УДК 615.454.1

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАЛАВИТА В МЯГКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ НА ГИДРОФИЛЬНОЙ КРЕМНИЙСОДЕРЖАЩЕЙ ОСНОВЕ

Штанько И.Н., Хонина Т.Г.

ФГБУН «Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН», Екатеринбург, e-mail: intosova@gmail.com

Нами предложена новая мягкая лекарственная форма иммунотропного препарата галавита, в виде мази на гидрофильной кремнийсодержащей основе. Предложенное средство перспективно для внедрения в медицинскую в частности стоматологическую практику, в качестве средства для лечения воспалительных заболеваний полости рта. Необходимым условием внедрения нового лекарственного средства в медицинскую практику является его стандартизация, предусматривающая разработку нормативно-технической документации. Целью настоящей работы являлась разработка и валидация методики количественного анализа галавита в мази на гидрофильной кремнийсодержащей основе. Количественное содержание галавита определяли с помощью УФ спектроскопии. На примере модельных смесей проведена валидация методики количественного определения галавита в разрабатываемом средстве. Методика может быть рекомендована для включения в нормативно-техническую документацию на разрабатываемое средство.

Ключевые слова: галавит, кремнийсодержащий глицерогидрогель, исчерпывающая водная экстракция, УФ спектроскопия, валидация

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF GALAVIT IN AN OINTMENT BASED ON THE SILICON-CONTAINING HYDROGEL

Shtanko I.N., Khonina T.G.

Postovsky Institute of Organic Synthesis, Russian Academy of Sciences (Ural Branch), Ekaterinburg, e-mail: intosova@gmail.com

We suggested a new form of the immunotropic agent galavit as an ointment based on the silicon-containing hydrogel. The proposed ointment is promising for the introduction into medical practice, in particular dental practice as agent for the treatment of inflammatory diseases of the oral cavity. Standardization of a new pharmaceutical agent is the necessary condition for its introduction in clinical practice. This process includes the development of regulatory and technical documentation. The purpose of this work was to develop and validate the procedure for galavit quantitative analysis in an ointment based on the silicon-containing hydrogel. Quantitative content of galavit was determined by UV spectroscopy. Validation of the procedure for galavit quantitative determination was carried out using the model mixtures. The procedure can be recommended for inclusion in regulatory and technical documentation for a new dosage form of galavit.

Keywords: galavit, silicon–glycerol hydrogels, the exhaustive water extraction, UV spectroscopy, validation

В настоящее время в мировой медицинской практике применяется значительное количество мягких лекарственных форм в качестве средств для местного лечения и профилактики заболеваний кожи, мягких тканей и слизистых оболочек различной этиологии. Одним из перспективных направлений в разработке новых лекарственных средств для местного применения, в частности в стоматологии, является использование иммунотропных препаратов, что обосновано быстро формирующейся резистентностью организма к антибактериальным средствам, снижением иммунологической реактивности населения, наличием маскирующих форм иммунопатологии, обусловливающих прогрессирование патологии и терапевтическую толерантность; при этом отмечается, что местное использование иммунотропных средств часто является более эффективным, чем системное введение, когда возможны выраженные побочные эффекты.

В Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН разработаны фармакологически активные кремнийсодержащие глицерогидрогели [5, 8], проявляющие выраженную противовоспалительную, ранозаживляющую и регенерирующую активность. Они могут быть использованы как самостоятельные лекарственные средства для местного применения, так и в качестве мазевых основ.

В настоящее время кремнийсодержащий глицерогидрогель формального состава $Si(C_3H_7O_3)_4 \cdot 6C_3H_8O_3 \cdot 24H_2O$ (препарат «Силативит») проходит клинические испытания в качестве средства для местного лечения воспалительных стоматологических заболеваний [3]. С целью внедрения данного средства в медицинскую практику был составлен полный пакет нормативно-технической документации на субстанцию и препарат «Силативит», включая Фармакопейную статью предприятия; разработана

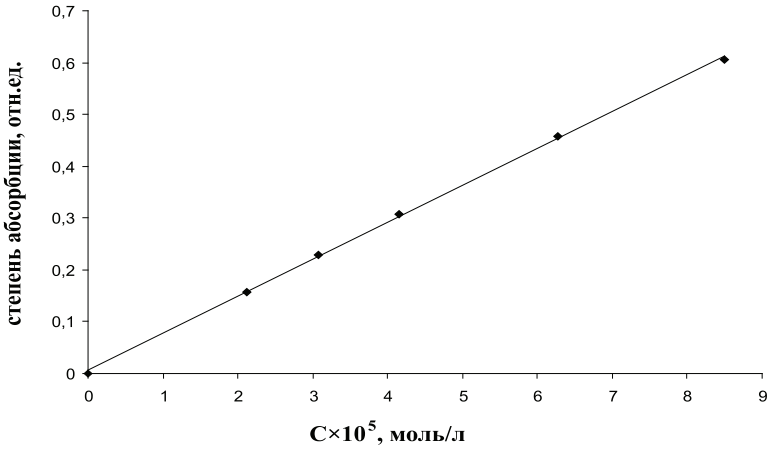
и валидирована методика количественного определения кремния в геле [9].

Учитывая актуальность использования иммунотропных средств для местного применения, нами было предложено и запатентовано новое лекарственное средство для лечения воспалительных заболеваний полости рта с использованием в качестве активного компонента галавита (0,7 мас. %) и в качестве мазевой основы – субстанции препарата «Силативит» [10]. В эксперименте на лабораторных животных была показана безопасность его применения и высокая фармакологическая активность (противовоспалительная, ранозаживляющая и регенерирующая активность) [7].

Целью настоящей работы являлась разработка методики количественного определения галавита в мази на гидрофильной кремнийсодержащей основе и определение ее валидационных характеристик.

Экспериментальная часть

Содержание галавита в разрабатываемом средстве определяли методом УФ спектроскопии на спектрофотометре фирмы Shimadzu: UV-2401 PC (Япония) в области 400–190 нм. Предварительно готовили калибровочные растворы (водные растворы субстанции галавита), регистрировали их спектры и строили калибровочную кривую (рисунок). Калибровку проводили по полосе поглощения 297 нм, характерной для субстанции галавита.



Калибровочный график зависимости степени абсорбции от концентрации галавита (C) в исследуемом растворе

Методика количественного определения галавита основана на его исчерпывающей водной экстракции из разрабатываемого средства. 2 г (точная навеска) разрабатываемого средства растворяют в 50 мл дистиллированной воды и перемешивают на магнитной мешалке в течение 1 часа. Затем полученную водную суспензию оставляют для осаждения на сутки. После отстаивания 1 мл надосадочного раствора помещают в мерную колбу на 50 мл и доводят объем водой до метки. Концентрацию галавита в надосадочной жидкости определяют из калибровочного графика (рисунок). Содержание галавита в разрабатываемом средстве в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X(\%) = \frac{M \cdot V_{мк1} \cdot V_{мк2} \cdot C \cdot 100}{V_{ал} \cdot a},$$

где M – молярная масса галавита, г/моль; $V_{мк1}$ – объем мерной колбы 1, л; $V_{мк2}$ – объем мерной колбы 2, л; C – концентрация галавита в водном извлечении, моль/л; $V_{ал}$ – объем аликвоты, л; a – навеска мягкой лекарственной формы, г.

Для валидации методики готовили модельные смеси (№ 1–3), состоящие из субстанции галавита и кремнийсодержащего глицерогидрогеля, содержащие соответственно 80, 100 и 120 % определяемого компонента (аналитическая область определения), по отношению к их содержанию в разрабатываемом средстве, а также «плацебо», не содержащую субстанцию галавита.

Расчет метрологических характеристик и валидационную оценку методики количественного определения галавита проводили на пяти образцах каждой модельной смеси по показателям: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность [1, 2, 4, 6, 11].

В табл. 1 приведены данные количественного определения галавита в модельных смесях (№ 1–3). Для каждой модельной смеси было проведено по 5 параллельных определений.

Результаты исследования и их обсуждение

В табл. 2 приведены данные статистической обработки результатов количественного определения галавита в модельных смесях.

Специфичность определяли на примере модельной смеси «плацебо» по методике, описанной выше. Во всех случаях отсутствовала полоса поглощения в области 297 нм, что подтверждает специфичность методики.

Таблица 1

Результаты количественного определения галавита в модельных смесях

Модельная смесь, №	Определяемый компонент, %	Заданное содержание галавита, мас. %	Фактическое содержание галавита, мас. %
1	80	0,56	0,55
			0,56
			0,56
			0,56
			0,57
2	100	0,70	0,68
			0,69
			0,69
			0,71
			0,72
3	120	0,84	0,82
			0,82
			0,83
			0,85
			0,85

Таблица 2

Данные статистической обработки результатов количественного определения галавита в модельных смесях

Метрологические характеристики	Модельная смесь, №		
	1	2	3
μ (истинное значение измеряемой величины), мас. %	0,56	0,70	0,84
$\bar{x}$ (среднее значение выборки), мас. %	0,56	0,69	0,83
s^2 (дисперсия)	0,0001	0,0001	0,0001
s (стандартное отклонение), мас. %	0,0071	0,0084	0,0055
$s_{\bar{x}}$ (стандартное отклонение среднего результата), мас. %	0,0002	0,0038	0,0025
$s_{\bar{x},\%}$ (относительное стандартное отклонение среднего результата (коэффициент вариации)	0,01	0,54	0,30
Δx (значение доверительного интервала результата отдельного определения), мас. %	± 0,02	± 0,02	± 0,02
$\Delta\bar{x}$ (значение доверительного интервала среднего результата определения), мас. %	± 0,01	± 0,01	± 0,01
ε (относительная ошибка результата отдельного определения), %	3,52	3,35	1,83
$\bar{\varepsilon}$ (относительная ошибка среднего результата определения), %	1,57	1,49	0,81
$t_{выч}$ (95 %, 4) вычисленное значение критерия Стьюдента	0,01	0,53	1,63

Установлено, что в пределах аналитической области определения галавита наблюдается линейная зависимость определяемой величины, при этом расчетная величина коэффициента корреляции r отвечает условию $|r| \geq 0{,}99$, и доверительные интервалы лежат в пределах 2 % относительно значения определяемой величины.

Для оценки правильности анализировали модельные смеси № 1–3, содержащие соответственно 80, 100 и 120 % определяемого компонента (галавита). Валидируемая методика может быть признана правильной, поскольку определяемые экспериментально значения лежат внутри доверительных интервалов, соответствующих средним результатам анализа. Рассчитанные значения $t_{выч}$ оказались меньше табличного ($t_{табл} = 2{,}36$ при $P = 95\,\%$, $f = 8$), что позволяет с вероятностью 95 % сделать вывод об отсутствии значимой систематической ошибки.

Прецизионность оценивали на модельных смесях № 1–3 по величине стандартного отклонения результата отдельного определения и относительной ошибки результата отдельного определения. Установлено, что относительная ошибка не

превышает 2,28% от истинного значения измеряемой величины.

Метрологические характеристики методики количественного определения галавита в разрабатываемом средстве приведены в табл. 3.

Выводы

Разработана методика количественного определения галавита в мази на гидрофильной кремнийсодержащей основе методом УФ спектроскопии. Обоснованность методики подтверждена результатами определения таких валидационных характеристик как специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность. Разработанная методика может быть рекомендована для включения в нормативно-техническую документацию для контроля качества разрабатываемого средства.

Таблица 3

Метрологические характеристики методики количественного определения галавита в разрабатываемом средстве

μ	f	$\overline{x}$	s^2	s	P	$t(P, f)$	Δx	ε
0,70	8	0,69	0,0001	0,0070	95	2,36	0,02	2,28

Список литературы

1. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / под ред. В.В. Береговых. – М.: «Литтерра», 2008. – 132 с.
2. Государственная фармакопея РФ XII: В 2 ч. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2010. Ч. 2. – 600 с.
3. Оценка безопасности и переносимости препарата «Силативит» при применении у добровольцев / Н.Д. Чернышева, А.С. Назукин, Т.Г. Хонина, И.Н. Тосова // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 4 (37). – С. 121–123.
4. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности (методические рекомендации) / под ред. Н.В. Юргеля. – М.: Спорт и культура-2000, 2007. – 192 с.
5. Синтез, токсичность и трансдермальная проницаемость глицератов кремния и гидрогелей на их основе / Т.Г. Хонина, О.Н. Чупахин, Л.П. Ларионов, Т.Г. Бояковская, А.Л. Суворов, Е.В Шадрина // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – № 11. – С. 5–9.
6. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Н.В. Денисенко, Ю.В. Подпружников // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 1–15.
7. Тосова И.Н. Новое иммунотропное средство для местного применения / И.Н. Тосова, Т.Г. Хонина // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 3 (1). – С. 49.
8. Хонина Т.Г., Ларионов Л.П., Русинов Г.Л., Суворов А.Л., Чупахин О.Н. Глицераты кремния, обладающие трансдермальной проводимостью медикаментозных средств, и глицерогидрогели на их основе // Патент России № 2255939. 2005. Бюл. № 19.
9. Хонина Т.Г. Фармакологически активные полиолаты кремния и титана и гидрогели на их основе: синтез, свойства, применение: дис. … д-ра хим. наук. – Казань. – 2012. – 303 с.
10. Чупахин О.Н., Симбирцев А.С., Тузанкина И.А., Хонина Т.Г., Тосова И.Н., Ларионов Л.П., Ронь Г.И., Саркисян Н.Г., Чернышева Н.Д. Средство для лечения воспалительных заболеваний полости рта и способ лечения воспалительных заболеваний полости рта // Патент России № 2470640. 2012. Бюл. № 36.
11. Huber L. Validation of analytical Methods: Review and Strategy, LC-GC 1997-1, Version February 21 // Biopharm. – 1999. – Vol. 12. No. 1. – P. 64–66.

References

1. Beregovykh V.V., ed. *Validatsiia analiticheskikh metodik dlia proizvoditelei lekarstv: tipovoe rukovodstvo predpriiatiia po proizvodstvu lekarstvennykh sredstv* [Validation of analytical methods for drug manufacturers: Typical manual for company producing pharmaceuticals]. Moscow, Litterra Publ., 2008. 132 p.
2. *Gosudarstvennaia farmakopeia RF XII, Ch. 2* [Russian Pharmacopoeia XII, part 2]. Moscow, Scientific Center for Expertise of Medical Products Publ., 2010. 600 p.
3. Chernysheva N.D., Nazukin A.S., Khonina T.G., Tosova I.N. *Vestnik uralskoi meditsinskoi akademicheskoi nauki* – Bulletin of Ural Medical Academic Science, 2011, no. 4 (37), pp. 121–123.
4. Iurgel N.V., ed. *Rukovodstvo dlia predpriiatii farmatsevticheskoi promyshlennosti (metodicheskie rekomendatsii)* [Guidelines for the pharmaceutical industry (methodical recommendations)]. Moscow, Sports and Culture – 2000, Publ., 2007. 192 p.
5. Khonina T.G., Chupakhin O.N., Larionov L.P., Boyakovskaya T.G., Suvorov A.L., Shadrina E.V. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal* – Pharmaceutical Chemistry Journal, 2008, no. 11, pp. 5–9.
6. Grizodub A.I., Leontev D.A., Denisenko N.V., Podpruzhnikov Iu.V. *Farmakom* – Farmacom, 2004, no. 3, pp. 1–15.
7. Tosova I.N., Khonina T.G. *Vestnik ural'skoi meditsinskoi akademicheskoi nauki* – Bulletin of Ural Medical Academic Science, 2011, no. 3 (1), pp. 49.
8. Khonina T.G., Larionov L.P., Rusinov G.L., Suvorov A.L., Chupakhin O.N. Glitseraty kremniia, obladaiushchie transkutannoi provodimostiu medikamentoznykh sredstv, i glitserogidrogeli na ikh osnove [Silicon glycerates eliciting transcutaneous conductivity of medicinal agents and glycerohydrogels based on thereof]. Patent RF, no. 2255939, 2005. Bull. no. 19.
9. Khonina T.G. *Farmakologicheski aktivnye poliolaty kremniia i titana i gidrogeli na ikh osnove: sintez, svoistva, primenenie.* Diss. dokt. khim. nauk [Pharmacologically active polyolates silicon and titanium, and hydrogels based on them: synthesis, properties and application. Dr. chem. sci. diss.]. Kazan, 2012. 303 p.
10. Chupakhin O.N., Simbirtsev A.S., Tuzankina I.A., Khonina T.G., Tosova I.N., Larionov L.P., Ron' G.I., Sarkisian N.G., Chernysheva N.D. *Sredstvo dlia lecheniia vospalitel'nykh zabolevanii polosti rta i sposob lecheniia vospalitel'nykh zabolevanii polosti rta* [Agent for treating inflammatory oral diseases and method of treating inflammatory oral diseases] Patent RF, no. 2470640, 2012. Bull. no. 36.
11. Huber L. *Biopharm*, 1999, vol. 12, no. 1, pp. 64–66.

Рецензенты:

Петров А.Ю., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой фармации фармацевтического факультета, ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург;

Левит Г.Л., д.х.н., ведущий научный сотрудник, ФГБУН Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, г. Екатеринбург.

Работа поступила в редакцию 08.11.2013.