

Razvoj hromatografskih metoda za analizu sulfametoksazola, trimetoprima, njihovih degradacionih proizvoda i konzervanasa u sirupu

Ivana Perović¹, Anđelija Malenović^{2*}, Ana Vemić², Nađa Kostić²,
Darko Ivanović²

¹ Galenika a.d., Batajnički drum bb, 11080 Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova,
Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

*Autor za prepisku: andja@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

U ovom radu prikazano je definisanje eksperimentalnih uslova i optimizacija metoda reverzno–fazne tečne hromatografije (RP–HPLC) za određivanje sulfametoksazola, trimetoprima i konzervanasa, odnosno degradacionih proizvoda sulfametoksazola i trimetoprima u sirupu. Određivanje sadržaja aktivnih komponenti i konzervanasa vršeno je na koloni Zorbax Eclipse XDB–C18, 150 mm × 4,6 mm, 5 μm veličine čestica, protok mobilne faze bio je 1,5 mL min⁻¹, dok je detekcija vršena na 235 nm za aktivne komponente i 254 nm za konzervanse. Mobilna faza A sastojala se od smeše 150 mL acetonitrila, 850 mL vode i 1 mL trietanolamina (pH 5,9 podešen razblaženom sirćetnom kiselinom), a kao mobilna faza B korišćen je acetonitril. Odnos mobilnih faza tokom analize definisan je programom gradijenta. Određivanje sadržaja degradacionih proizvoda vršeno je na koloni Zorbax Eclipse Plus–C18, 100 mm × 4,6 mm, 3,5 μm veličine čestica, uz protok mobilne faze od 0,5 mL min⁻¹ i detekciju na 210 nm za 3,4,5-trimetoksibenzojevu kiselinu i 254 nm za sulfanilnu kiselinu i sulfanilamid. Mobilna faza A bila je 50 mM kalijum-dihidrogenfosfat (pH 5,60 podešen sa 0,5 mol L⁻¹ kalijum-hidroksidom), a mobilna faza B bio je acetonitril. Odnos mobilnih faza tokom analize definisan je programom gradijenta. Validacijom postavljenih metoda potvrđeno je da su efikasne i pouzdane, i kao takve pogodne za rutinsku kontrolu.

Ključne reči: Sulfametoksazol, trimetoprim, konzervansi, degradacioni proizvodi, reverzno–fazna tečna hromatografija

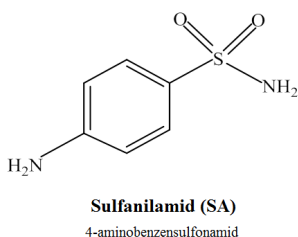
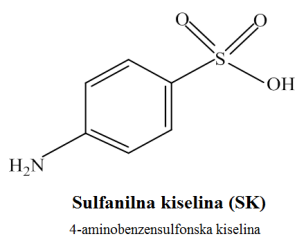
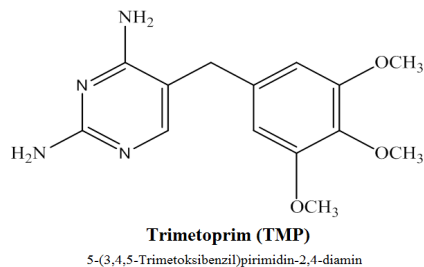
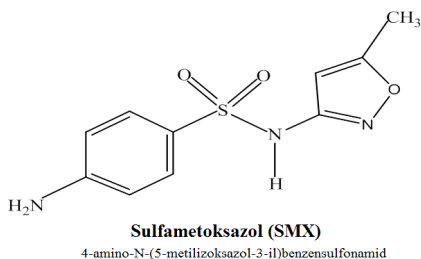
Uvod

Sirupi su vodeni preparati slatkog ukusa i viskozne konzistencije. Mogu da sadrže saharozu u koncentraciji od najmanje 45 % m/m. Sladak ukus se može postići i upotrebom drugih poliola ili zaslađivača. Sirupi obično sadrže korigense ukusa i mirisa. [1]. Za adekvatnu kontrolu kvaliteta ovih farmaceutskih doziranih oblika, pored određivanja sadržaja aktivnih supstanci i konzervanasa, potrebno je pratiti i sadržaj nečistoća. Nečistoće predstavljaju sve neželjene supstance koje mogu biti prisutne u farmaceutskoj supstanci ili farmaceutskom obliku. Njihovo prisustvo, čak i u malim količinama može uticati na efikasnost i bezbednost, jer mogu izazvati neželjene i/ili toksične efekte. Nečistoće mogu da potiču iz postupka sinteze farmaceutske supstance ili da nastanu kao degradacioni proizvodi tokom roka upotrebe farmaceutske supstance, odnosno farmaceutskog oblika. Iz tog razloga je poznavanje porekla, postupaka kontrole i analize nečistoća od presudnog značaja za proizvodnju farmaceutskih supstanci i farmaceutskih doziranih oblika odgovarajućeg kvaliteta.

U ovom radu prikazan je razvoj RP–HPLC metode za određivanje sulfametoksazola (SMX), trimetoprima (TMP), zatim konzervanasa metilparahidroksibenzoata (MP) i propilparahidroksibenzoata (PP), kao i RP–HPLC metode za određivanje nečistoća sulfanilne kiseline (SK), sulfanilamida (SA) i 3,4,5-trimetoksibenzojeve kiseline (TBK). Hemijske strukture analiziranih supstanci prikazane su na Slici 1.

U BP 2012 date su monografije *Co – trimoxazole Oral Suspension* i *Paediatric Co – trimoxazole Oral Suspension* u kojima se za određivanje sadržaja TMP i SMX primenjuje UV spektrofotometrijska metoda [2]. S druge strane u USP 35 u monografiji *Sulfamethoxazole and Trimethoprim Oral Suspension* se za određivanje sadržaja SMX i TMP primenjuje RP–HPLC metoda, a za određivanje degradacionih proizvoda primenjuje se TLC (eng. *Thin Layer Chromatography* – TLC) metoda [3]. Pregledom literature utvrđeno je da je za određivanje SMX i TMP u različitim farmaceutskim oblicima primenjivana RP–HPLC metoda [4–6], kao i za istovremeno određivanje SMX i TMP, MP i PP u suspenziji [7]. Za određivanje degradacionih proizvoda TMP u aktivnoj farmaceutskoj supstanci i farmaceutskim oblicima razvijene su RP–HPLC metode sa UV i MS (eng. *Mass Spectrometry* – MS) detekcijom [8-10].

Kako je pregledom literature utvrđeno da do sada nisu opisane metode za istovremeno određivanje ispitivanih komponenti u sirupu, cilj ovog rada bio je razvijanje RP–HPLC metoda pogodnih za određivanje SMX i TMP, MP i PP, kao i degradacionih proizvoda sulfametoksazola (SK i SA) i trimetoprima (TMK).



Slika 1. Hemijske strukture sulfametoksazola (SMX), trimetoprima (TMP), sulfanilne kiseline (SK) i sulfanilamida (SA)

Figure 1. Chemical structures of sulfametoxazole (SMX), trimethoprim (TMP), sulphanilic acid (SK) and sulphanilamide (SA)

Eksperimentalni deo

Hromatografski sistem. Analiza je vršena na hromatografskom sistemu *Agilent 1290 Infinity*, koji se sastoji od binarne pumpe, termostata za kolonu, autosamplera, sistema za uklanjanje rastvorenog vazduha u mobilnoj fazi i *diode array* detektora. Za prijem i obradu podataka korišćen je *Easy Chrom* softver.

Ostala oprema. Sistem za filtriranje (Core Palmer, USA), analitička vaga (Sartorius ME235P – OCE, Nemačka), pH metar (Metrohm 827 pH lab, Švajcarska), ultrazvučno kupatilo (MRC Ultrasonic cleaner, Izrael) i centrifuga (Rotofix 32, Hettich, Nemačka).

Reagensi. Za hromatografsku analizu korišćen je acetonitril (HPLC gradient grade, J. T. Baker, Holandija), trietanolamin (> 99 %, Sigma, USA), glacijalna sirćetna kiselina (p.a., J. T. Baker, Holandija), kalijum-hidroksid (Merck, Nemačka), kalijum-dihidrogenfosfat (Merck, Nemačka) i voda HPLC kvaliteta dobijena sistemom Purelab Prima (Elga, Engleska).

Standardi. Rastvori standarda za hromatografsku analizu pripremani su od radnih standarda SMX, MP i PP (Galenika a.d., Srbija), TMP radnog standarda (Roche, Švajcarska), kao i referentnih standarda SK, SA i TBK (Roche, Švajcarska).

Farmaceutski dozirani oblik Bactrim® (200 mg sulfametoksazola + 40 mg trimetoprima)/5 mL, sirup, Galenika a.d.

Hromatografski uslovi. *Određivanje sadržaja aktivnih supstanci i konzervanasa* izvršeno je na koloni Zorbax Eclipse XDB – C18, 150 mm × 4,6 mm, 5 μm veličine čestica. Mobilna faza A predstavljala je smešu 150 mL acetonitrila, 850 mL vode i 1 mL trietanolamina (pH je podešen na 5,9 razblaženom sirćetnom kiselinom), a mobilna faza B bila je acetonitril. Primenjen je program gradijenta B %/t: 5 %/0; 40 %/7; 40 %/8,5; 5 %/10. Protok mobilne faze bio je 1,5 mL min⁻¹, temperatura kolone 40 °C, volumen injektovanja 2 μL, a talasna dužina detekcije 235 nm za SMX i TMP, odnosno 254 nm za MP i PP. *Određivanje degradacionih proizvoda* izvršeno je na koloni Zorbax Eclipse Plus C18, 100 mm × 4,6 mm, 3,5 μm veličine čestica. Mobilna faza A bila je 50 mM kalijum-dihidrogenfosfat (pH podešen na 5,60 sa 0,5 M kalijum-hidroksidom), a mobilna faza B acetonitril. Primenjen je program gradijenta B %/t: 10 %/0; 20 %/5; 50 %/6; 50 %/10; 10 %/10,01; 10 %/15. Protok mobilne faze bio je 0,5 mL min⁻¹, volumen injektovanja 2 μL, temperatura kolone 25 °C, a talasna dužina detekcije 254 nm za SK i SA, odnosno 210 nm za TBK.

Priprema rastvora za određivanje sadržaja aktivnih supstanci i konzervanasa

Rastvarač. Smeša acetonitrila i razblažene sirćetne kiseline (1:100 V/V) (1:3, V/V).

Rastvori standarda. Rastvaranjem odgovarajuće količine standarda u rastvaraču pripremljeni su osnovni rastvori standarda tako da sadrže 0,3 mg mL⁻¹ MP i 0,024 mg mL⁻¹ PP. Odmerene su odgovarajuće količine standarda SMX i TMP, a zatim su dodate odgovarajuće zapremine osnovnih rastvora MP i PP, kako bi se dobio rastvor koji sadrži 0,20 mg mL⁻¹ SMX, 0,040 mg mL⁻¹ TMP, 2,40 μg mL⁻¹ MP i 0,480 μg mL⁻¹ PP.

Rastvori za procenu selektivnosti. Za procenu selektivnosti pripremljen je rastvor *placeba* u koncentraciji koja odgovara sadržaju u sirupu i tretiran je na isti način kao uzorak kod procene preciznosti. Standard koji sadrži 0,20 mg mL⁻¹ SMX, 0,040 mg mL⁻¹ TMP, 2,40 μg mL⁻¹ MP i 0,480 μg mL⁻¹ PP korišćen je za procenu selektivnosti.

Rastvori za procenu linearnosti. Pripremljeni su osnovni rastvori SMX (1,0 mg mL⁻¹), TMP (0,2 mg mL⁻¹), MP (12 μg mL⁻¹) i PP (2,4 μg mL⁻¹). Za konstruisanje kalibracione krive od osnovnih rastvora standarda pripremljeno je pet rastvora koji sadrže od 0,16 mg mL⁻¹ do 0,24 mg mL⁻¹ SMX, od 0,032 mg mL⁻¹ do 0,048 mg mL⁻¹ TMP, od 1,92 μg mL⁻¹ do 2,88 μg mL⁻¹ MP i od 0,384 μg mL⁻¹ do 0,576 μg mL⁻¹ PP.

Rastvori za procenu tačnosti. Pripremljena je smeša *placeba*, SMX, TMP, MP i PP i tretirana na isti način kao uzorak kod procene preciznosti. Po tri rastvora su pripremljena za definisane koncentracije:

- 0,16 mg mL⁻¹ SMX, 0,032 mg mL⁻¹ TMP, 1,92 µg mL⁻¹ MP i 0,384 µg mL⁻¹ PP (80 % deklarisanog sadržaja);
- 0,20 mg mL⁻¹ SMX, 0,040 mg mL⁻¹ TMP, 2,40 µg mL⁻¹ MP i 0,480 µg mL⁻¹ PP (100% deklarisanog sadržaja);
- 0,24 mg mL⁻¹ SMX, 0,048 mg mL⁻¹ TMP, 2,88 µg mL⁻¹ MP i 0,576 µg mL⁻¹ PP (120 % deklarisanog sadržaja).

Rastvori za procenu preciznosti. Rastvor uzorka sirupa razblažen je rastvaračem, tretiran 10 minuta magnetnom mešalicom, a zatim 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu i na kraju centrifugiran 10 minuta na 4000 obrtaja min⁻¹. Centrifugiran rastvor razblažen je tako da se dobiju rastvori sledećih koncentracija: 0,19 mg mL⁻¹ SMX, 0,038 mg mL⁻¹ TMP, 2,40 µg mL⁻¹ MP i 0,480 µg mL⁻¹ PP.

Rastvori za procenu stabilnosti. Praćena je stabilnost rastvora standarda i uzorka nakon 2 h, 4 h, 8 h, 12 h i 16 h.

Procena robusnosti metode. Variran je po jedan parametar definisanih hromatografskih uslova: kolona, protok mobilne faze, temperatura kolone, pH mobilne faze A i sastav mobilne faze A.

Priprema rastvora za određivanje sadržaja degradacionih proizvoda

Rastvarač. Smeša mobilne faze A i mobilne faze B (90:10, V/V).

Rastvori standarda. Rastvaranjem odgovarajuće količine standarda u rastvaraču pripremljeni su osnovni rastvori standarda tako da sadrže 0,05 mg mL⁻¹ SK, 0,05 mg mL⁻¹ SA i 0,005 mg mL⁻¹ TBK. Razblaženjem osnovnih rastvora pripremljen je rastvor koncentracije 0,0012 mg mL⁻¹ SK, 0,002 mg mL⁻¹ SA i 0,0004 mg mL⁻¹ TBK.

Rastvori za procenu selektivnosti. Za procenu selektivnosti pripremljen je rastvor *placeba* u koncentraciji koja odgovara sadržaju u sirupu i tretiran je na isti način kao uzorak kod procene preciznosti. Standard koji sadrži 0,0012 mg mL⁻¹ SK, 0,002 mg mL⁻¹ SA i 0,0004 mg mL⁻¹ TBK korišćen je za procenu selektivnosti.

Rastvori za određivanje limita detekcije i limita kvantifikacije. Rastvarač je injektovan deset puta i izračunata je standardna devijacija odgovora na retencionim vremenima ispitivanih nečistoća ($Sd_{\text{rastvarača}}$). Napravljena je serija razblaženja rastvora ispitivanih nečistoća i određena koncentracija analita kojoj odgovara $10 \times Sd_{\text{rastvarača}}$ (LOQ), odnosno $3 \times Sd_{\text{rastvarača}}$ (LOD). Rastvor LOQ injektovan je šest puta kako bi se potvrdila ponovljivost.

Rastvori za procenu linearnosti. Pripremljeni su osnovni rastvori standarda SK (50 µg mL⁻¹), SA (50 µg mL⁻¹) i TBK (5 µg mL⁻¹). Za konstruisanje kalibracione krive od osnovnih rastvora standarda pripremljeno je pet rastvora koji sadrže od 0,20 µg mL⁻¹ do 1,44 µg mL⁻¹ (0,05 % – 0,36 %) SK, od 0,2 µg mL⁻¹ do 2,4 µg mL⁻¹ (0,05 % – 0,60 %) SA i od 0,08 µg mL⁻¹ do 0,48 µg mL⁻¹ (0,10 % – 0,60 %) TBK. Opseg za procenu

linearnosti definisan je od LOQ do 120 % u odnosu na specifikacijom datu maksimalno dozvoljenu koncentraciju.

Rastvori za procenu tačnosti. Pripremljena je smeša *placeba*, SK, SA, TBK i tretirana na isti način kao uzorak kod procene preciznosti. Po tri rastvora pripremljena su za definisane koncentracije:

- 0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SK, 0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SA i 0,08 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TBK (LOQ – limit kvantifikacije);
- 0,60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SK, 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SA i 0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TBK (50 % maksimalno dozvoljene koncentracije);
- 1,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SK, 2,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SA i 0,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TBK (100 % maksimalno dozvoljene koncentracije);
- 1,44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SK, 2,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ SA i 0,48 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TBK (120 % maksimalno dozvoljene koncentracije)

Rastvori za procenu preciznosti. Rastvor uzorka sirupa razblažen je rastvaračem, tretiran 10 minuta magnetnom mešalicom, zatim 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu i na kraju centrifugiran 10 minuta na 4000 obrtaja min^{-1} . Centrifugiran rastvor razblažen je tako da se dobiju sledeće koncentracije: 0,4 mg mL^{-1} SMX i 0,08 mg mL^{-1} TMP. S obzirom da rastvor uzorka sadrži samo TBK, radi ispitivanja preciznosti rastvor uzorka je opterećen sa 0,3 % SK, 0,5 % SA i 0,5 % TBK.

Rastvori za procenu stabilnosti. Praćena je stabilnost rastvora standarda i uzorka nakon 4 h, 8 h, 12 h i 16 h.

Procena robusnosti metode. Variran je po jedan parametar definisanih hromatografskih uslova i to kolona, protok mobilne faze i pH mobilne faze A.

Rezultati i diskusija

Određivanje sadržaja aktivnih supstanci i konzervanasa

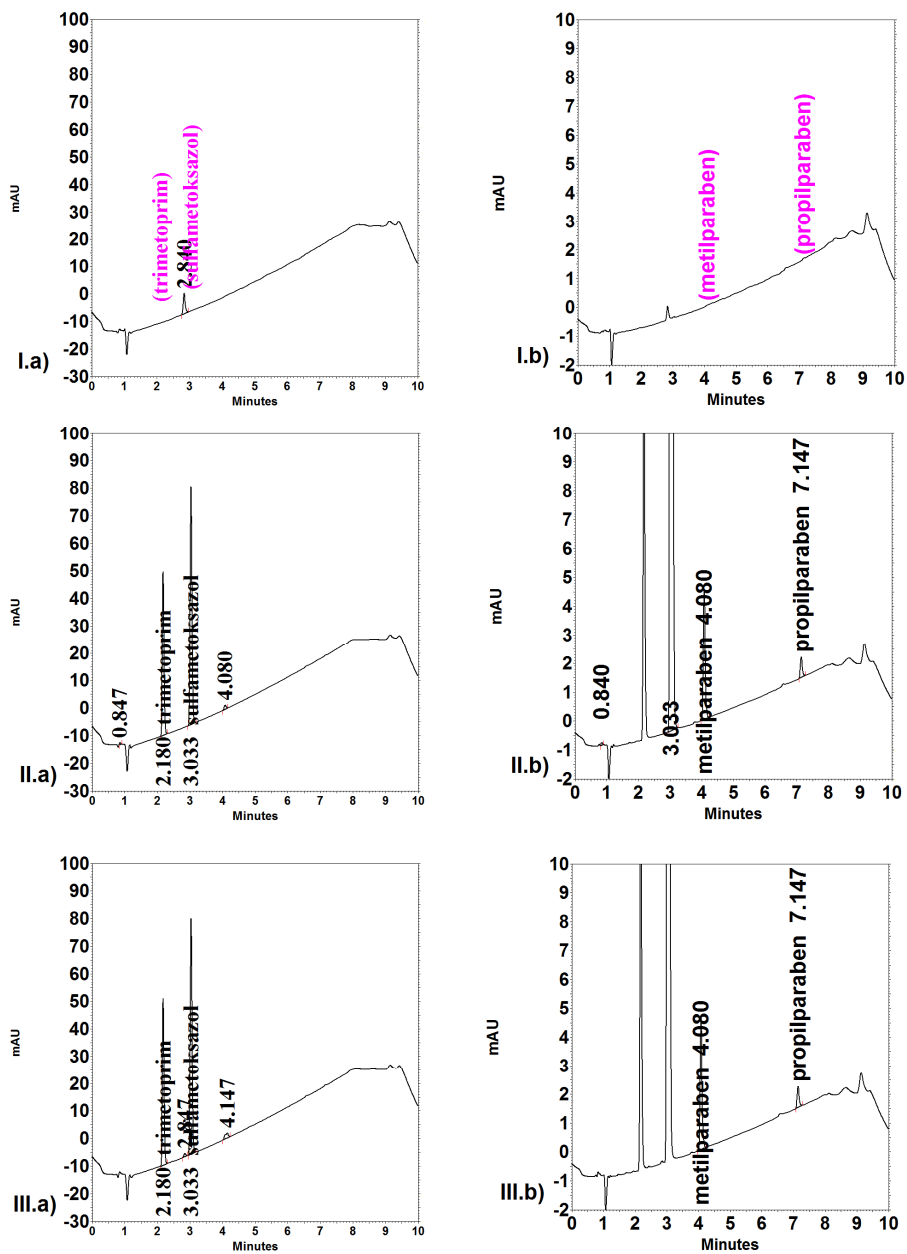
Analizirana jedinjenja (SMX, TMP, MP i PP) značajno se razlikuju po polarnosti tako da je odlučeno da se postavi metoda koja podrazumeva primenu odgovarajućeg gradijenta, jer izokratsko eluiranje ne bi bilo optimalno. Pored toga, analizom hemijske strukture ispitivanih jedinjenja utvrđeno je da prisustvo slobodnih amino grupa SMX i TMP, zbog sekundarnih interakcija sa reverzno-faznom stacionarnom fazom, može dovesti do pojave razvlačenja silaznog dela pika ovih jedinjenja. Kako bi se to eliminisalo, u mobilnu fazu je bilo potrebno dodati trietanolamina kao modifikator koji će sprečiti ove neželjene interakcije. Mobilna faza A bila je smeša 150 mL acetonitrila, 850 mL vode i 1 mL trietanolamina, dok je pH podešen na 5,9 razblaženom glacijalnom sirćetnom kiselinom. Kao mobilna faza B korišćen je acetonitril. Tokom preliminarnih ispitivanja pokazalo se da kritični par predstavljaju pik iz *placeba* i pik SMX.

Odgovarajuće razdvajanje ova dva pika postignuto je sa početnim odnosom mobilnih faza A i B 95 : 5 V/V. Postepenim povećanjem sadržaja acetonitrila (mobilna faza B) od 5 % do 40 % tokom 7 minuta postiže se odgovarajuće razdvajanje svih ispitivanih supstanci. Povećanje sadržaja acetonitrila omogućilo je eluiranje MP i PP, kao lipofilnijih komponenti, do 8 minuta čime je postignuto izuzetno kratko vreme trajanja analize.

Ispitivan je i uticaj stacionarne faze na razdvajanje SMX, TMP, MP i PP. Ispitivanje je sprovedeno na kolonama: Zorbax Eclipse XDB C18, 150 × 4,6 mm, 5 μm veličine čestica i Zorbax Eclipse Plus C18, 100 mm × 4,6 mm, 3,5 μm veličine čestica. Optimalno hromatografsko razdvajanje postignuto je na koloni Zorbax Eclipse XDB C18, 150 × 4,6 mm, 5 μm veličine čestica, koja je posebno pogodna za razdvajanje baznih jedinjenja. Stacionarna faza XDB (eng. *Extra Densely Bonded*) ima dvostruko blokirane terminalne silanolne grupe čime je postignuto da je veliki je broj slobodnih silanolnih grupa zaštićen, pa su pikovi ispitivanih jedinjenja simetričniji. Na Slici 2. prikazani su hromatogrami rastvora *placeba*, standarda i uzorka na 235 nm i 254 nm.

Na hromatogramu rastvora *placeba* nema pikova čija retencionna vremena odgovaraju retencionim vremenima SMX, TMP, MP i PP, čime je potvrđena selektivnost metode (Slika 2).

Postavljena metoda je zatim validirana kako bi se potvrdilo da je pogodna za određivanje sadržaja SMX, TMP, MP i PP u Bactrim[®] sirupu. Ispitivani su linearnost, tačnost i preciznost, a rezultati su prikazani u Tabeli I i Tabeli II. Dobijeni rezultati u skladu su sa definisanim kriterijumima za prihvatanje rezultata [11]. Pored toga, ispitivana je i stabilnost rastvora i utvrđeno je da su na sobnoj temperaturi rastvori standarda stabilni 16 h, a rastvor uzorka 2 h. Ispitivanjem robusnosti pokazano je da promena serijskog broja kolone, promena brzine protoka, smanjenje pH mobilne faze A i povećanje sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi A ne utiče na tačnost rezultata. Međutim, povećanje temperature kolone dovodi do koeluiranja kritičnog para pikova, pika *placeba* i pika SMX. S druge strane, smanjenje temperature kolone dovodi do koeluiranja pika PP i pika *placeba*. Povećanjem pH vrednosti mobilne faze A dolazi do koeluiranja pika *placeba* i SMX, a smanjenje sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi A negativno utiče na oblik pika PP, a time i na preciznost određivanja. Na osnovu toga može se zaključiti da temperatura kolone mora strogo da se kontroliše, da pH vrednost mobilne faze A ne sme biti veća od 5,9, a sadržaj acetonitrila u mobilnoj fazi A ne sme biti manji od 150 mL. Kao parametri za proveru pogodnosti sistema (eng. *System Suitability Tests – SST*) definisani su faktor rezolucije pika *placeba* i SMX (ne sme biti manji od 1,2), faktor rezolucije pika PP i pika *placeba* (ne sme biti manji od 2) i RSD (eng. *Relative Standard Deviation – RSD*) ponovljenih injektovanja standardnog rastvora PP (ne sme biti veća od 2 %).



Slika 2. Hromatogrami rastvora *placeba* (Ia, Ib): pik iz *placeba* (2,840 min); rastvora standarda (IIa, IIb): TMP (2,180 min), SMX (3,033 min), MP (4,080 min), PP (7,147 min); rastvora uzorka (IIIa, IIIb); a – na 235 nm, b – na 254 nm

Figure 2. Chromatograms of placebo solution (Ia, Ib): peak from placebo (2.840 min); standard solution (IIa, IIb): TMP (2.180 min), SMX (3.033 min), MP (4.080 min), PP (7.147 min); sample solution (IIIa, IIIb), a – at 235 nm, b – at 254 nm

Tabela I Rezultati za procenu linearnosti, tačnosti i preciznosti metode za određivanje sadržaja SMX i TMP

Table I Evaluation of linearity, accuracy and precision for the determination of SMX and TMP

	SMX	TMP
<i>Linearnost</i>		
Koncentracija (mg mL ⁻¹)	0,16–0,24	0,033–0,050
a	$2,1529 \times 10^8$	$7,1823 \times 10^8$
b	454872	134657
r	0,9979	0,9972
<i>Tačnost</i>		
Koncentracija 1 (mg mL ⁻¹)	0,16	0,032
Recovery 1 (%)*	100,96	100,21
Koncentracija 2 (mg mL ⁻¹)	0,20	0,040
Recovery 2 (%)	101,14	99,84
Koncentracija 3 (mg mL ⁻¹)	0,24	0,050
Recovery 3 (%)	101,15	100,08
<i>Preciznost</i>		
Ponovljivost** RSD (%)	0,7	0,9
Srednja preciznost*** RSD (%)	1,4	0,5

a – nagib prave, b – odsečak na ordinati, r – koeficijent korelacije (> 0,9950)

* 98,00 % – 102,00 %

** RSD < 2,0 %,

*** RSD < 3,0 %

Tabela II Rezultati za procenu linearnosti, tačnosti i preciznost metode za određivanje sadržaja MP i PP

Table II Evaluation of linearity, accuracy and precision for the determination of MP and PP

	MP	PP
<i>Linearnost</i>		
Koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,01–3,02	0,40–0,60
a	$1,0185 \times 10^6$	$9,5929 \times 10^5$
b	-57960	-54142
r	0,9980	0,9972
<i>Tačnost</i>		
Koncentracija 1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,96	0,39
Recovery 1 (%)*	98,77	100,45
Koncentracija 2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,45	0,49
Recovery 2 (%)	101,47	101,41
Koncentracija 3 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2,94	0,59
Recovery 3 (%)	101,45	100,47
<i>Preciznost</i>		
Ponovljivost** RSD (%)	0,9	1,6
Srednja preciznost*** RSD (%)	2,5	0,0

a – nagib prave, b – odsečak na ordinati, r – koeficijent korelacije ($> 0,995$)

* 98,00 % – 102,00 %

** RSD $< 2,0$ %,

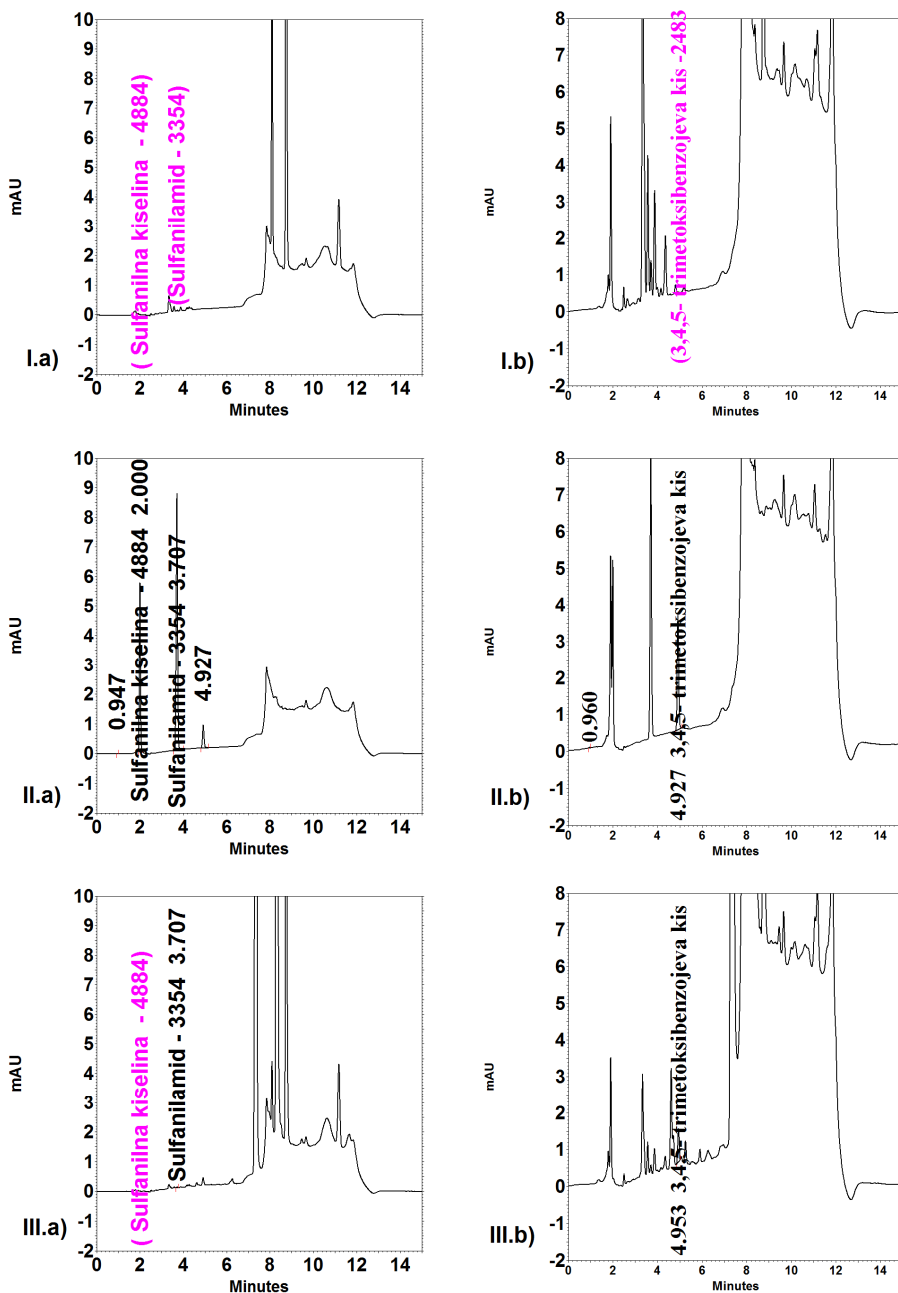
*** RSD $< 3,0$ %

Određivanje degradacionih proizvoda

Preliminarna ispitivanja za postavljanje metode za određivanje sadržaja degradacionih proizvoda izvršena su na Zorbax Eclipse XDB – C18, 150 mm × 4,6 mm, 5 µm veličine čestica i Zorbax Eclipse Plus C18, 100 mm × 4,6 mm, 3,5 µm veličine čestica kolonama. Zadovoljavajuće razdvajanje, odgovarajuća rezolucija, odgovarajuće vreme trajanja analize, kao i simetrija pika baznih analita (SK i SA) dobijeni su na koloni Zorbax Eclipse Plus C18, 100 mm × 4,6 mm, 3,5 µm veličine čestica. S obzirom da je pH mobilne faze A 5,60, prvo se eluira SK kao polarnija, pa zatim SA i TBK. Početni sastav mobilne faze 90:10 V/V i postepeni porast sadržaja acetonitrila na 20 % u toku prvih 5 minuta neophodan je da bi se postigla odgovarajuća rezolucija između nečistoća. Nakon 5 minuta udeo acetonitrila povećava se na 50 % kako bi se eluirale aktivne komponente i konzervansi. Na Slici 3. prikazani su hromatogrami rastvora *placeba*, standarda i uzorka na 254 nm i 210 nm.

Na hromatogramu rastvora *placeba* nema pikova čija retenciona vremena odgovaraju retencionim vremenima SK, SA i TBK, čime je potvrđena selektivnost metode (Slika 3).

Postavljena metoda je zatim validirana kako bi se potvrdilo da je pogodna za određivanje sadržaja SK, SA i TBK u Bactrim[®] sirupu. Ispitivani su linearnost, tačnost i preciznost, a određeni su i limit detekcije i limit kvantifikacije (Tabela III). Limit detekcije i limit kvantifikacije određeni su eksperimentalnim putem. Dobijeni rezultati u skladu su sa definisanim kriterijumima za prihvatanje rezultata [11]. Pored toga, ispitivana je i stabilnost rastvora i utvrđeno je da su na sobnoj temperaturi rastvori standarda i uzorka stabilni 16 h, samo ukoliko se čuvaju zaštićeni od svetlosti. Ispitivanjem robusnosti metode pokazano je da promena kolone različitih serijskih brojeva, smanjenje pH mobilne faze i brzina protoka mobilne faze nemaju uticaja na vrednost sadržaja degradacionih proizvoda. S druge strane, povećanje pH vrednosti mobilne faze ima značajan uticaj, jer dovodi do koeluiranja pika *placeba* sa pikom TMB. Na osnovu toga može se zaključiti da pH mobilne faze A ne sme biti veći od 5,6, a SST parametri definisali su faktor rezolucije pika *placeba* i TMB (ne sme biti manji od 1,2), kao i RSD ponovljenih injektovanja standardnog rastvora nečistoća (ne sme biti veća od 2 %).



Slika 3. Hromatogrami rastvora placeba (Ia, Ib); rastvora standarda nečistoća (IIa, IIb): SK (2,000 min), SA (3,707 min), TBK (4,927 min); rastvora uzorka (IIIa, IIIb); a – na 254 nm, b – 210 nm

Figure 3. Chromatograms of placebo solution (Ia, Ib); standard solution of impurities (IIa, IIb): SK (2.000 min), SA (3.707 min), TBK (4.927 min); sample solution (IIIa, IIIb); a – at 254 nm, b – at 210 nm

Tabela III Rezultati za procenu linearnosti, tačnosti i preciznost, kao i za limit detekcije i limit kvantifikacije metode za određivanje sadržaja SK, SA i TBK

Table III Evaluation of linearity, accuracy and precision, as well as limit of detection and limit of quantification for the determination of SK, SA and TBK

	SK	SA	TBK
<i>Limit detekcije</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,07	0,07	0,03
<i>Limit kvantifikacije</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,20	0,20	0,08
<i>Linearnost</i>			
Koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,20–1,52	0,20–2,40	0,08–0,50
a	$4,7470 \times 10^{-7}$	$4,0141 \times 10^{-7}$	$2,2276 \times 10^{-7}$
b	0,0252	0,0203	-0,0078
r	0,9979	0,9995	0,9986
<i>Tačnost</i>			
Koncentracija 1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,20	0,20	0,08
<i>Recovery</i> 1 (%)*	97,16	101,05	89,27
Koncentracija 2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,61	1,00	0,20
<i>Recovery</i> 2 (%)	104,19	96,74	91,82
Koncentracija 3 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,22	2,00	0,41
<i>Recovery</i> 3 (%)	107,81	95,38	96,00
Koncentracija 4 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,52	2,40	0,50
<i>Recovery</i> 4 (%)	97,21	90,33	89,61
<i>Preciznost</i>			
RSD (%)**	0,7	1,4	1,6

a – nagib prave, b – odsečak na ordinati, r – koeficijent korelacije ($> 0,990$)

* 70,00 % – 130,00 %

**RSD < 15,0 %

Zaključak

Za adekvatnu farmaceutsku analizu sulfametoksazola, trimetoprima, metilparahidroksibenzoata, propilparahidroksibenzoata, sulfanilne kiseline, sulfanilamida i 3,4,5-trimetoksibenzojeve kiseline u Bactrim[®] sirupu postavljene su dve RP–HPLC metode sa gradijentnim eluiranjem. Zbog veoma velikih razlika u polarnosti ispitivanih jedinjenja potrebno je postaviti dve RP–HPLC metode za određivanje aktivnih supstanci, njihovih degradacionih proizvoda i konzervanasa. Jednom RP–HPLC metodom može se odrediti sadržaj aktivnih supstanci i konzervanasa, a drugom sadržaj degradacionih proizvoda. Predložene metode su validirane i potvrđeno je da su pogodne za rutinsku kontrolu Bactrim[®] sirupa. Definisani su parametri za proveru pogodnosti sistema i utvrđeni kritični parametri koji bi mogli dovesti u pitanje pouzdanost rezultata.

Zahvalnica

Ovaj rad realizovan je u okviru naučnog projekta 172052 koji finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Literatura

1. European Pharmacopoeia 8th edition, Council of Europe, Strasbourg 2014.
2. British Pharmacopoeia, The Pharmaceutical Press, London 2012.
3. The United States Pharmacopoeia 35, United States Pharmacopoeia Convention, Rockville 2012.
4. Akay C, Özkan SA. Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 30:1207–13.
5. Giegold S, Teutenberg T, Tuerk J, Kiffmeyer T, Wenclawiak B. Determination of sulfonamides and trimethoprim using high temperature HPLC with simultaneous temperature and solvent gradient. *J Sep Sci.* 2008; 31:3497–502.
6. Kulikov AU, Verushkin AG, Loginova LP. Comparison of micellar and reversed-phase liquid chromatography for determination of sulfamethoxazole and trimethoprim. *Chromatogr.* 2005; 61:455–63.
7. Epshtein NA. Simultaneous HPLC determination of trimethoprim, sulfamethoxazole and methyl- and propylparaben in suspensions of the co-trimoxazole type. *Pharm Chem J.* 2002; 36:675–9.
8. Barbarin N, Henion JD, Wu Y. Comparison between liquid chromatography–UV detection and liquid chromatography–mass spectrometry for the characterization of impurities and /or degradants present in trimethoprim tablets. *J Chromatogr A.* 2002; 970:141–54.
9. Hess S, Akermann M, Ropte D, Eger K. Rapid and sensitive LC separation of new impurities in trimethoprim. *J Pharm Biomed Anal.* 2001; 25:531–8.
10. Rao RN, Nagaraju V: An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *J Pharm Biomed Anal.* 2003; 83:335–77.
11. Crowther JB: Validation of pharmaceutical test methods, in: S. Ahuja, S. Scypinski (Eds.), *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, New York, 2001;415–43.

Development of chromatographic methods for analysis of sulfamethoxazole, trimethoprim, their degradation products and preservatives in syrup

Ivana Perović¹, Anđelija Malenović^{2*}, Ana Vemić²,
Nađa Kostić², Darko Ivanović²

¹Galenika a.d., Batajnički drum bb, 11080 Belgrade, Serbia

²University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

*Corresponding author: andja@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

In this paper the experimental conditions for optimal reversed-phase liquid chromatographic (RP-HPLC) determination of sulfamethoxazole, trimethoprim and preservatives, as well as degradation products of sulfamethoxazole and trimethoprim in syrup were defined. The determination of active compounds and preservatives was carried out on Zorbax Eclipse XDB-C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 μm particle size column, mobile phase flow rate was 1.5 mL min⁻¹, and detection at 235 nm for the active compounds and 254 nm for preservatives. Mobile phase A consisted of 150 mL of acetonitrile, 850 mL of water and 1 mL of triethanolamine (pH 5.90 adjusted with diluted acetic acid), while mobile phase B was acetonitrile. The mobile phase ratio was defined by the gradient program. For the determination of degradation products Zorbax Eclipse Plus C18, 100 mm x 4.6 mm, 3.5 μm particle size column was used, the mobile phase flow rate was 0.5 mL min⁻¹ and detection at 210 nm for 3,4,5-trimethoxybenzoic acid and 254 nm for sulfanilic acid and sulfanilamide. Mobile phase A was 50 mM potassium dihydrogenphosphate (pH 5.60 adjusted with a 0.5 mol L⁻¹ potassium hydroxide), while mobile phase B was acetonitrile. The mobile phase ratio was defined by the gradient program. Through the validation of the developed methods their efficiency and reliability is confirmed and consequently the adequacy for the routine control.

Key words: sulfamethoxazole, trimethoprim, preservatives, degradation products, reversed-phase liquid chromatography
