УДК 615.9:616-7

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИМАНТАНА В ГЕЛЕ ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

М.Е. Дуденкова, М.С. Сергеева, Л.Н. Грушевская, Л.М. Гаевая, Е.Д. Денисенко, В.Б. Маркеев, С.В. Минаев

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Настоящее исследование посвящено разработке и валидации методики количественного определения гимантана в лекарственной форме для местного применения (геле) методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Этот метод является одним из наиболее используемых для анализа лекарственных препаратов из ряда производных адамантана, обладающих достаточно высокой летучестью и устойчивостью к воздействию повышенных температур.

Ключевые слова: гимантан, валидация, количественное определение, газожидкостная хроматография, гель.

DOI 10.19163/1994-9480-2019-4(72)-81-84

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE TECHNIQUE FOR ASSAY OF GIMANTAN IN A GEL FOR TOPICAL APPLICATION

M.E. Dudenkova, M.S. Sergeeva, L.N. Grushevskaja, L.M. Gaevaja, E.D. Denisenko, V.B. Markeev, S.V. Minaev

FSBSI «Research Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusov»

The present research is dedicated to development and validation of technique for assay of gimantan in a dosage form for topical application – gel of a gimantan by method of gas-liquid chromatography (GLC). This method is one of the most perspective medicines for the analysis of a number of derivatives of an adamantan, due to their sufficiently high volatility and resistance to high temperatures.

Key words: gimantan, validation, assay, gas-liquid chromatography, gel.

Гимантан – оригинальное соединение, синтезированное в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» и по химическому строению представляющее собой N(2-адамантил)гексаметиленимина гидрохлорид. В результате доклинических исследований было показано, что помимо того, что гимантан обладает противопаркинсонической активностью [2–6], он также проявляет и выраженную противовоспалительную активность как на модели экспериментального нейровоспаления, так и на модели периферического воспаления и оказывает противоболевое действие [3, 9, 12]. Основываясь на этих данных в лаборатории готовых лекарственных форм ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» была разработана наружная лекарственная форма – гель гимантана 5 % [1, 3, 9] для применения в качестве противовоспалительного средства.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка и валидация методики количественного определения гимантана в геле для местного применения в рамках фармацевтической разработки нового лекарственного препарата.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Ранее в химико-технологической лаборатории ФГБНУ «Фармакологии имени В.В. Закусова» проводились исследования по изучению физико-химических свойств субстанции гимантана и его лекарственной формы – раствора для инъекций. В результате этих исследований была разработана методика количественного определения гимантана в растворе методом ГЖХ [10, 11]. Данная методика была принята нами за основу и адаптирована для современных лабораторных условий и приборного оснащения.

В качестве объектов исследования использовались серийные образцы субстанции гимантана гидрохлорида и основания гимантана (синтезированы в группе технологии синтеза лекарственных средств опытно-технологического отдела ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова») и серийные образцы геля гимантана с содержанием действующего вещества 5 %, а также образец плацебо в виде геля (предоставлены лабораторией готовых лекарственных форм опытно-технологического отдела ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»).

Изучение хроматографической подвижности гимантана с помощью метода ГЖХ осуществлялось на газовом хроматографе Varian 450-GC с пламенно-ионизационным детектором и автосамплером Varian PAL Autosampler методом прямого вкола. Хроматографирование проводили в следующих условиях: капиллярная колонка VF-17ms, 30 м х 0,25 мм, 0,5 мкм (Agilent); скорость потока газа носителя (азота) 2,0 мл/мин; скорость потока водорода 30 мл/мин; скорость потока воздуха 300 мл/мин; температура инжектора 225 °С; температура детектора 240 °С; температура термостата в градиентном

режиме (табл. 1); объем пробы 1 мкл; растворитель для проб – смесь диэтилового эфира и этанола (1:9); время анализа 11 минут. Рабочая концентрация испытуемого раствора гимантана 0,125 мг/мл.

Таблица 1

Хроматографический режим

Время (мин)	Температура, °С	Скорость подъема температуры (°С/мин)
0–6	180	–
6–7	215	35
7–11	215	–

Для расчета содержания гимантана в пробах применен метод внутреннего стандарта, в качестве которого был использован 1-адамантилэтанол (Aldrich 188115).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основной задачей, которую было необходимо решить для успешной разработки методики, являлся способ подготовки проб испытуемых растворов. В результате проведенных исследований в качестве метода пробоподготовки нами была выбрана экстракция гимантана в виде основания из раствора геля диэтиловым эфиром при подщелачивании водной фазы 1М раствором натрия гидроксида.

Для этого 0,25 г (точная навеска) геля гимантана помещали в пробирку для центрифугирования, вместимостью 50 мл, добавляли 5,0 мл воды и 5,0 мл раствора 1М натрия гидроксида, и помещали в ультразвуковую баню на 10 минут при комнатной температуре. К полученному раствору добавляли 10 мл экстрагента, тщательно перемешивали и помещали пробирку в центрифугу.

Центрифугирование проводили при скорости вращения – 10000 об/мин и температуре – (+10 °С), время центрифугирования – 10 минут.

Далее пробу помещали в нормальные условия для повышения температуры экстракта до 20 °С.

Затем отбирали 1 мл эфирного экстракта и помещали в мерную колбу на 10 мл, прибавляли 1 мл внутреннего стандарта, доводили объем раствора до метки спиртом этиловым и перемешивали (испытуемый раствор с концентрацией гимантана и внутреннего стандарта 1-адамантилэтанола по 0,125 мг/мл каждого соединения).

Экспериментально, с применением рабочего стандартного образца основания гимантана, было показано, что полнота экстракции гимантана в выбранных условиях составляет около 90 %, поэтому для устранения связанной с этим систематической ошибки содержание гимантана в геле оценивали относительно раствора рабочего стандартного образца (РСО) гимантана, подготовку пробы которого проводили аналогичным образом.

Типичная хроматограмма основания гимантана и 1-адамантанэтанола, полученная в описанных выше условиях, представлена на рис. 1.

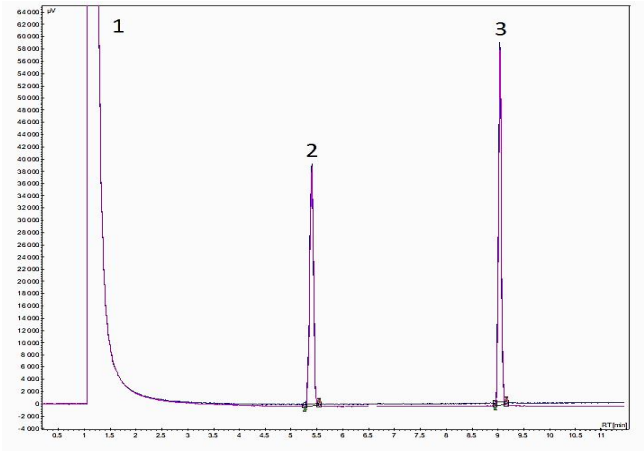

Рис. 1. Хроматограмма основания гимантана и его внутреннего стандарта (1-адамантанэтанола) в концентрации 0,125 мг/мл (*1* – растворитель; *2* – 1-адамантанэтанол; *3* – основание гимантана)

Валидацию разработанной методики количественного определения гимантана в лекарственной форме проводили по следующим параметрам: специфичность, предел обнаружения (ПО), предел количественного определения (ПКО), линейность, правильность, прецизионность и диапазон применения.

В выбранных условиях анализа время выхода растворителя составляет около 2,0 минут, время удерживания внутреннего стандарта 1-адамантанэтанола – около 5,4 минут, время выхода основного действующего вещества – около 8,97 минут.

На хроматограмме плацебо, приготовление пробы которого также провели описанным выше способом, иные пики, кроме пика растворителя, отсутствовали, методику можно охарактеризовать как специфичную.

Пределы обнаружения и количественного определения были установлены экспериментально по соотношению сигнал/шум и составляли 0,0008 мкг и 0,0025 мкг для 1-адамантанэтанола и 0,0004 мкг и 0,0012 мкг для основания гимантана соответственно.

Характеристики правильности, прецизионности, линейности и диапазона применения методики исследовались на пяти модельных растворах гимантана с концентрациями 80, 90, 100, 110, 120 % от содержания гимантана по отношению к номинальному значению ($X_{факт}$, %). Для каждого из пяти модельных растворов проводили экстракцию описанным выше способом, далее отбирали по три аликвоты экстракта, получая по три испытуемых раствора на каждую точку диапазона концентраций. Оценку содержания гимантана проводили относительно раствора РСО гимантана.

Хроматографировали испытуемые растворы и раствор РСО гимантана, получая не менее 5 хроматограмм каждого из растворов.

Так, экспериментально было подтверждено, что требования к параметрам линейной зависимости выполняются в диапазоне концентраций от 80 % до 120 % от номинального содержания гимантана в препарате. График линейной зависимости в нормализованных координатах представлен на рис. 2.

Результаты определения правильности и прецизионности методики количественного определения гимантана на модельных смесях представлены в табл. 2.

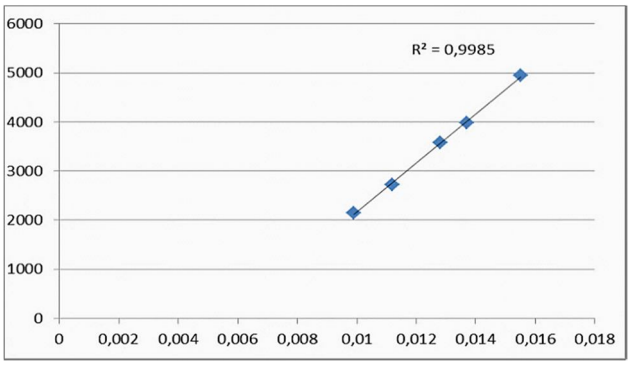

Рис. 2. Линейная зависимость площади пика от концентрации модельных растворов гимантана

Таблица 2

Результаты анализа модельных растворов гимантана и их статистическая обработка

Взято, мг (m_1)	Содержание в % от концентрации исп. раствора	Найдено, мг (m_2)	Найдено, %	Абсолютная ошибка (A), ($m_2 - m_1$)	Относительная ошибка (δ) $A \times 100/m_1$	Метрологические характеристики
0,0099	79,2	0,00999	79,91	0,00009	0,909091	$X_{ср}$ = 100,82 S = 1,82 RSD = 1,81 % ΔX = 2,25 ε = 2,24 % $t_{выч.}$ = 0,53 $t_{табл.}$ = 2,77
0,0095	76	0,0097	77,59	0,00020	2,105263	
0,01	80	0,0099	79,19	-0,00010	-1,00	
0,0098	78,4	0,0101	80,79	0,00030	3,061224	
0,0102	81,6	0,0101	80,79	-0,00010	-0,98039	
0,0112	88,06	0,01101	88,06	-0,00019	-1,69643	$X_{ср}$ = 99,65 S = 1,47 RSD = 1,47 % ΔX = 1,82 ε = 1,82 % $t_{выч.}$ = 0,95 $t_{табл.}$ = 2,77
0,0116	91,21	0,01142	91,34	-0,00018	-1,55172	
0,0109	85,70	0,01105	88,38	0,00015	1,376147	
0,0113	88,85	0,01142	91,34	0,00012	1,061947	
0,0115	90,42	0,01139	91,10	-0,00011	-0,95652	
0,0128	101,58	0,0127	101,59	-0,00010	-0,78125	$X_{ср}$ = 99,75 S = 1,28 RSD = 1,28 % ΔX = 1,59 ε = 1,59 % $t_{выч.}$ = 1,18 $t_{табл.}$ = 2,77
0,0125	99,19	0,01262	100,95	0,00012	0,96	
0,0128	101,58	0,01295	103,59	0,00015	1,171875	
0,0131	103,96	0,01286	102,87	-0,00024	-1,83206	
0,0127	100,79	0,0126	100,79	-0,00010	-0,7874	
0,0137	111,38	0,01392	111,38	0,00022	1,605839	$X_{ср}$ = 100,12 S = 1,22 RSD = 1,22 % ΔX = 1,51 ε = 1,51 % $t_{выч.}$ = 1,27 $t_{табл.}$ = 2,77
0,0139	113,01	0,01369	109,54	-0,00021	-1,51079	
0,0137	111,38	0,01371	109,70	0,00001	0,072993	
0,0142	115,45	0,01413	113,06	-0,00007	-0,49296	
0,0138	112,19	0,01393	111,46	0,00013	0,942029	
0,0155	125,46	0,01568	125,46	0,00018	1,16129	$X_{ср}$ = 100,19 S = 0,74 RSD = 0,73 % ΔX = 0,91 ε = 0,91 % $t_{выч.}$ = 1,86 $t_{табл.}$ = 2,77
0,0153	123,84	0,01539	123,14	0,00009	0,588235	
0,0148	119,79	0,01471	117,70	-0,00009	-0,60811	
0,0152	123,03	0,01513	121,06	-0,00007	-0,46053	
0,0152	123,03	0,01524	121,94	0,00004	0,263158	

Из приведенных данных видно, что доверительный интервал среднего значения включает 100 % и значения вычисленного коэффициента Стьюдента ($t_{выч.}$) не превышают табличные ($t_{табл.}$), а следовательно, полученные результаты не отягощены систематической ошибкой. Разработанная методика правильна [7, 8]. Величина относительной ошибки единичного определения не превышает 2 %, а также значение коэффициента вариации RSD не превышает 2 %, что свидетельствует об удовлетворительной сходимости результатов.

Пригодность хроматографической системы было предложено определять при хроматографировании раствора РСО гимантана, приготовление которого описано выше, по следующим параметрам: эффективность хроматографической колонки (число теоретических тарелок для пика гимантана), коэффициент асимметрии пика гимантана и пика 1-адамантилэтанола, относительное стандартное отклонение результатов определения площадей пиков гимантана и 1-адамантилэтанола и разрешение пиков гимантана и 1-адамантилэтанола. В табл. 3

представлены результаты определения пригодности хроматографической системы и критерии приемлемости.

Таблица 3

Результаты определения и критерии пригодности хроматографической системы

Результаты определения параметров пригодности хроматографической системы			
Число теоретических тарелок для пика гимантана, *N*	Коэффициент асимметрии по пику гимантана (As-1) и 1-адамантилэтанола (As-2)	RSD площадей пиков гимантана (RSD-1) и 1-адамантилэтанола (RSD-2)	Rs пиков гимантана и 1-адамантилэтанола
109097 ± 475	0,96 ± 0,06 1,02 ± 0,04	3558,3 ± 253,0 3296,6 ± 186,0	29,22
Критерии приемлемости			
Не менее 95000	Не более 1,5	Не менее 3510 ± 253 3215 ± 186	Не менее 29,21

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных исследований нами была разработана методика количественного определения гимантана в лекарственной форме с помощью метода ГЖХ. Методика обладает специфичностью, правильностью, обеспечивает хорошую сходимость результатов определения и может быть использована для количественного определения гимантана в геле для местного применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова А.Ю., Блынская Е.В., А.И. Матюшкин. Оценка анальгитической активности гелевых форм гимантана для местного применения в формалиновом тесте у крыс // Химико-фармацевт. журн. – 2018. – № 52 (8). – С. 51–55.
2. Иванова Е.А., Капица И.Г., Вальдман Е.А. и др. Противопаркинсоническая активность гимантана на модели гемипаркинсонического синдрома у крыс // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2015. – № 159 (3). – С. 362–365.
3. Иванова Е.А., Капица И.Г., Непоклонов А.В. и др. Противовоспалительная активность гимантана на моделях периферического воспаления и нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом // Химико-фармацевт. журн. – 2013. – № 47 (10). – С. 12–15.
4. Катунина Е.А., Петрухова А.В., Авакян Т.Н. и др. Возможности применения гимантана при лечении болезни Паркинсона // Журн. неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. – 2008. – № 108 (6). – С. 24–27.
5. Неробкова Л.Н., Вальдман Е. А., Воронина Т.А. и др. Влияние нового производного аминоадамантана А7 на проявления паркинсонического синдрома, вызванного системным введением нейротоксина МФТП // Эксп. и клин. фарм. – 2000. – № 3. – С. 3–6.
6. Непоклонов А.В., Капица И.Г., Иванова Е.А. и др. Изучение эффектов гимантана на модели ранней («домоторной») стадии болезни паркинсона у крыс // Эксп. и клин. фарм. – 2012. – № 75 (11). – С. 3–6.
7. ОФС.1.1.0013.15. Статистическая обработка результатов химического эксперимента // ГФ XIV. – 2018. – Том 1. – С. 289–318.
8. ОФС 1.1.0012.15. Валидация аналитических методик // ГФ XIV. – 2018. – Том 1. – С. 276.
9. Патент РФ 2559777. – Бюл. изобрет. № 22. – 2015.
10. Сергеева М.С., Грушевская Л.Н., Пятин Б.М. и др. Фармацевтический анализ и стандартизация инъекционной лекарственной формы гимантана // Хим.-фарм. журн. – 2011. – Т. 45. – № 8. – С. 49–52.
11. Сергеева М.С., Грушевская Л.Н., Гаевая Л.М. и др. Валидация методики количественного определения инъекционной лекарственной формы лекарственного препарата из ряда производных адамантана методом ГЖХ // Вестник ВолГМУ. – 2018. – № 4 (68). – С. 91–96.
12. Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Valdman E.A., et al. Comparison of the analgesic activity of antiparkinsonian aminoadamantane derivatives amantadine and hemantane // Advances in Parkinson's Disease. – 2016. – № 5. – P. 50–60.

REFERENCES

1. Ivanova A.Ju., Blynskaja E.V., Matjushkin A.I. Ocenka anal'giticheskoj aktivnosti gelevyh form gimantana dlja mestnogo primenenija v formalinovom teste u krys [Evaluation of the analgesic activity of gel forms of gimantan for topical use in the formalin test in rats]. *Himiko-farmacevt. zhurn.* [Chemical and Pharmaceutical Journal], 2018, no. 52 (8), pp. 51–55. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Ivanova E.A., Kapica I.G., Val'dman E.A. i dr. Protivoparkinsonicheskaja aktivnost' gimantana na modeli gemiparkinsonicheskogo sindroma u krys [Antiparkinsonian activity of gimantan on a model of hemiparkinsonian syndrome in rats]. *Bjull. jeksp. biol. i med.* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 2015, no. 159 (3), pp. 362–365. (In Russ.; abstr. in Engl.).
3. Ivanova E.A., Kapica I.G., Nepoklonov A.V. i dr. Protivovospalitel'naja aktivnost' gimantana na modeljah perifericheskogo vospalenija i nejrovospalenija, inducirovannogo lipopolisaharidom [Anti-inflammatory activity of gimantan on models of peripheral inflammation and neuroinflammation induced by lipopolysaccharide]. *Himiko-farmacevt. zhurn.* [Chemical and Pharmaceutical Journal], 2013, no. 47 (10), pp. 12–15.
4. Katunina E.A., Petruhova A.V., Avakjan T.N. i dr. Vozmozhnosti primenenija gimantana pri lechenii bolezni Parkinsona [Possibilities of using gimantan in the treatment of Parkinson's disease]. *Zhurn. nevrologii i psihiatrii imeni S.S. Korsakova* [Journal of Neurology and Psychiatry named after S.S. Korsakov], 2008, no. 108 (6), pp. 24–27. (In Russ.; abstr. in Engl.).
5. Nerobkova L.N., Val'dman E. A., Voronina T.A. i dr. Vlijanie novogo proizvodnogo aminoadamantana A7 na projavlenija parkinsonicheskogo sindroma, vyzvannogo sistemnym vvedeniem nejrotoksina MFTP [Effect of a new derivative of aminoadamantane A7 on the manifestations of parkinsonism syndrome caused by systemic administration of neurotoxin MPTP]. *Jeksp. i klin. farm.* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2000, no. 3, pp. 3–6. (In Russ.; abstr. in Engl.).
6. Nepoklonov A.V., Kapica I.G., Ivanova E.A. i dr. Izuchenie jeffektov gimantana na modeli rannej («domotornoj») stadii bolezni parkinsona u krys [Study of the effects of gimantan on a model of the early («domotor») stage of Parkinson's disease in rats]. *Jeksp. i klin. farm.* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2012, no. 75 (11), pp. 3–6. (In Russ.; abstr. in Engl.).
7. OFS.1.1.0013.15. Statisticheskaja obrabotka rezul'tatov himicheskogo jeksperimenta [Statistical processing of the results of a chemical experiment]. GF XIV, 2018, Tom 1, pp. 289–318.
8. OFS 1.1.0012.15. Validacija analiticheskih metodik [Validation of analytical techniques]. GF XIV, 2018, Tom 1, p. 276.
9. Patent RF 2559777. Bjul. izobret. № 22. 2015.
10. Sergeeva M.S., Grushevskaja L.N., Pjatin B.M. i dr. Farmacevticheskij analiz i standartizacija injekcionnoj lekarstvennoj formy gimantana [Pharmaceutical analysis and standardization of the injectable dosage form of hematan]. *Him.-farm. zhurn.* [Chemical and Pharmaceutical Journal], 2011, Vol. 45, no. 8, pp. 49–52. (In Russ.; abstr. in Engl.).
11. Sergeeva M.S., Grushevskaja L.N., Gaevaja L.M. i dr. Validacija metodiki kolichestvennogo opredelenija injekcionnoj lekarstvennoj formy lekarstvennogo preparata iz rjada proizvodnyh adamantana metodom GZhH [Validation methods for the quantitative determination of an injectable dosage form of a drug from a number of adamantane derivatives by GLC]. *Vestnik VolGMU* [Journal of VolSMU], 2018, no. 4 (68), pp. 91–96. (In Russ.; abstr. in Engl.).
12. Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Valdman E.A., et al. Comparison of the analgesic activity of antiparkinsonian aminoadamantane derivatives amantadine and hemantane. Advances in Parkinson's Disease, 2016, no. 5, pp. 50–60.

Контактная информация

Гаевая Людмила Михайловна – д. фарм. н., ведущий научный сотрудник химико-технологической лаборатории опытно-технологического отдела ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», e-mail: otopharm@mail.ru