

ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 543.6

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИКЛОФЕНАКА В ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕРАХ

Тхань Там Нгуен Тхи, аспирант, С.А. Кедик, заведующий кафедрой, А.Е. Балдаев, студент, С.В. Беляков, студент, В.В. Суслов, ведущий инженер, Е.В. Ворфоломеева, ведущий инженер, Е.А. Петрова[@], ведущий инженер, С.Г. Бексаев, ведущий инженер

*Кафедра биомедицинских и фармацевтических технологий
МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва, 119571 Россия
[@] Автор для переписки: elizaweta__@mail.ru*

В статье предложена новая методология количественного определения диклофенака в виде свободной кислоты, инкапсулированного в полимерный носитель, позволившая повысить точность определения содержания лекарственного вещества.

Ключевые слова: ВЭЖХ, диклофенак, валидация, полимерные микросферы.

ELABORATION AND VALIDATION OF METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF DICLOFENAC IN POLYMERIC MICROSPHERES

**Tam Nguen Tkhi Tkhan, S.A. Kedik, A.E. Baldaev, S.V. Belyakov,
V.V. Suslov, E.V. Vorfolomeeva, E.A. Petrova[@], S.G. Beksaev**

*M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technologies,
Moscow, 119571 Russia
[@] Corresponding author e-mail: elizaweta__@mail.ru*

This article describes a new method of determining concentration of active ingredient in diclofenac-loaded polymer microspheres by using HPLC analysis. Proposed method showed better repeatability than more commonly used UV-Vis spectrometry. Isocratic liquid chromatograph with Luna C18 (2) Phenomenex column and UV detector (254 nm) was employed. Various parameters, such as specificity, repeatability, limit of quantification and stability, were measured to validate the method. Chromatogram showed only diclofenac-related peaks, which means specificity was adequate. Recovery was determined using 5 standard diclofenac solutions with known concentration. Repeatability and reproducibility were calculated based on data from two series of microspheres. LOQ was found using standard curve. Stability was observed during 30 days since sample preparation. Based on these results, suggested method successfully passed the validation process and can be used for quality control of diclofenac-loaded microspheres.

Keywords: HPLC, diclofenac, validaion, polymeric microspheres.

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) относятся к наиболее часто применяемым лекарственным средствам во всем мире в связи с их выраженными противовоспалительными, антипиретическими, анальгетическими и антитромбическими эффектами. Одним из наиболее активных противовоспалительных средств является диклофенак (рис. 1). Он включен в список жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств Российской Федерации. Диклофенак применяется в ревматологии, хирургии, травматологии, офтальмологии и других областях медицины.

За более чем 35-летний период применения НПВП значительно изменился не только качествен-

ный состав препаратов, но и их лекарственная форма (ЛФ). Главным недостатком применения НПВП является спектр их побочных эффектов, преимущественно проявляющихся поражением желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [1].

Для повышения клинической эффективности и снижения тяжести поражения ЖКТ разработана новая лекарственная форма диклофенака с пролонгированным высвобождением: полимерные микросферы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA 75:25) с инкапсулированным в них диклофенаком, которые вводятся внутримышечно в виде суспензии в водном растворе.

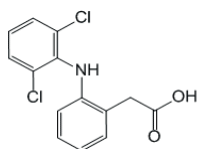


Рис. 1. Структурная формула диклофенака.

Одним из показателей качества полученной ЛФ диклофенака является количественное содержание лекарственного вещества (ЛВ) в полимерных микросферах.

Ранее для количественного определения диклофенака в виде его натриевой соли использовалась двухстадийная методика с применением УФ-спектрофотометрии [2]. На первой стадии проводили экстракцию диклофенака натрия из полимерных микросфер водным фосфатно-солевым раствором при обработке ультразвуком с последующим определением диклофенака натрия, перешедшего в раствор, с помощью УФ-спектрофотометрии. На второй стадии проводили последовательно растворение остатка полимерных микросфер в хлористом метиле с последующим осаждением в метаноле и спектрофотометрическое определение диклофенака натрия в полученном растворе.

Применение данной методики не позволяет осуществить точное количественное определение диклофенака в виде свободной кислоты из-за его низкой растворимости в водных средах. В связи с этим возникла необходимость создания нового аппаратурно-доступного и менее трудоемкого метода контроля содержания диклофенака в виде свободной кислоты, который обеспечит возможность определения ЛВ с более высокой точностью. В качестве метода количественного определения был выбран метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Основным объектом исследования являлись полимерные микросферы [3], содержащие инкапсулированный диклофенак в виде свободной кислоты.

Экспериментальная часть

Разработка методики ВЭЖХ для количественного определения ЛВ в полимерных микросферах проводилась с использованием жидкостного изократического хроматографа «Стайер» с колонкой Luna C18 (2) Phenomenex размером 4.6×250 мм, заполненной сорбентом с диаметром частиц 5 мкм, и УФ-детектированием (длина волны 254 нм). В качестве стандарта применяли раствор диклофенака в виде его натриевой соли [4]. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила [5] и 1% водного раствора ортофосфорной кислоты [5, 6] в объемном соотношении 70:30 соответственно. Для приготовления анализируемого образца в мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 10 мг полимерных микросфер, добавляли 7 мл ацетонитрила,

обрабатывали ультразвуком до полного растворения микросфер, колбу охлаждали и объем раствора доводили ацетонитрилом до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 200 мкл полученного раствора, доводили до метки подвижной фазой и тщательно перемешивали. Анализируемый раствор с концентрацией 20 мкг/мл выдерживали при комнатной температуре в течение 5 мин, затем вводили в хроматограф. Готовили градуировочные растворы стандартного образца диклофенака с концентрациями 2.5, 5, 10, 15, 30 и 50 мкг/мл. Анализ проводили при 20°C в изократическом режиме; объем вводимой пробы составлял 20.0 мкл, время анализа – 10 мин. Для валидации разработанной методики количественного определения диклофенака оценивали такие показатели, как специфичность [7, с. 22–24], точность по параметру открываемости [8; 9, р. 5], достоверность по параметрам повторяемости и воспроизводимости [10], предел количественного определения [7, с. 31–33] и стабильность раствора пробы [7, с. 49; 9, р. 6–8].

Результаты и их обсуждение

ВЭЖХ-хроматограммы градуировочного раствора и раствора анализируемого образца микросфер диклофенака приведены на рис. 2. Из них видно, что диклофенак имеет четко выраженный пик в области времени удерживания 7.5–8.0 мин, который не перекрывается с пиками, соответствующими другим компонентам системы. Предварительные эксперименты показали, что для используемого растворителя в этой области времени какие-либо пики также отсутствуют. Таким образом, хроматограммы удовлетворяют критерию специфичности методики.

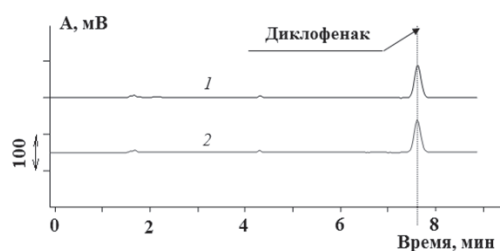


Рис. 2. Типичные ВЭЖХ-хроматограммы градуировочного раствора диклофенака (1) и раствора анализируемого образца микросфер диклофенака (2).

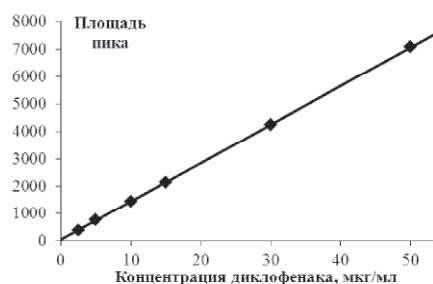


Рис. 3. Градуировочная зависимость площади пика от концентрации стандартного раствора диклофенака.

Для количественного определения диклофенака с использованием стандартных растворов была построена градуировочная зависимость (рис. 3). Экспериментально полученные точки описываются уравнением прямой $y=140.88x+34.34$ с коэффициентом корреляции 0.9993.

Массовую долю диклофенака (%) в образце препарата микросфер рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{M_{ДСК}}{M_{ДНС}} \cdot \frac{K_{разб} \cdot V_{перв.р.} \cdot \overline{C_{xp}}}{1000 \cdot m_{обр}} \cdot 100 \quad (1)$$

где $\overline{C_{xp}}$ – среднеарифметическое значение концентраций диклофенака (по натриевой соли), полученное в результате хроматографического анализа;

$K_{разб}$ – коэффициент разбавления раствора образца ($10/0.2=50$);

$V_{перв.р.}$ – объем первичного раствора образца микросфер, подготовленного к анализу (около 10 мл);
 $m_{обр}$ – масса навески препарата микросфер, взятого на анализ;

$M_{ДСК}$ – молекулярная масса диклофенака (свободной кислоты);

$M_{ДНС}$ – молекулярная масса диклофенака натриевой соли.

По результатам количественного определения диклофенака в образце с известной концентрацией (15 мкг/мл) в соответствии с методикой и способом расчета, был рассчитан параметр открываемости R [8]:

$$R = \frac{X}{X_0} \cdot 100\% \quad (2)$$

где X_0 – известное содержание диклофенака; X – найденное содержание диклофенака.

Значение R составляет 98.0%. Согласно [9], для удовлетворения критерию точности значение R должно составлять $100 \pm 5\%$, так что разработанная методика данному критерию удовлетворяет.

Достоверность разработанной методики оценивали по ее повторяемости (результаты получены в одних и тех же условиях в течение небольшого промежутка времени) и воспроизводимости (ре-

зультаты получены различными аналитиками) [10]. Результаты количественного определения ЛВ в двух сериях анализируемого образца микросфер диклофенака представлены в табл. 1. При статистической обработке результатов по известным уравнениям рассчитывали среднее арифметическое значение относительной площади пика, дисперсию S^2 , стандартное отклонение S и относительное стандартное отклонение $S_{отн}$.

Из данных табл. 1 видно, что относительное стандартное отклонение для каждой серии образцов не превышает 5%, что свидетельствует об удовлетворении методики критерию повторяемости [10].

Воспроизводимость методики оценивали с помощью критерия Фишера F ($P=95\%$; 5.05):

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (3)$$

где S_1^2 и S_2^2 – величины дисперсий, при условии, что $S_1^2 > S_2^2$.

Значение критерия Фишера согласно табл. 2, не превышает 5.05, что подтверждает воспроизводимость методики [10].

Минимальное количество анализируемого вещества в образце, которое может быть обнаружено, оценивали с использованием калибровочной прямой, по показателю LOQ (предел количественного определения) [7, с. 31-33]:

$$LOQ = 10 \cdot \frac{s}{b} \quad (4)$$

где b – наклон калибровочной прямой, s – стандартное отклонение сигнала.

Для 1 серии образцов (табл.1) $b = 138.4$, а $s = 67.88$, так что нижний предел количественного определения методики составляет $LOQ = 4.9$ мкг/мл.

Значение относительного стандартного отклонения площадей пиков на хроматограммах испытуемых растворов, полученных в течение 24 ч, не превышало 5%, что свидетельствует о стабильности (устойчивости) растворов анализируемой пробы. Соответствующие данные приведены в табл. 2.

Таблица 1. Содержание диклофенака в двух сериях измерений анализируемого образца согласно разработанной методике ВЭЖХ

1 серия			2 серия		
№ образца	А	Конц. диклф., мкг/мл	№ образца	А	Конц. диклф., мкг/мл
1.1	2803	19.65	2.1	2877	20.18
1.2	2677	18.76	2.2	2741	19.21
1.3	2849	19.98	2.3	2635	18.46
1.4	2694	18.88	2.4	2663	18.66
1.5	2705	18.96	2.5	2734	19.16
1.6	2739	19.20	2.6	2911	20.42

Выводы

Из табл. 2 следует, что разработанный метод удовлетворяет критерию стабильности, по крайней мере, в течение 30 часов.

Предложена новая методика количественного определения диклофенака в виде свободной кисло-

ты. Разработанный метод проверен по показателям специфичности, точности по параметру открываемости, достоверности по параметрам повторяемости и воспроизводимости, пределу количественного определения и стабильности раствора пробы.

Полученные результаты позволяют рекомендовать данный метод для количественного определения лекарственного вещества в полилактид-ко-гликолидных микросферах, содержащих инкапсулированный диклофенак в виде свободной кислоты.

Таблица 2. Стабильность раствора пробы при хранении по результатам разработанной методики ВЭЖХ

Время хранения, ч	A	Концентрация диклофенака, мкг/мл.
1	2922	20.50
2	2838	19.91
6	2820	19.79
8	2785	19.54
24	2762	19.38
30	2704	18.97
$\bar{A} = 2805$		
$S^2 = 5489.33$		
$S = 74.09$		
$S_{\text{отн}} = 2.64\%$		

Список литературы:

1. Белоусов Ю.Б., Бухман В.М., Ерофеева С.Б., Леонова М.В., Манешина О.А., Мухина М.А., Строк А.Б. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением и системы доставки лекарств: особенности фармакокинетики и клиническая эффективность. М.: Литтерра, 2011. 656 с.
2. Tunçay M., Caliş S., Kaş H.S., Ercan M.T., Peksoy I., Hincal A.A. // *Int. J. Pharm.* 2000. V. 195. P. 179–188.
3. Нгуен Тхи Тхань Там, Кедик С.А., Панов А.В., Суслов В.В., Тихонова Н.В., Петрова Е.А. // Вопросы образования и науки в XXI веке: сб. науч. тр. по материалам Междунар. науч.-практ. конф.: Часть 7. Тамбов, 2013.
4. *European Pharmacopoeia*, 6th ed., 2007. P. 1686–1687.
5. Государственная фармакопея XII издания. Т. 1. М: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. С. 240.
6. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1979. С. 309.
7. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации. М.: "Спорт и Культура - 2000", 2007.
8. AOAC, Peer-Verified Methods Program: manual on policies and procedures. USA: Arlington, Va., 1993. P. 10.
9. FDA Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. May 2001.
10. ГОСТ Р ИСО 5725-2-2002, часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений (5725-2-2002-1, 5725-2-2002-2, 5725-2-2002-3).