

МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА И ОКСИТОЦИНА В НОВОЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РАН И ИХ ВАЛИДАЦИЯ

А.А. Тумашов

к.х.н., доцент, кафедра органической химии, Институт естественных наук, Уральский федеральный университет;
ст. науч. сотрудник, лаборатория асимметрического синтеза,
Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН (г. Екатеринбург)

М.В. Иваненко

к.х.н., науч. сотрудник, лаборатория органических материалов,
Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН (г. Екатеринбург)
E-mail: mariav.ivanenko@gmail.com

И.Н. Штанько

к.фарм.н., мл. науч. сотрудник, лаборатория органических материалов,
Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН (г. Екатеринбург)

Т.Г. Хонина

д.х.н., вед. науч. сотрудник, лаборатория органических материалов,
Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН (г. Екатеринбург)

Н.Б. Перунова

д.м.н., зав. лабораторией биомониторинга и молекулярно-генетических исследований,
Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (г. Оренбург)

Предложены методики количественного определения ципрофлоксацина и окситоцина в новой фармацевтической композиции для лечения гнойно-воспалительных ран с использованием методов УФ-спектроскопии и ВЭЖХ соответственно. Проведена валидационная оценка методик.

Ключевые слова: ципрофлоксацин, окситоцин, фармацевтическая композиция, количественное определение, ультрафиолетовая спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация.

В последнее время неуклонно растет число гнойно-воспалительных заболеваний, при этом возникающие проблемы терапии гнойной инфекции связаны прежде всего со снижением эффективности традиционной антимикробной и противовоспалительной терапии ввиду формирования и роста доли устойчивых к антибиотикам микроорганизмов [1, 2]. В среднем у 30% всех хирургических больных отмечаются инфекционно-воспалительные заболевания и осложнения [3]. Несмотря на совершенствование методов лечения [4], высокий процент инфекционных осложнений и длительно незаживающих ран у больных, развитие резистентности микроорганизмов к лекарственным препаратам, снижение иммунологической реактивности организма требуют разработки новых препаратов для местного лечения гнойно-воспалительных ран.

Среди традиционных лекарственных форм, используемых в медицинской практике, значимое место занимают мягкие лекарственные формы (мази), предназначенные для нанесения на кожу, раны и слизистую оболочку. Они способны оказывать местное, а иногда и общее воздействие на организм. Преимуществом мазей для местного применения перед лекарственными препаратами системного действия являются: отсутствие дезактивации в желудочно-кишечном тракте, пролонгированность действия, возможность введения в мазь нескольких действующих веществ, а также быстрое прекращение эффекта при возникновении аллергических и других побочных реакций.

В качестве мазевых основ используются полисахаридные гелевые основы, а также смеси полиэтиленоксидов, гидрогенизированные жиры и ряд других. Гидрогель на основе глицеролатов

кремния (кремнийсодержащий глицерогидрогель) [5] является перспективной мазевой основой для средств местного применения. За счет наличия эссенциального микроэлемента кремния в биологически доступной форме гель обладает выраженной ранозаживляющей, регенерирующей и транскутанной активностью. Транскутанная активность геля позволяет использовать меньшие количества лекарственных добавок, а также усилить эффективность их действия. На основе кремнийсодержащего глицерогидрогеля был разработан ряд средств для местного лечения воспалительных заболеваний различной этиологии [6].

Учитывая актуальность использования кремнийсодержащего глицерогидрогеля в качестве мазевой основы для средств местного применения, авторы предложили новую фармацевтическую композицию для лечения гнойно-воспалительных ран, содержащую в качестве активных компонентов ципрофлоксацин и окситоцин [7]. Первичная фармакологическая оценка на экспериментальных животных показала, что фармацевтическая композиция нетоксична, обладает ранозаживляющей и регенерирующей активностью, предотвращает возникновение гнойно-септических осложнений и перспективна для дальнейшего изучения с целью внедрения в медицинскую практику.

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – разработка и валидация методик количественного определения ципрофлоксацина и окситоцина в фармацевтической композиции для лечения гнойно-воспалительных ран.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для приготовления композиции в качестве активных лекарственных веществ использовали субстанцию (порошок) ципрофлоксацина (в форме гидрохлорида) и раствор окситоцина (10^{-3} масс.%, стабилизированный, ОАО «Гедеон Рихтер»); в качестве основы – кремнийсодержащий глицерогидрогель формального состава $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4 \cdot 6\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ [4]. Содержание ципрофлоксацина в композиции – 0,2 масс.%, окситоцина – $7,4 \cdot 10^{-4}$ масс.%; кремнийсодержащий глицерогидрогель – остальное.

Для количественного определения ципрофлоксацина в разрабатываемой фармацевтической композиции использовали метод ультрафиолетовой (УФ) спектроскопии, для определения окситоцина – метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Методика количественного определения ципрофлоксацина. Предложена методика коли-

чественного определения ципрофлоксацина в композиции, основанная на его исчерпывающей водной экстракции с последующим анализом методом УФ-спектроскопии. Для этого 2 г (точная навеска) мази ресуспендировали в 20 мл дистиллированной воды, перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин, затем центрифугировали в течение 5 мин при скорости вращения 3000 об/мин. После центрифугирования надосадочную жидкость декантировали в мерную колбу вместимостью 50 мл.

Процедуру повторяли дважды, используя по 15 мл дистиллированной воды. Объем водного извлеченного доводили до метки (50 мл) дистиллированной водой, после чего 1 мл раствора помещали в мерную колбу вместимостью 20 мл и доводили объем до метки дистиллированной водой. Концентрацию ципрофлоксацина в растворе определяли из калибровочного графика, для построения которого предварительно готовили калибровочные растворы и регистрировали их спектры. Калибровку проводили по полосе поглощения 274 нм. УФ-спектры записаны на УФ-спектрометре UV-2401 PC («Shimadzu», Япония) в области 400–190 нм.

Содержание ципрофлоксацина в фармацевтической композиции (X , масс.%) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{M \times V_{\text{МК1}} \times V_{\text{МК2}} \times C \times 100}{V_{\text{ал}} \times a},$$

где M – молярная масса ципрофлоксацина гидрохлорида, 367,80 г/моль; $V_{\text{МК1}}$ – объем мерной колбы 1, л; $V_{\text{МК2}}$ – объем мерной колбы 2, л; C – концентрация ципрофлоксацина в водном извлечении, моль/л; $V_{\text{ал}}$ – объем аликвоты, л; a – навеска фармацевтической композиции, г.

Методика количественного определения окситоцина. Для количественного определения окситоцина была предложена методика, основанная на его исчерпывающей водной экстракции с последующим анализом методом ВЭЖХ. Для этого 5 г (точная навеска) композиции ресуспендировали в 3 мл дистиллированной воды, перемешивали на магнитной мешалке в течение 30 мин, затем центрифугировали в течение 5 мин при скорости вращения 3000 об/мин. После центрифугирования надосадочную жидкость декантировали в мерную колбу вместимостью 10 мл.

Процедуру повторяли дважды, используя при этом по 1 мл дистиллированной воды. Объем водного извлеченного доводили до метки (10 мл) дистиллированной водой. Концентрацию окситоцина

в растворе определяли из калибровочного графика, для построения которого предварительно готовили калибровочные растворы и регистрировали их спектры. Калибровку проводили по полосе поглощения 220 нм. Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на хроматографе Agilent 1100 (США), колонка – «Kromasil 100-5 C18», детектор диодно-матричный, длина волны – 220 нм, элюент – смесь ацетонитрил/уксусная кислота, скорость потока – 0,8 мл/мин.

Содержание окситоцина в разрабатываемой фармацевтической композиции (Y , масс.%) вычисляли по формуле:

$$Y = \frac{M \times V \times C \times 100}{a}$$

где M – молярная масса окситоцина, 1007,2 г/моль; V – объем мерной колбы, л; C – концентрация окситоцина в водном извлечении, моль/л; a – навеска фармацевтической композиции, г.

Расчет метрологических характеристик и валидационную оценку методик количественного определения ципрофлоксацина и окситоцина проводили в соответствии с [8] на трёх образцах модельных систем в пяти параллельных определениях (для каждой методики). Для валидации методик готовили модельные системы (№№ 1–3), содержащие 80, 100 и 120% определяемого компонента – ципрофлоксацина в фармацевтической композиции (аналитическая область определения), и модельные системы (№№ 4–6), содержащие 80, 100 и 120% определяемого компонента – окситоцина в фармацевтической композиции (аналитическая область определения), а также две смеси «плацебо», не содержащие ципрофлоксацина в одном случае (смесь плацебо № 1) и окситоцина – в другом (смесь плацебо № 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что методы УФ-спектроскопии и ВЭЖХ широко используются для стандартизации различных лекарственных средств [8], включая ципрофлоксацин (УФ-спектроскопия) [9] и окситоцин (ВЭЖХ) [10]. В данной работе пред-

ложены методики количественного определения ципрофлоксацина и окситоцина с использованием известных методов (УФ-спектроскопия и ВЭЖХ). Методики были адаптированы к новой лекарственной форме, содержащей одновременно ципрофлоксацин и окситоцин, при этом предложенные методики просты в исполнении, доступны, не требуют дорогостоящих реактивов и позволяют получать результаты с необходимой точностью.

Валидационную оценку каждой методики проводили по следующим показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность [11–13].

Специфичность определяли на примере смесей «плацебо» по методикам, описанным выше. В случае смеси плацебо № 1 при определении методом УФ-спектроскопии в спектре отсутствовала полоса поглощения в области 274 нм; в случае смеси плацебо № 2 при определении методом ВЭЖХ отсутствовало поглощение в области 220 нм. Таким образом, полученные результаты подтверждают специфичность методик определения ципрофлоксацина и окситоцина в фармацевтической композиции.

Установлено, что в пределах аналитической области методик (80–120%): 0,16–0,24 масс.% ципрофлоксацина и $(5,92–8,88) \cdot 10^{-4}$ масс.% окситоцина – наблюдается линейная зависимость определяемых величин, которая соответствует уравнениям $y = 0,002x - 0,001$ для ципрофлоксацина и $y = 9 \cdot 10^{-6}x - 0,0002$ для окситоцина. При этом расчетная величина коэффициента корреляции r отвечает условию $|r| \geq 0,99$, доверительные интервалы лежат в пределах 3% относительно значения определяемых величин.

Для оценки правильности анализировали модельные системы №№ 1–6. Валидируемые методики могут быть признаны правильными, поскольку определяемые экспериментально значения лежат внутри доверительных интервалов, соответствующих средним результатам анализа. Рассчитанные значения $t_{\text{выч.}}$ оказались меньше табличного ($t_{\text{табл.}} = 2,78$ при $p = 95\%$, $f = 12$), что позволяет с вероятностью 95% сделать вывод об отсутствии значимой систематической ошибки (см. табл. 1, 2).

Таблица 1. Метрологические характеристики методики количественного определения ципрофлоксацина методом УФ-спектроскопии

μ	f	x	s^2	s	p	$t(p,f)$	Δx	ε
0,2000	12	0,1999	$6,25 \cdot 10^{-8}$	$2,53 \cdot 10^{-4}$	95%	2,78	$7,33 \cdot 10^{-4}$	0,38

Таблица 2. Метрологические характеристики методики количественного определения окситоцина методом ВЭЖХ

μ	f	x	s^2	s	p	$t(p,f)$	Δx	ε
$7,4 \cdot 10^{-4}$	12	$7,23 \cdot 10^{-4}$	$7,09 \cdot 10^{-11}$	$8,42 \cdot 10^{-6}$	95%	2,78	$2,34 \cdot 10^{-5}$	4,66

Прецизионность также оценивали на модельных системах №№ 1–6 по величине стандартного отклонения результата отдельного определения и относительной ошибки результата отдельного определения. Установлено, что относительная ошибка результата отдельного определения не превышает 0,44% (ципрофлоксацин, метод УФ-спектроскопии) и 4,66% (окситоцин, метод ВЭЖХ) от истинного значения измеряемой величины. Предел обнаружения цiproфлоксацина составляет $7,6 \cdot 10^{-4}$, окситоцина – $3,6 \cdot 10^{-5}$ %.

ВЫВОДЫ

1. Предложены методики количественного определения цiproфлоксацина (метод УФ-спектроскопии) и окситоцина (метод ВЭЖХ) в новой фармацевтической композиции для местного лечения гнойно-воспалительных ран.
2. Определены основные валидационные характеристики, которые подтверждают обоснованность методик количественного определения цiproфлоксацина и окситоцина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комплексной программы УрО РАН (проект № 13-43-018 УМА).

ЛИТЕРАТУРА

1. Тарасенко В.С., Фадеев С.Б., Бухарин О.В. Хирургическая инфекция мягких тканей (клинико-микробиологический аспект). Екатеринбург: УрО РАН. 2015. 180 с.
2. Goessens W.H. Basic mechanisms of bacterial tolerance of antimicrobial agents // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1993. V. 12. № 1. P. 9–12.

3. Леценко И.Г. Галкин Р.А. Гнойная хирургическая инфекция. Самара: Перспектива. 2003. 326 с.
4. Козлов Р., Голуб А. Перспективы использования современных фторхинолонов при хирургических инфекциях кожи и мягких тканей, инфекциях суставов // Врач. 2012. № 12. С. 30–33.
5. Хонина Т.Г., Чупахин О.Н., Ларионов Л.П. и др. Синтез, токсичность и трансдермальная проницаемость глицератов кремния и гидрогелей на их основе // Химико-фармацевтический журнал. 2008. № 11. С. 5–9.
6. Патент № 2326667 (РФ). Средство для лечения гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей различной этиологии / В.Н. Чарушин, Т.Г. Хонина, О.Н. Чупахин и др. 2008.
7. Патент № 2466720 (РФ). Способ лечения гнойных ран в эксперименте / О.В. Бухарин, В.Н. Чарушин, О.Н. Чупахин и др. 2012.
8. Государственная фармакопея Российской Федерации. Изд. XII. Ч. 2. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 2010.
9. Сливкин А.И., Карлов П.М., Сиблива Л.Е. Выделение и анализ фторхинолонов в субстанциях, лекарственных формах и биожидкостях с использованием хроматографии и спектрофотометрии // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. № 2. С. 288–295.
10. Ковалева С.В., Исаева И.В., Лугцева А.И. и др. Проблемы стандартизации гормональных препаратов белково-пептидной природы // Российский химический журнал. 2005. Т. XLIX. № 1. С. 135–145.
11. ГОСТ Р ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. М.: Изд-во стандартов. 2002.
12. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под ред. В.В. Береговых. М.: Литтерра. 2008. 132 с.
13. Huber L. Validation of analytical Methods: Review and Strategy, LC-GC 1997-1, Version February 21 // Biopharm. 1999. V. 12. № 1. P. 64–66.

Поступила после доработки 24 октября 2016 г.

TECHNIQUES OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF CIPROFLOXACIN AND OXYTOCIN IN THE NOVEL PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF PURULENT AND INFLAMMATORY WOUNDS AND THEIR VALIDATION

© Authors, 2017

A.A. Tumashov

Ph.D. (Chem.), Associate Professor, Department of Organic Chemistry, Institute of Natural Sciences, Ural Federal University; Senior Research Scientist, Laboratory of Asymmetric Synthesis, I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis of Ural Branch of RAS (Ekaterinburg)

M.V. Ivanenko

Ph.D. (Chem.), Research Scientist, Laboratory of Organic Materials,
I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis of Ural Branch of RAS (Ekaterinburg)
E-mail: mariav.ivanenko@gmail.com

I.N. Shtan'ko

Ph.D. (Pharm.), Junior Research Scientist, Laboratory of Organic Materials,
I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis of Ural Branch of RAS (Ekaterinburg)

T.G. Khonina

Dr.Sc. (Chem.), Leading Research Scientist, Laboratory of Organic Materials,
I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis of Ural Branch of RAS (Ekaterinburg)

N.B. Perunova

Dr.Sc. (Med.), Head of Laboratory of Biomonitoring and Molecular Genetic Studies,
Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis of Ural Branch of RAS (Orenburg)

We have previously proposed the medicine for local treatment of suppurating wounds in the form of pharmaceutical composition, containing oxytocin and ciprofloxacin as the active drugs and silicon-containing glycerohydrogel $\text{Si}(\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_3)_4 \cdot 6\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ as the base. It was shown that the medicine is non-toxic, it possesses wound-healing and regenerative activity, and it prevents the occurrence of septic complications.

In this work the techniques of quantitative determination of active components of the medicine (ciprofloxacin and oxytocin), based on their exhaustive extraction by water (in the case of ciprofloxacin) and by a mixture of glacial acetic acid and 96% ethyl alcohol (in the case of oxytocin) were developed. UV spectroscopy was proposed for quantitative determination of ciprofloxacin in the medicine, HPLC – for oxytocin. Methods were adapted to the new dosage form containing both ciprofloxacin and oxytocin.

Calculation of the metrological characteristics and validation of the procedures were carried out for three samples of model systems in five parallel determinations (for each procedure) in terms of such parameters as specificity, analytical region, linearity, accuracy and precision. Calculations and validation were also performed on two «placebo» mixtures that did not contain ciprofloxacin, in one case, and oxytocin, in another.

The determined validation characteristics confirm the validity of techniques for quantitative determination of ciprofloxacin and oxytocin. The techniques may be recommended for inclusion in the normative and technical documentation for the standardization and possible implementation of the medicine in medicinal practice.

Key words: ciprofloxacin, oxytocin, pharmaceutical composition, quantitative determination, ultraviolet spectroscopy, high performance liquid chromatography, validation.

References

1. Tarasenko V.S., Fadeev S.B., Buharin O.V. Hirurgicheskaja infekcija mjagkih tkanej (kliniko-mikrobiologicheskij aspekt). Ekaterinburg: UrO RAN. 2015. 180 s.
2. Goessens W.H. Basic mechanisms of bacterial tolerance of antimicrobial agents // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1993. V. 12. № 1. P. 9–12.
3. Leshhenko I.G. Galkin R.A. Gnojnaja hirurgicheskaja infekcija. Samara: Perspektiva. 2003. 326 s.
4. Kozlov R., Golub A. Prospects for the use of modern fluoroquinolones in surgical skin and soft tissue infections, and bone and joint infections // Vrach. 2012. № 12. S. 30–33.
5. Honina T.G., Chupahin O.N., Larionov L.P. i dr. Sintez, toksichnost' i transdermal'naja pronicaemost' gliceratov kremnija i gidrogelej na ih osnove // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2008. № 11. S. 5–9.
6. Patent № 2326667 (RF). Sredstvo dlja lechenija gnojno-vospalitel'nyh zabojevanij kozhi i mjagkih tkanej razlichnoj jetiologii / V.N. Charushin, T.G. Honina, O.N. Chupahin i dr. 2008.
7. Patent № 2466720 (RF). Sposob lechenija gnojnyh ran v jeksperimente / O.V. Buharin, V.N. Charushin, O.N. Chupahin i dr. 2012.
8. Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. Izd. XII. Ch. 2. M.: Nauchnyj centr jekspertizy sredstv medicinskogo primenenija. 2010.
9. Slivkin A.I., Karlov P.M., Siplivaja L.E. Vydelenie i analiz ftorhinolonov v substancijah, lekarstvennyh formah i biozhidkostjah s ispol'zovaniem hromatografii i spektrofotometrii // Sorbcionnye i hromatograficheskie processy. 2009. T. 9. № 2. S. 288–295.
10. Kovaleva S.V., Isaeva I.V., Lugceva A.I. i dr. Problemy standartizacii gormonal'nyh preparatov belkovo-pep-tidnoj prirody // Rossijskij himicheskij zhurnal. 2005. T. XLIX. № 1. S. 135–145.
11. GOST R ISO 5725-2002. Tochnost' (pravil'nost' i precizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenij. M.: Izd-vo standartov. 2002.
12. Validacija analiticheskikh metodov dlja proizvoditelej lekarstv: tipovoe rukovodstvo predpriyatija po proizvodstvu lekarstvennyh sredstv / Pod red. V.V. Beregovyh. M.: Litterra. 2008. 132 s.
13. Huber L. Validation of analytical Methods: Review and Strategy, LC-GC 1997-1, Version February 21 // Biopharm. 1999. V. 12. № 1. P. 64–66.