_VIS_5	UV_VIS_5	UV_VIS_5	UV_VIS_5
amoxicilina	5.833	3	1.22	13922
Peak Name	Retention Time (min)	Resolution (EP)	Asymmetry (EP)	Plates (EP)
UV_VIS_6	UV_VIS_6	UV_VIS_6	UV_VIS_6	UV_VIS_6
nipagin	19.243	56.22	0.9	60444
nipasol	32.09	n.a.	0.93	782498

Tabelul 3

Rezultate calcule statistice

Parametrii analitici	Regression equation	Coef. Corecție
Amoxicilina trihidrat	$Y = 28.2494x + 0.1135$	0.99552
Polymixin E1	$Y = 89.977x - 0.7361$	0.9992
Polymixin E2	$Y = 86.6788x - 0.3997$	0.9998
Polymixin E3	$Y = 49.7700x - 0.0188$	0.9998
Polymixin E1-I	$Y = 88.8748x - 0.0550$	0.9992
Polymixin E1-7	$Y = 88.4039x - 0.0162$	0.9997
Nipagin	$Y = 657.6518x - 0.1883$	1.00
Nipasol	$Y = 657.6518x - 0.1883$	0.998

Tabelul 4

Rezultate precizie

Parametru	Timp de retenție medie	Concentrație	%RSD	Criteriu de admisibilitate
Amoxicilina trihidrat				
Repetabilitate	5.842	95.7494	0.4	%RSD<2,0
Reproductibilitate	5.848	96.1613	0.5	%RSD<2,0
Parametru	Timp de retenție medie	Arie medie	%RSD	Criteriu de admisibilitate
Colistin sulfat				
Repetabilitate	4,989	12.0301	0.3025	%RSD<2,0
Reproductibilitate	4,982	12.1296	1.4576	%RSD<2,0
Parametru	Timp de retenție medie	Arie medie	%RSD	Criteriu de admisibilitate
Nipasol				
Repetabilitate	4,989	0.2387	0.6482	%RSD<2,0
Reproductibilitate	4,982	0.2411	1.1160	%RSD<2,0
Parametru	Timp de retenție medie	Arie medie	%RSD	Criteriu de admisibilitate
Nipagin				
Repetabilitate	4,989	0.7217	0.6604	%RSD<2,0
Reproductibilitate	4,982	0.7220	0.4597	%RSD<2,0

Tabelul 5

Rezultate acuratețe

Nivel concentrație %	Concentrația amoxicilina trihidrat * mg/mL	% Recuperare amoxicilina trihidrat *	Media % recuperare
80	73.6656	92.08	93.86
100	95.016	95.02	
120	113.380	94.48	
Nivel concentrație %	Concentrația colistin sulfat* mg/mL	% Recuperare colistin sulfat**	Media % recuperare
80	9.533	95.33	96.78
100	11.86	94.94	
120	14.011	100.077	
Nivel concentrație %	Concentrația nipagin* mg/mL	% Recuperare colistin sulfat**	Media % recuperare
80	0.57403	95.66	98.92
100	0.7203	96.04	
120	0.84046	105.05	
Nivel concentrație %	Concentrația nipasol* mg/mL	% Recuperare colistin sulfat**	Media % recuperare
80	0.18723	93.59	94.38
100	0.23863	95.45	
120	0.2823	94.11	

* media a trei determinări

Concluzii

În acest studiu a fost validată o metodă HPLC-DAD pentru dozarea unei suspensii injectabile care conține amoxicilină trihidrat, colistin sulfat, nipagin și nipasol și care este indicată în infecțiile acute, primare sau secundare.

Cele patru substanțe au fost separate cu succes în 42 minute, utilizându-se o coloană Hypersil Gold de 150 x 4.6 mm.

Metoda HPLC propusă s-a dovedit a fi: selectivă, rapidă, precisă și specifică pentru determinarea simultană a celor două substanțe active conținute și a excipienților din suspensia injectabilă Amoxicolistin.

Procentele de recuperare obținute sugerează că excipienții nu au nicio interferență în determinări.

Valorile obținute pentru deviația standard relativă mai mici decât valoarea 2 indică un grad ridicat de precizie.

În concluzie, acest studiu demonstrează că, metoda analitică descrisă se poate utiliza pentru determinarea amoxiclinei trihidrat colistin sulfat, nipagin și nipasol din produsul Amoxicolistin – suspensie injectabilă.

Bibliografie

1. European Pharmacopoeia 8.0 (2014).
2. Nomenclatorul Produselor Romvac, p. 171.