

PRACE ORYGINALNE

Anna Chyła, Monika Guzera, Aleksander P. Mazurek

Oznaczanie zawartości wybranych tryptanów w substancji i postaciach farmaceutycznych metodą chromatografii gazowej i densytometryczną w obecności ich zanieczyszczeń

Determinations of the content of selected triptanes in drug substance and pharmaceutical dosage forms using gas chromatography and densitometry in the presence of their degradation products

Z Zakładu Farmacji Podstawowej i Stosowanej Narodowego Instytutu Leków w Warszawie

STRESZCZENIE

Opracowano dwie metody oznaczania chlorowodoru naratriptanu i sumatriptanu. Produkty rozkładu niezbędne do walidacji układu uzyskano poprzez poddanie substancji działaniu kwasu (0,1M kwas solny), zasady (0,1M wodorotlenek sodu), utleniacza (30% nadtlenek wodoru), temperatury (105°C), światła. Pierwszą metodą była metoda chromatografii gazowej. Najlepsze rezultaty uzyskano stosując jako fazę stacjonarną kolumnę kapilarną HP-1 (10 mm x 0,53 mm i.d. grubość filmu 2,65 µm) oraz hel jako fazę ruchomą. Dobrano temperaturę początkową, szybkość przyrostu temperatury, ciśnienie gazu nośnego i wzorce wewnętrzne. Metoda jest liniowa w zakresie 50–350 µg/ml (chlorowodorek naratriptanu) i 10–200 µg/ml (sumatriptan).

Drugą zastosowaną metodą było densytometryczne oznaczanie wybranych związków w tabletkach po uprzednim rozdzieleniu przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej. Zastosowano octan etylu – metanol – wodorotlenek amonu (19:2:1 v/v/v) jako fazę ruchomą. Chromatogramy analizowano przy długości fali 225 nm dla chlorowodoru naratriptanu i 226 nm dla sumatriptanu. Ustalono zakres liniowości dla chlorowodoru naratriptanu i sumatriptanu, który wynosi odpowiednio 0,2–3 µg i 0,2–4 µg na plamę.

Opracowane metody z powodzeniem zastosowano do oznaczania chlorowodoru naratriptanu i sumatriptanu w substancji i postaciach farmaceutycznych (Naramig tabletki,

ABSTRACT

Two methods were developed for the determination of naratriptan hydrochloride and sumatriptan. Their degradation products indispensable for validation of the system were obtained by degrading the substances using acid (0.1 M hydrochloric acid), base (0.1 M sodium hydroxide), oxidising agent (30% hydrogen peroxide), heat (105°C), and VIS irradiation as the degradation agents. The first method consisted in the use of gas chromatography with flame ionisation detector. The best results were acquired using as a stationary phase a capillary column HP-1 (10 mm x 0.53 mm i.d. with a film thickness of 2.65 µm) and helium as a mobile phase. The initial temperature, speed of temperature increase, pressure of the carrier gas and internal references were selected. Calibration graphs were linear in the concentration range 50–350 µg/ml (naratriptan hydrochloride) and 10–200 µg/ml (sumatriptan).

The second method consisted in the densitometric evaluation of the selected compounds (naratriptan hydrochloride and sumatriptan) in the tablets after former separation using a thin – layer chromatography. Ethyl acetate – methanol – ammonium hydroxide solution (19:2:1 v/v/v) was used as a mobile phase and optical densities were measured at 225 nm (naratriptan hydrochloride) and 226 nm (sumatriptan). Calibration graphs of naratriptan hydrochloride and sumatriptan were linear in the concentration ranges

Imigran czopki i Sumamigren tabletki) oraz wykazano ich dobrą powtarzalność i dokładność. Uzyskane wyniki poddano analizie i porównano z wynikami otrzymanymi metodami referencyjnymi, tj. farmakopalnymi metodami HPLC.

Słowa kluczowe: chlorowodorek naratriptanu, sumatriptan, TLC

1. Wstęp

Sumatriptan, [3-[2-(dimetyloamino)etylo-1H-indol-5-ilo]-N-metylometanosulfono- amid i naratriptan, N-metylo-3-(1-metylo-4-piperidynylo)-1H-indolo-5-etanosulfono- amid są agonistami receptora serotoninowego (5HT₁). Leki te są skuteczne w przerywaniu napadu migreny, różnią się pomiędzy sobą efektywnością działania oraz działaniami niepożądanymi [1].

Sumatriptan oznaczano w ludzkich płynach ustrojowych (osocze, plazma, mocz, ślina) oraz w preparatach farmaceutycznych metodą TLC [2, 3, 4], spektrofotometryczną [2, 3, 4], HPLC z detekcją UV [5, 6, 7, 8], HPLC z detekcją fluoroscencyjną [9], elektrochemiczną [10,11], elektroforezy kapilarnej [12], LC/MS [13, 14, 15, 16, 17], a także GC/MS [3]. Zamieszczono monografię substancji bursztynian sumatriptanu w farmakopei europejskiej (Ph. Eur.) [18] oraz monografie substancji (bursztynian sumatriptanu, sumatriptan) i postaci farmaceutycznych w farmakopei brytyjskiej (BP) [19] i amerykańskiej (USP) [20]. We wszystkich monografiach farmakopoealnych do oznaczania zawartości i badań czystości zastosowano metodę HPLC z detekcją UV. Naratriptan oznaczano w osoczu ludzkim [13] i w krwi królików [17] metodą HPLC/MS oraz w substancji metodą elektroforezy micelarnej [21]. W farmakopei amerykańskiej [20] zamieszczono monografię dla substancji i tabletek, w której zawartość i czystość badane są metodą HPLC/UV, a tożsamość dodatkowo metodą TLC.

Celem pracy było opracowanie warunków identyfikacji oraz oznaczania tryptanów w substancji i postaciach farmaceutycznych dwiema zwalidowanymi metodami chromatografii gazowej i densytometryczną w obecności ich produktów rozkładu. Uzyskane wyniki zostały statystycznie porównane z wynikami uzyskanymi metodami referencyjnymi. Dla sumatriptanu jako metodę referencyjną wybrano HPLC opisaną w BP [19].

2. Część eksperymentalna

2.1. Aparatura

GC: Chromatograf gazowy GC-14 B z detektorem FID (Shimadzu); kolumna kapilarna GC HP-1, 10 m x 0,53 mm ID, grubość filmu 2,65µm (Hewlett Packard);

TLC: aplikator TLC Sampler III (Camag); Densytometr CS-9000 (Shimadzu); płytki HPTLC pokryte żelazem krzemionkowym GF₂₅₄, 10 x 20 cm, grubość warstwy żelu 0,25 mm (Merck);

respectively 0.2 – 3 µg and 0.2 - 4µg per spot.

The developed methods were successfully applied for determining naratriptan hydrochloride and sumatriptan in drug substances and pharmaceutical dosage forms (Naramig tablets, Imigran suppositories, Sumamigren tablets) and good repeatability and accuracy were proved. The obtained results were subject to analysis and compared with the reference methods, i.e. pharmacopeal HPLC methods.

Key words: naratriptan hydrochloride, sumatriptan TLC

1. Introduction

Sumatriptan, [3-[2-(dimethyloamino)ethylo-1H-indole-5-ilo]-N-methylmethanesulfonoamide and naratriptan, N-methyl-3-(1-methylo-4-piperidinylo)-1H-indolo-5-ethanosulfono-amid are agonists of the serotonin receptor (5HT₁). These drugs are effective in interrupting an attack of migraine, they differ between themselves in the effectiveness of activity and undesired activities [1].

Sumatriptan was determined in human systemic fluids (serum, plasma, urine, saliva) and in pharmaceutical preparations by the TLC method [2, 3, 4], spectrophotometric method [2, 3, 4], HPLC with UV detection [5, 6, 7, 8], HPLC with fluorescence detection [9], electrochemical detection [10, 11], capillary electrophoresis [12], LC/MS [13, 14, 15, 16, 17], and also GC/MS method. [3]. The monograph of the sumatriptan succinate substance was published in the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) [18] and the monographs of the substances (sumatriptan succinate, sumatriptan) and pharmaceutical dosage forms in the British Pharmacopoeia (BP) [19] and the United States Pharmacopoeia (USP) [20]. In all pharmacopeal monographs the HPLC method with UV detection was used to determine contents and performance of purity tests. Naratriptan was determined in the human plasma [13] and in blood of rabbits [17] by the HPLC/MS method and in the substance by the micellar electrophoresis method [21]. In the United States Pharmacopoeia [20] there was published the monograph for the substance and tablets, in which contents and purity are tested by the HPLC/UV method, and the identity additionally by the TLC method.

The goal of the work was elaboration of conditions of identification and determination of triptanes in the substance and pharmaceutical dosage forms by two validated methods of the gas chromatography and densitometric method in the presence of their degradation products. The obtained results were statistically compared with the results acquired by reference methods. In case of sumatriptan the HPLC method was selected the reference method, which was described in BP [19].

2. Experimental part

2.1. Apparatus

GC: The GC-14 B gas chromatograph with FID detector (Shimadzu); GC HP-1 capillary column, 10 m x 0,53 mm

HPLC zestaw do HPLC serii 10A (Shimadzu) składający się z: dwóch pomp LC-10ATVP, urządzenia do odgazowania fazy ruchomej DGU-14A, detektora SPD-10AVVP, automatycznego podajnika próbek SIL-10ADVP, pieca CTO-10ACVP oraz jednostki sterującej SCL-10AVP. Chromatogramy rejestrowano stosując program CLASS-VP wersja 5.3; kolumny: Zorbax SB-Phenyl, 5 μm , 4,6 x 150 mm (Agilent) [20], Spherisorb ODS-1, 5 μm , 4,6 x 250 mm (Merck) [19];

Inne: lampa halogenowa (Fabryka Aparatury Elektro-medycznej Famed-1).

2.2 Materiały

Sumatriptan wzorzec, substancja i czopki Imigran 25 mg firmy GlaxoSmithKline, bursztynian sumatriptanu wzorzec i Sumamigren tabletki powlekane 50 mg firmy Polpharma, kwas bursztynowy firmy Fluka, nataryptanu chlorowodorek wzorzec, substancja i Naramig tabletki powlekane 2,5 mg firmy GlaxoSmithKline, witamina E firmy Merck, chlorodiazepoksyd firmy Polfa Tarchomin.

2.3 Odczynniki

Wszystkie odczynniki klasy cz.d.a. i HPLC fazy ruchome:

- do TLC: octan etylu-metanol-25% amoniak (19:2:1)
- do HPLC [20]: bufor 0,01M fosforan trietyloaminy o pH 2,5 - 2-propanol (9:1)
- do HPLC [19]: acetonitryl – bufor fosforan dibutyloaminy o pH 6,5 (1:3).

2.4. Przygotowanie roztworów zawierających produkty rozkładu

Odważono po 10 mg substancji sumatriptan i naratriptan i poddano działaniu:

- A. fotodegradacji – odważkę umieszczono na 4 godziny pod lampą halogenową 150 W/m² w odległości 45 cm, temperatura barwowa 3400 K;
- B. termodegradacji – odważkę na 4 godziny umieszczono w suszarce o temperaturze 105°C;
- C. hydrolizie kwasowej – odważkę rozpuszczono w 1 ml roztworu kwasu solnego (0,1 mol/l) i przechowywano przez 5 dni w temperaturze pokojowej;
- D. hydrolizie alkalicznej – odważkę rozpuszczono w 1 ml wodorotlenku sodowego (0,1 mol/l) i przechowywano przez 5 dni w temperaturze pokojowej;
- E. utlenieniu – odważkę przez 2 min poddawano działaniu 200 μl 30 % roztworu nadtlenku wodoru.

Następnie substancje z punktów A i B rozpuszczono w 10 ml metanolu, roztwory C i D zobojętniono odpowiednio roztworami (0,1 mol/l) kwasu solnego lub wodorotlenku sodowego i uzupełniono metanolem do 10 ml. Zawiesinę E zobojętnioną za pomocą 1 ml 10% roztworu sulfaminianu amonu, rozpuszczono w 5 ml metanolu, a następnie uzupełniono metanolem do 10 ml.

ID, a film thickness of 2.65 μm (Hewlett Packard);

TLC: TLC Sampler III applicator (Camag); CS-9000 densitometer (Shimadzu); HPTLC plates coated with GF₂₅₄ silica gel, 10 x 20 cm, a gel-layer thickness of 0.25 mm (Merck);

HPLC: assembly for HPLC, series 10A (Shimadzu) consisting of: two LC-10ATVP pumps, the DGU-14A appliance for degassing of the mobile phase, SPD-10AVVP detector, SIL-10ADVP automatic sample feeder, CTO-10ACVP furnace and the SCL-10AVP steering unit. Chromatograms were registered applying the CLASS-VP programme, version 5.3; the columns: Zorbax SB-Phenyl, 5 μm , 4,6 x 150 mm (Agilent) [20], Spherisorb ODS-1.5 μm , 4,6 x 250 mm (Merck) [19];

Others: a halogen lamp (the Plant of Electro-medical Apparatus Famed-1).

2.2 Materials

The reference sumatriptan, substance and 25 mg suppositories Imigran of GlaxoSmithKline company, the reference sumatriptan succinate and 50 mg Sumamigren coated tablets of Polpharma company, succinate acid of Fluka company, the reference naratriptan hydrochloride, substance and 2.5 mg Naramig coated tablets of GlaxoSmithKline company, vitamin E of Merck company, chlorodiazepoxide of Polfa Tarchomin company.

2.3 Reagents

All reagents of analytically pure and HPLC class.

Mobile phases:

- for TLC: ethyl acetate-methanol-25% ammonia (19:2:1)
- for HPLC [20]: buffer of 0.01M triethylamine phosphate of pH 2.5 - 2-propanol (9:1)
- for HPLC [19]: acetonitrile – buffer of phosphate dibutylamine of pH 6. (1:3)

2.4. Preparation of solutions containing degradation products

- A. gus photodegradation – the weighted amount was placed for 4 hours under a halogen lamp 150 W/m² in a distance of 45 cm, colour temperature 3400 K;
- B. thermodegradation – the weighted amount was placed for 4 hours in a dryer in temperature 105°C;
- C. acid hydrolysis – the weighted amount was dissolved in 1 ml of the hydrochloride acid solution (0.1 mol/l) and stored for 5 days in the room temperature;
- D. alkaline hydrolysis – the weighted amount was dissolved in 1 ml of sodium hydroxide (0.1 mol/l) and stored for 5 days in the room temperature;
- E. oxidation – the weighted amount was subject to activity of 200 μl of 30% hydrogen peroxide solution for 2 minutes.

Afterwards the substances from points A and B were dissolved in 10 ml of methanol, solutions C and

2.5. Roztwory wzorcowe

Metanolowe roztwory o stężeniu 1 mg/ml:

- witaminy E – wzorzec wewnętrzny do oznaczania naratriptanu,
- chlorodiazepoksydu – wzorzec wewnętrzny do oznaczania sumatriptanu,
- kwasy bursztynowego,
- sumatriptanu,
- chlorowodoru naratriptanu.

Roztwory przechowywane w lodówce są trwałe przez 24 godziny.

2.6. Roztwory badane

2.6.1. Roztwory do GC

- substancje – przygotowano metanolowe roztwory substancji o stężeniu 1 mg/ml,
- tabletki – do odważki masy tabletkowej dodano taką ilość metanolu, by otrzymać roztwór o stężeniu substancji czynnej 1 mg/ml, zawiesinę umieszczano na 15 min w łaźni ultradźwiękowej, a następnie sączono przez filtr 0,45 μm ,
- czopki – do odważki rozdrobnionych czopków dodano taką ilość metanolu, by otrzymać roztwór o stężeniu substancji czynnej 1 mg/ml, mieszano i ogrzewano 30 min na łaźni wodnej o temperaturze 60°C, następnie otrzymaną zawiesinę wymrażano przez 1 godzinę i sączono przez filtr 0,45 μm .

Do 1 ml tak otrzymanego roztworu dodano roztwór odpowiedniego wzorca wewnętrznego (tabela 1) i rozcieńczono metanolem tak, aby osiągnąć stężenie optymalne do oznaczenia (tabela 2).

2.6.2. Roztwory do TLC

- metanolowy roztwór naratriptanu o stężeniu 0,5 mg/ml,
- metanolowy roztwór sumatriptanu o stężeniu 1 mg/ml,
- tabletki – do odważki masy tabletkowej dodawano taką ilość metanolu, by otrzymać roztwór o stężeniu 0,5 mg/ml dla produktu leczniczego Naramig i 1 mg/ml dla produktu leczniczego Sumamigren. Zawiesiny umieszczano na 15 min w łaźni ultradźwiękowej, a następnie sączono przez filtr 0,45 μm .

3. Metody i wyniki

3.1 Chromatografia gazowa

Badania wykonano w następujących warunkach: temperatura dozownika 300°C, temperatura detektora 320°C, ciśnienie helu 60 psi. Temperatury kolumny dla poszczególnych substancji i form farmaceutycznych oraz wybrane do oznaczenia wzorce wewnętrzne podano w tabeli 1. Sprawdzone, że metoda jest specyficzna względem rozpuszczalnika, wyekstrahowanych składników placebo, wzorców wewnętrznych oraz kwasu bursztynowego. Stwierdzono, że wymienione czynniki

D were neutralised respectively with the solutions (0.1 mol/l) of hydrochloric acid or sodium hydrochloride and supplemented with methanol to 10 ml. The suspension E was neutralised by means of 1 ml of 10% ammonium sulfamate solution, then dissolved in 5 ml of methanol, and afterwards supplemented with methanol to 10 ml.

2.5. The reference solutions

The methanol solutions of concentration 1 mg/ml:

- of vitamin E – an internal reference for determination of naratriptan
- of chlorodiazepoxide – an internal reference for determination of sumatriptan
- of succinate acid
- of sumatriptan
- of naratriptan hydrochloride

The solutions were stored in a fridge are durable for 24 hours.

2.6. The tested solutions

2.6.1. Solutions for GC

- the substances – the methanol solutions of substances were prepared of 1 mg/ml concentration
- the tablets – a certain amount of methanol was added to the weighted amount of the tablet mass in order to obtain the solution of the active substance concentration of 1 mg/ml, the suspension was placed for 15 minutes in the ultrasound bath and then it was filtered through a 0.45 μm filter,
- the suppositories – to the weighted amount of the crushed suppositories a certain amount of methanol was added in order to obtain the solution of the active substance of 1 mg/ml concentration, it was mixed and heated for 30 minutes on water bath of temperature 60°C, afterwards the received suspension was frozen out for 1 hour and filtered through a 0.45 μm filter.

Afterwards the solution of the adequate internal reference was added to 1 ml of the solution obtained in this way (Table 1) and dissolved with methanol in such a way as to obtain the optimal concentration for determination (Table 2).

2.6.2. Solutions for TLC

- the methanol solution of naratriptan of 0.5 mg/ml concentration,
- the methanol solution of sumatriptan of 1 mg/ml concentration
- the tablets – to the weighted amount of the tablet mass a certain amount of methanol was added in order to obtain the solution of 0.5 mg/ml concentration for the pharmaceutical dosage form Naramig and 1 mg/ml for pharmaceutical dosage forms Sumamigren. The suspensions were placed for 15 minutes in the ultrasound bath and then filtered through a 0.45 μm filter.

Tabela 1. Warunki oznaczenia ilościowego metodą GC

Table 1. Parameters for quantitative determination by the GC method

| Preparat / Substancja Pharmaceutical / Substance | Temperatura kolumny Temperature of the column | Wzorzec wewnętrzny Internal reference |
|---|---|--|
| Naratryptan | 265°C | witamina / vitamin E |
| Naramig tabletki / tablets | | |
| Sumatriptan | 235°C | chlorodiazepoksyd chlorodiazepoxide |
| Sumamigren tabletki / tablets | | |
| Imigran czopki / suppositories | program temperaturowy: 235°C przez 8 min, następnie przyrost temperatury 10°C/min do 290°C i 5 min w 290°C / temperature programme: 235°C for 8 min., then temperature increase by 10°C/min up to 290°C and 5 min. at 290°C | chlorodiazepoksyd chlorodiazepoxide |

temperatura dozownika 300°C
temperatura detektora 320°C
gaz nośny: hel
ciśnienie helu 60 psi

temperature of a feeder 300°C
temperature of the detector 320°C
carrier gas: helium
helium pressure: 60 psi

Tabela 2. Parametry krzywych kalibracji, granice wykrywalności i oznaczalności oraz optymalne stężenie do oznaczenia ilościowego

Table 2. Characteristic parameters for the regression equations, limit of detection, limits of determination and optimal concentration for quantitative determination

| | | Chromatografia gazowa Gas chromatography | Chromatografia cienkowarstwowa Thin-layer chromatography |
|-----------------------------|---|---|---|
| Naratryptan Nara-triptan | równanie equation | $y=0,0013x - 0,0327$ | $y=1074,7x + 133,5$ |
| | współczynnik korelacji correlation coefficient | 0,9985 | 0,9972 |
| | zakres liniowości scope of linearity | 50 – 350 µg/ml | 0,2 – 3 µg ^a |
| | optymalne stężenie optimal concentration | 200 µg/ml | 1 µg ^a |
| | granica wykrywalności limit of detection | 30 µg/ml | 0,05 µg ^a |
| | granica oznaczalności limit of determination | 45 µg/ml | 0,1 µg ^a |
| Sumatriptan Sumatriptan | równanie equation | $y=0,0497x - 0,6957$ | $y=1047,9x + 249,9$ |
| | współczynnik korelacji correlation coefficient | 0,9995 | 0,9973 |
| | zakres liniowości limit of detection | 10 – 200 µg/ml | 0,2 – 4 µg ^a |
| | optymalne stężenie optimal concentration | 100 µg/ml | 1 µg ^a |
| | granica wykrywalności limit of detection | 5 µg/ml | 0,05 µg ^a |
| | granica oznaczalności limit of determination | 10µg/ml | 0,1 µg ^a |

a – ilość naniesiona punktowo na płytkę

a – a quantity spread in spots on a plate

nie wpływają na przebieg oznaczania naratriptanu i sumatriptanu.

Sporządzono roztwory substancji czynnych sumatriptanu i chlorowodoru naratriptanu o różnych stężeniach z dodatkiem odpowiedniego wzorca wewnętrznego. Zarejestrowano chromatogramy i wykreślono krzywe zależności stosunku pola piku związku badanego do pola piku wzorca wewnętrznego od stężenia związku badanego. Zakresy stężeń, równania prostych i współczynniki korelacji zamieszczono w tabeli 2. Uzyskane współczynniki korelacji świadczą o zależności liniowej. Określono także granice wykrywalności i oznaczalności związków (tabela 2). Wybrano optymalne stężenie substancji czynnych (tabela 2) oraz dobrano stężenia wzorców wewnętrznych tak, by stosunek pól pików wynosił około 1. Oznaczono precyzję układu poprzez sześciokrotne dozowanie roztworu wzorców substancji czynnych o wybranym stężeniu. Wartość RSD stosunku pól pików wzorca substancji czynnej i wzorca wewnętrznego wynosiła 0,72% dla naratriptanu i 0,90% dla sumatriptanu.

Kolejnym etapem było sprawdzenie, czy produkty rozkładu nie wpływają na wynik oznaczania zawartości substancji czynnej metodą GC. W tym celu oznaczono jej zawartość w roztworach poddanych różnym czynnikiem stresującym. Równolegle powtórzono to oznaczenie za pomocą referencyjnych metod HPLC [19] i [20]. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy wynikami uzyskanymi metodą GC i metodami referencyjnymi (tabela 3). Sprawdzone także trwałość roztworów wzorców i prób badanych. Roztwory te przechowywano w lodówce i temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Zarejestrowano chromatogramy roztworów świeżych i przechowywanych 24 godziny metodami referencyjnymi. Łączny współczynnik zmienności RSD wyznaczonych stężeń dla roztworów świeżych i przechowywanych nie przekraczał 2%. Uznano zatem, że roztwory wzorców i prób przechowywane zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w lodówce, są stabilne przez 24 godziny.

Opracowaną metodę zastosowano do oznaczania zawartości obu tryptanów w substancjach czynnych i produktach leczniczych. W tym celu do kolumny dozowano po 1 μ l roztworów substancji wzorcowych i badanych oraz preparatów. Zarejestrowano pola oraz policzono stosunki pól pików badanego związku lub wzorca do wzorca wewnętrznego. Jako metody porównawcze zastosowano metody HPLC wg [19] i [20].

Zastosowany test Grubbs'a do wyników GC i HPLC wykazał brak wartości odbiegających (błędów grubych). Porównanie wariancji wyników uzyskanych obiema metodami (test F Snedecora) nie wykazało istotnych statystycznie różnic pomiędzy nimi, co pozwoliło zastosować do porównania średnich test t-Studenta (dla prób niepowiązanych). Nie stwierdzono różnic między średnimi na poziomie istotności α 0,05. Wyniki zamieszczono w tabelach 3 i 4.

3. Methods and results

3.1 Gas chromatography

The tests were performed in the following conditions: the feeder temperature 300°C, the detector temperature 320°C, helium pressure 60 psi. Temperatures of the column for particular substances and pharmaceutical dosage forms and the internal references selected for determination are presented in Table 1. It was checked that the method is specific in relation to the solvent, extracted placebo components, internal references and succinate acid. It was found that the mentioned factors do not have any influence on the course of determination of naratriptan and sumatriptan.

There were prepared solutions of the active substances of sumatriptan and naratriptan hydrochloride of various concentrations with an addition of the adequate internal reference. Chromatograms were registered and curves were plotted of relationship of the peak field ratio of the tested compound to the peak field of the internal reference on concentration of the tested compound. The ranges of concentrations, equations of straight lines and correlation coefficients are presented in Table 2. The obtained correlation coefficients testify about the linear relationship. There were also determined limits of detectability and determinability of compounds (Table 2). The optimal concentration of the active substances was selected (Table 2) and concentrations of the internal references were matched in such a way that the ratio of the peak fields amounted to about 1. Precision of the system was determined through six times' proportioning of the reference solutions of the active substances of a selected concentration. The RSD value of the ratio of peak fields of the active substance reference and the internal reference equalled to 0.72% for naratriptan and 0.90% for sumatriptan.

The successive stage was checking whether the degradation products do not have influence on the result of determination of the active substance content by the GC method. In this order its content was determined in the solutions subjected to various stressing agents. This determination was repeated parallel by means of the reference HPLC methods [19] and [20]. Any statistically significant differences were not found between the results obtained by the GC method and reference methods (Table 3). Durability of the reference compounds and tested samples/was also checked. These solutions were stored in a fridge and in the room temperature for 24 hours. Chromatograms of the fresh and solutions stored for 24 hours were registered by the reference methods. The joint coefficient of RSD variation of the estimated concentrations for the fresh and stored solutions did not exceed 2%. Therefore, it was considered that the solutions of the references and samples stored in the room temperature as well as in the fridge, are stable for 24 hours.

Tabela 3. Porównanie wyników oznaczenia ubytku masy substancji chlorowodorek naratriptanu i sumatriptanu w wyniku działania czynników stresowych uzyskanych opracowanymi metodami GC i TLC oraz referencyjnymi HPLC (liczba prób n = 6)
 Table 3. Comparison of results for quantitative determination of mass decrement of naratriptan hydrochloride and sumatriptan substances in the effect of decomposition at stress conditions obtained by proposed GC and TLC methods and reference HPLC methods (number of determination n = 6)

| | GC | | | | | TLC | | | | | HPLC ^c | | | | |
|--|-------|---|-------|-------|-------|-------|---|-------|-------|-------|-------------------|---|-------|-------|-------|
| | A | B | C | D | E | A | B | C | D | E | A | B | C | D | E |
| Naratriptan | 9,62 | 0 | 17,6 | 10,37 | 19,80 | 9,67 | 0 | 17,77 | 10,43 | 19,98 | 9,58 | 0 | 17,70 | 10,38 | 19,92 |
| średni ubytek % / average decrement % | 0,24 | 0 | 0,35 | 0,18 | 0,09 | 0,27 | 0 | 0,25 | 0,17 | 0,079 | 0,15 | 0 | 0,274 | 0,12 | 0,10 |
| ± przedział ufności / ± confidence interval | 0,054 | | 0,112 | 0,031 | 0,008 | 0,067 | | 0,055 | 0,027 | 0,006 | 0,022 | | 0,068 | 0,014 | 0,01 |
| wariancja / variance | 0,171 | | 0,299 | 0,198 | 0,420 | 0,121 | | 0,408 | 0,240 | 0,286 | | | | | |
| test F Snedecora (5,05) ^a / F Snedecor's test (5,05) ^a | 0,772 | | 0,576 | 0,850 | 0,057 | 0,508 | | 0,651 | 0,555 | 0,217 | | | | | |
| test t Studenta p(2,23) ^{ab} / Student's t-test p(2,23) ^{ab} | 2,63 | 0 | 1,85 | 0 | 12,75 | 2,63 | 0 | 1,70 | 0 | 12,78 | 2,52 | 0 | 1,87 | 0 | 12,77 |
| średni ubytek % / average decrement % | 0,23 | 0 | 0,20 | 0 | 0,20 | 0,27 | 0 | 0,22 | 0 | 0,20 | 0,12 | 0 | 0,17 | 0 | 0,17 |
| ± przedział ufności / ± confidence interval | 0,047 | | 0,035 | | 0,035 | 0,067 | | 0,022 | | 0,038 | 0,014 | | 0,027 | | 0,027 |
| wariancja / variance | 0,101 | | 0,386 | | 0,386 | 0,053 | | 0,413 | | 0,357 | | | | | |
| test F Snedecora (5,05) ^a / F Snedecor's test (5,05) ^a | 0,272 | | 0,872 | | 0,873 | 0,337 | | 0,856 | | 0,875 | | | | | |
| test t-Studenta p(2,23) ^{ab} / Student's t-test p(2,23) ^{ab} | | | | | | | | | | | | | | | |

a – na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ / on the significance level $\alpha = 0,05$

b – dla prób niepowiązanych / for unrelated tests

c – metody referencyjne: naratriptan wg [20], sumatriptan wg [19] / the reference

methods: naratriptan according to [20], sumatriptan according to [19]

0 – ubytek masy poniżej 0,1% / mass decrement below 0,1%

A – fotodegradacja / photodegradation

B – termodegradacja / thermodegradation

C – hydroliza kwasowa / acid hydrolysis

D – hydroliza zasadowa / basic hydrolysis

E – utlenianie / oxidation

Tabela 4. Statystyczne porównanie wyników oznaczenia ilościowego tryptanów w substancjach i produktach leczniczych, uzyskanych opracowanymi metodami GC i TLC oraz referencyjnymi HPLC (liczba prób n = 6)

Table 4. Statistical comparison of results for quantitative determination of triptans in drug substances and pharmaceutical dosage forms obtained by the proposed GC and TLC and reference HPLC methods (number of determination n = 6)

| Preparat Pharmaceutical | Naratryptan substancja Naratriptan substance | | Naramig tabletki Naramig tablets | | Sumatryptan substancja Sumatriptan substance | | Imigran czopki Imigran suppositories | | Sumamigran tabletki Sumamigran tablets | | | |
|---|---|--------|-------------------------------------|--------|---|--------|---|--------|---|--------|--------|--------|
| | 100 (%) | | 2,5 (mg) | | 100 (%) | | 25 (mg) | | 50 (mg) | | | |
| Deklarowana zawartość Declared content | GC | HPLC | GC | TLC | HPLC | GC | HPLC | GC | HPLC | GC | TLC | HPLC |
| średnia zawartość Average content | 99,84 | 100,17 | 2,54 | 2,53 | 2,54 | 99,91 | 99,56 | 24,83 | 24,81 | 47,87 | 47,50 | 47,74 |
| ±przedział ufności ± confidence interval | 0,413 | 0,379 | 0,041 | 0,033 | 0,043 | 0,327 | 0,053 | 0,303 | 0,325 | 0,53 | 1,14 | 0,564 |
| odchylenie. standardowe standard deviation | 0,3933 | 0,3607 | 0,0388 | 0,0314 | 0,0407 | 0,3112 | 0,5078 | 0,2889 | 0,3096 | 0,5034 | 1,0859 | 0,5377 |
| RSD% | 0,394 | 0,360 | 1,53 | 1,24 | 1,603 | 0,311 | 0,510 | 1,164 | 1,25 | 1,05 | 2,29 | 1,126 |
| wariancja / variance | 0,155 | 0,130 | 0,002 | 0,001 | 0,002 | 0,097 | 0,258 | 0,083 | 0,096 | 0,253 | 1,179 | 0,289 |
| test F Snedecora (5,05) ^a | 0,427 | | 0,460 | 0,292 | | 0,153 | | 0,441 | | 0,444 | 0,075 | |
| F Snedecor's test (5,05) ^a | | | | | | | | | | | | |
| test t-Studenta (2,23) ^{a,b} | 0,306 | | 0,944 | 0,817 | | 0,175 | | 0,933 | | 0,671 | 0,643 | |
| Student's t-test (2,23) ^{a,b} | | | | | | | | | | | | |

a – na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ / on the significance level $\alpha = 0,05$

b – dla prób niepowiązanych / for unrelated tests

GC – metoda chromatografii gazowej / the gas chromatography method

TLC – metoda densytometryczna / the densitometric method

HPLC – metoda chromatografii cieczowej – metoda referencyjna / the fluid chromatography method – reference method

3.2. Chromatografia cienkowarstwowa

Sprawdzono specyficzność metody, podobnie jak w metodzie GC. Stwierdzono, że placebo do czopków powodowało rozmywanie się plam sumatriptanu i w związku z tym zrezygnowano z oznaczania sumatriptanu w czopkach metodą densytometryczną.

Sporządzono roztwory substancji czynnych sumatriptanu i chlorowodoru naratriptanu o różnym stężeniu. Naniesiono na płytki, rozwinięto na wysokość 8 cm metodą wstępującą, suszono 1 godzinę na powietrzu. Za pomocą densytometru zarejestrowano widma i wyznaczono analityczną długość fali – naratriptan 225 nm, sumatriptan 226 nm. Wykreślono gęstości optyczne zmierzone przy tych długościach fali w funkcji stężenia. Zakresy stężeń, równania prostych i współczynniki korelacji zamieszczono w tabeli 2. Uzyskane współczynniki korelacji świadczą o liniowej zależności gęstości optycznej od stężenia roztworu. Określono także granice wykrywalności i oznaczalności związków (tabela 2). Wybrano optymalne stężenie substancji czynnej (tabela 1) do oznaczeń ilościowych. Oceniono precyzję układu poprzez wyznaczenie RSD dla wyników sześciu niezależnych oznaczeń substancji w roztworze o wybranym stężeniu. Wartości RSD wyniosły odpowiednio 1,74% dla naratriptanu i 1,35% dla sumatriptanu.

Kolejnym etapem było sprawdzenie, czy produkty rozkładu nie wpływają na wynik oznaczania zawartości substancji czynnej. W tym celu oznaczono jej stężenie w roztworach wzorcowych jak i poddanych różnym czynnikiem stresującym zarówno metodą TLC, jak i referencyjnymi HPLC [19] i [20], a następnie obliczono ubytki masy. Wyniki zamieszczono w tabeli 3. Na ich podstawie można stwierdzić, że różnice pomiędzy metodami GC, TLC i HPLC są statystycznie nieistotne.

Następnie wykonano oznaczenia zawartości obu tryptanów w substancjach czynnych i produktach leczniczych. W tym celu na płytki nanoszono: po 2 μ l roztworów substancji wzorcowej i badanej naratriptan oraz produktu leczniczego Naramig tabletki, a także po 1 μ l roztworów substancji wzorcowej i badanej sumatriptan oraz produktu leczniczego Sumamigren tabletki. Płytki rozwijano w sposób opisany powyżej, po czym badaną substancję oznaczano densytometrycznie, mierząc gęstość optyczną. Zastosowano te same metody porównawcze HPLC [19] i [20], jakie wymieniono w punkcie dotyczącym chromatografii gazowej.

Test Grubbs'a zastosowany do wyników densytometrycznych i HPLC wykazał brak wartości odbiegających (błędów grubych). Porównanie wariancji wyników uzyskanych obiema metodami (test F Snedecora) nie wykazało istotnych statystycznie różnic pomiędzy nimi, co pozwoliło zastosować do porównania średnich test t-Studenta (dla prób niepowiązanych). Nie stwierdzono różnic między średnimi na poziomie istotności α 0,05. Wyniki zamieszczono w tabelach 3 i 4.

The elaborated method was applied for determination of contents of both triptanes in the active substances and pharmaceutical dosage forms. In this order 1 μ l of solutions of the reference and tested substances and pharmaceutical dosage forms was proportioned to a column. The fields were registered and ratios of peaks fields of the tested compound or the reference to the internal reference were calculated. The HPLC methods were applied as the comparative methods in accordance with [19] and [20].

Grubbs's test applied to the GC and HPLC results proved the lack of abnormal values (gross errors). Comparison of variances of the results obtained by both methods (F Snedecor's test) did not prove statistically essential differences between them, which allowed to apply the Student's t-test for comparison of averages (for unrelated tests). Any differences between the averages were not found at the α 0.05 significance level. The results were presented in Tables 3 and 4.

3.2. Thin-layer chromatography

The specificity of the method was checked, similarly as in the GC method. It was found that placebo to suppositories caused broadening of sumatriptan spots and in relation with it one resigned from determination of sumatriptan in the suppositories by the densitometric method.

The solutions of the active substances of sumatriptan and naratriptan hydrochloride of different concentration were prepared. They were spread on plates, developed to the height of 8 cm by the ascending method, dried for 1 hour in the air. By means of the densitometer the spectra were registered and the analytical length of wave was estimated – naratriptan 225 nm, sumatriptan 226 nm. The optical densities measured at these lengths of the wave in the concentration function were plotted. The ranges of concentrations, equations of straight lines and correlation coefficients were presented in Table 2. The obtained correlation coefficients testify about the linear dependence of the optical density on the solution concentration. There were also determined limits of detectability and determinability of the compounds (Table 2). The optimal concentration of the active substance was also selected (Table 1) to quantitative determinations. Precision of the system was evaluated by estimating RSD for the results of the six independent determinations of the substance in the solution of a chosen concentration. The RSD values equalled respectively 1.74% for naratriptane and 1.35% for sumatriptan.

The successive stage was checking whether the degradation products do not have influence on the result of determination of the active substance content. In this order its concentration was determined in the reference solutions as well as subjected to various stressing agents both by the TLC method and HPLC reference methods [19] and [20], afterwards mass decrements were calculated. The results were presented in Table 3. On their

Uzyskane wyniki ilościowego oznaczania sumatriptanu w tabletkach metodą TLC są porównywalne do otrzymanych przez L.J. Bebawy i wsp.[4], jednak zastosowana przez nich faza ruchoma jest bardziej toksyczna.

Wnioski

Dane przedstawione w powyższej pracy pozwalają stwierdzić, że opracowany układ GC umożliwia identyfikację i oznaczanie naratriptanu i sumatriptanu w substancji i preparatach leczniczych Naramig tabletki 2,5 mg, Imigran czopki 25 mg oraz Sumamigren tabletki 50 mg w obecności ich produktów rozkładu; natomiast układ TLC umożliwia identyfikację naratriptanu i sumatriptanu w substancji i preparatach leczniczych oraz oznaczania ich zawartości w tabletkach w obecności produktów rozkładu. Różnice pomiędzy wynikami ilościowych oznaczeń uzyskanych za pomocą metod GC i HPLC oraz TLC i HPLC są statystycznie nieistotne.

Metoda GC nie była dotychczas stosowana do oznaczania zawartości naratriptanu i sumatriptanu w preparatach farmaceutycznych.

W opracowanej metodzie TLC w stosunku do opisanej przez L.J. Bebawy i wsp.[4] do oznaczania sumatriptanu wykorzystano mniej toksyczną fazę ruchomą. Ta sama metoda TLC pozwala na oznaczenie zawartości naratriptanu w tabletkach, dla których znaleziono jedynie opis warunków TLC do oznaczania tożsamości (USP).

grounds, one can state that differences between GC, TLC and HPLC methods are inessential statistically.

Afterwards there were performed determinations of content of both triptanes in the active substances and pharmaceutical dosage forms. In this order 2 μ l of the solutions of the reference and tested substance naratriptan and the pharmaceutical dosage form, Naramig tablets, were spread on plates, and also 1 μ l of the solutions of the reference and tested substance sumatriptan and the pharmaceutical dosage form Sumamigren tablets. The plates were developed in the way described above, while the tested substance was determined densitometrically, measuring the optical density. The same comparative methods were applied - HPLC [19] and [20], which were mentioned in a point concerning the gas chromatography.

Grubbs's test applied to the densitometric and HPLC results proved the lack of abnormal values (gross errors). Comparison of variances of the results obtained by both methods (F Snedecor's test) did not indicate any statistically essential differences between them, which allowed to apply the Student's t-test for comparison of averages (for the unrelated tests). Any differences were not found between averages at the α 0,05 significance level. The results were presented in Tables 3 and 4.

The obtained results of the quantitative determination of sumatriptan in tablets by the TLC method are comparable with the ones obtained by L.J. Bebawy and co-authors [4], however, the mobile phase applied by them is more toxic.

Conclusions

Data presented in the above elaboration allow to state that the worked out GC system enables identification and determination of naratriptan and sumatriptan in the substance and pharmaceutical dosage forms 2.5 mg Naramig tablets, 25 mg Imigran suppositories and 50 mg Sumamigren tablets in the presence of their degradation products; whereas the TLC system enables identification of naratriptan and sumatriptan in the substance and pharmaceutical dosage forms and determination of their content in tablets in the presence of the degradation products. The differences between the results of the quantitative determinations obtained by means of the GC and HPLC, TLC and HPLC methods are statistically inessential.

The GC method has never been applied so far for determination of the content of naratriptan and sumatriptan in pharmaceutical dosage forms.

In the elaborated TLC method in relation to the described by L.J. Bebawy and co-authors [4] for determination of sumatriptan a less toxic mobile phase was applied. The same TLC method enables determination of the content of naratriptan in tablets, for which only a description of the TLC parameters for determination of the identity was found (USP).

Piśmiennictwo / References

1. Diamond S, *Nowe spojrzenie na leczenie migreny* Medycyna po dyplomie 2001;10:9:46–56
2. Tipre DN, Vavia PR, *Estimation of sumatriptan succinate in pharmaceutical dosage form by spectrophotometric and HPTLC methods*: Indian Drugs 1999;36(8):501–505, per Analytical Abstract 2000; 62(1);01G185
3. Roccholz G, Ahrens B, Konig F, Schutz HW, Shuz H, Seno H, *Screening and Identification of Sumatriptan and Its Main Metabolite by Means of Thin-Layer Chromatography, Ultraviolet Spectroscopy and Gas Chromatography / Mass Spectrometry* Arzneimittelforschung. 1995; 45(9):941-946
4. Bebawy LJ, Moustafa AA, Abo-Talib NE, *Stability-indicating methods for the determination of sumatriptan succinate* J. Pharm. Biomed. Anal. 2003; 32:1123-1133
5. Singh S, Jain R, *Stability indicating HPLC method for the determination of sumatriptan succinate in pharmaceutical preparation and its application in dissolution rate studies*. Indian Drugs 1997; 34(9): 527-531
6. Shirsat VA, Gabne SY, *High performance liquid chromatographic determination of sumatriptan succinate from pharmaceutical preparation* Indian Drugs 1998; 35(7): 404-407
7. Avadhanulu AB, Srinivas JS, Anjaneyulu Y, *Reverse-phase HPLC and colorimetric determination of sumatriptan in its drug form* Indian Drugs 1996; 33(7): 334-337
8. Femenío-Font A, Merino V, Rodila V, López-Castelano A, *High-performance liquid chromatographic determination of sumatriptan after in vitro transdermal diffusion studies* J. Pharm. Biomed. Anal. 2005; 37(3): 621-626
9. Ge Z, Tessier E, Neirinck L, Zhu Z, *High performance liquid chromatographic method for the determination of sumatriptan with fluorescence detection in human plasma* J.Chromatogr. B 2004; 806:229-303
10. Franklin M, Odontiadis J, Clement EM, *Determination of sumatriptan succinate in human plasma by high-performance liquid chromatography with colometric detection and utilisation of solid -phase extraction* J.Chromatogr. B Biomed. Appl. 1996; 681(2): 416-420
11. Dunne M, Andrew P, *Fully automated assay for the determination of sumatriptan in human serum using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection* J.Chromatogr. B Biomed. Appl. 1996; 14(6) 721
12. Altria KD, Fibley SD, *Quantitative pharmaceutical analysis by capillary electrophoresis* J. Liq. Chromatogr. 1993; 16(11): 2281-2292
13. Vishwanathan K, Baetlett MG, Stewart JT, *Determination of antimigration compounds rizatriptan, zolmitriptan, naratriptan and sumatriptan in human serum by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry* Rapid Commun. Mass Spectrom 2000; 14(3):168-172
14. Cheng KN, Redrup MJ, Borrow A, Williams PN, *Validation of a liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the determination of sumatriptan in human biological fluids* J. Pharm. Biomed. Anal. 1998; 17(3); 399-408
15. McLoughlin DA, Olah TV, Ellis JD, Gilbrt JD, Halpin RA, *Quantation of the 5HT1D agonist MK-462 and sumatriptan in plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry* J. Chromatogr. A 1996; 726(1-2):115-124
16. Xu XH ,Bartlett MG, Stewart JT, *Determination of degradation products of sumatriptan succinate using LC-MS and LC-MS-MSJ*. Pharm. Biomed. Anal. 2001; 26(3): 367–377.
17. Dulery BD, Petty MA, Schoun J, David M, Hubert ND, *A method using a liquid chromatographic-electrospray-mass spectrometric assay for the determination of antimigraine compounds: preliminary pharmacokinetics of MDL 74,721, sumatriptan and naratriptan, in rabbit* J. Pharm. Biomed. Anal. 1997;15(7):1009–1020.
18. European Pharmacopoeia Sixth Edition. Council of Europe, Strasbourg Cedex 2008;4315–4317.
19. British Pharmacopoeia 2010. The Stationery Office, London 2009;2026–2030:3114–3118.
20. The United States. Pharmacopoeia USP 32. The United States Pharmacopeal Convention, Rockville 2009; 3639–3643:3039–3042.
21. Altria KD, McLean R, *Development and optimisation of generic micellar electrokinetic capillary chromatography method to support analysis of a wide range of pharmaceutical dosage forms and excipient* J. Pharm. Biomed. Anal. 1998; 18: 807–813.

Adres do korespondencji / Mailing address:

Anna Chyła
Zakład Farmacji Podstawowej i Stosowanej
Narodowego Instytutu Leków
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa
tel. (22) 841 18 88 wewn. 395,
fax (22) 841 18 88 wewn. 272,
e-mail: chyła@il.waw.pl