

УДК 615.31'454,142:543.422.3

**АНАЛИЗ И ВАЛИДАЦИОННАЯ ОЦЕНКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В НАРУЖНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ ПРОТИВОРУБЦОВОГО ДЕЙСТВИЯ**

<sup>1</sup>Жидкова Ю.Ю., <sup>1</sup>Пеньевская Н.А., <sup>2</sup>Воронков А.В., <sup>2</sup>Зайцев В.П.,  
<sup>2</sup>Ушакова Л.С., <sup>2</sup>Леонова В.Н., <sup>2</sup>Мезенова Т.Д.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия», Омск;

<sup>2</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», Пятигорск, e-mail: Unno4ka@yandex.ru

Разработан композитный гель противорубцового действия, действующими компонентами которого являются меглумина акридонат (циклоферон), глицирам и масло шиповника. Идентификацию и количественное определение глицирама в геле противорубцового действия проводили методом тонкослойной хроматографии с последующей денситометрической обработкой хроматограмм (методом абсолютной калибровки по градуировочному графику зависимости «масса вещества – площадь пика» (линейная аппроксимация)). Проведена валидация разработанной методики. Установлены параметры линейности (градуировочный график описывается уравнением  $S = (7,5 \pm 0,8) \cdot 10^3 m$ , коэффициент корреляции, правильности (определяли методом «введено-найденно», средний процент открываемости – 102,8%) и сходимости разработанной методики (оценивали по результатам повторных определений содержания глицирама в геле). Проведено определение хроматографических характеристик. Полученные результаты свидетельствуют о достаточной специфичности, высокой чувствительности и эффективности хроматографической методики.

**Ключевые слова:** гель, меглумина акридонат (циклоферон), глицирам, масло шиповника

**ANALYSIS AND VALIDATION TECHNIQUE'S VALUATION OF QUANTITATIVE ACTIVE SUBSTANCE'S DEFINITION IN EXTERNAL DOSAGE FORM WITH ANTICACATRICAL EFFECT**

<sup>1</sup>Zhidkova U.U., <sup>1</sup>Penyevskaya N.A., <sup>2</sup>Voronkov A.V., <sup>2</sup>Zaytsev V.P.,  
<sup>2</sup>Uschakova L.S., <sup>2</sup>Leonova V.N., <sup>2</sup>Mezenova T.D.

<sup>1</sup>Omsk State Medical Academy, Omsk;

<sup>2</sup>Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, a branch of «Volgograd State Medical University», Pyatigorsk, e-mail: Unno4ka@yandex.ru

It was developed the composite gel with anticacatrical effect, active components of which are meglumine acridonacetate (cycloferon), glycyram and rosehip oil. Identification and quantitative definition of glycyram in gel was employed a method of thin-layer chromatography with subsequent densimetric chromatogram's processing (by method of absolute calibration by calibrating graph of substance weight – area relationship (linear approximation)). It was made a validation of developed method. It was determined parameters of linearity (calibrating graph described by equation:  $S = (7,5 \pm 0,8) \cdot 10^3 m$ , coefficient of correlation  $r = 0,997$ ), accuracy (determined by method «introduced-found», average percent of openness – 102,8%) and repeatability of developed technique (estimated by result of repeated content's determination glycyram's in gel). It was made determination of chromatographic description. Derived results testify to enough specific, high sensibility and efficiency of chromatographic method.

**Keywords:** gel, meglumine acridonacetate (cycloferon), glycyram, rosehip oil

Одной из важных задач, определяющих границу между дерматологией и косметикой, является лечение и профилактика келоидных и гипертрофических рубцов.

Хирургическое лечение не всегда обеспечивает желаемые результаты. Поэтому комплексная терапия с использованием наружных лекарственных форм является перспективной. В связи с этим нами предлагается гель с меглумина акридонатом (циклоферон), глицирамом и маслом шиповника, обеспечивающий по предварительным исследованиям противорубцовый эффект.

**Цель исследования** – разработка методики идентификации и количественного определения глицирама в геле, содержащем

кроме глицирама меглумина акридонат (циклоферон) и масло шиповника.

**Результаты исследования и их обсуждение**

Циклоферон, глицирам и масло шиповника имеют близкие максимумы светопоглощения в УФ области [1, 2, 3, 4], поэтому непосредственно каждое лекарственное вещество методом УФ-спектрофотометрии идентифицировать и количественно определить не представлялось возможным. В связи с этим нами была разработана методика идентификации и количественного определения глицирама методом тонкослойной хроматографии с последующей денситометрической обработкой хроматограмм.

*Приготовление раствора геля.* Около 0,5 г (точная навеска) геля помещали в коническую колбу вместимостью 50 мл, приливали 5 мл спирта этилового 95%, тщательно перемешивали. Полученное извлечение отфильтровывали (фильтр «желтая лента») в мерную колбу вместимостью 25 мл. Далее в коническую колбу приливали новую порцию спирта этилового 95% объемом примерно 5 мл, взбалтывали и переносили на фильтр. Операцию повторяли еще трижды. Все извлечения собирали в мерную колбу. Раствор в мерной колбе доводили спиртом до метки, тщательно перемешивали. Раствор использовали для дальнейшего анализа.

*Приготовление рабочего стандартного образца (PCO) глицирама.* В качестве рабочего стандартного образца использовали субстанцию глицирама (ФСП 42-8145-06). 0,025 г (точная навеска) PCO глицирама помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в небольшом объеме спирта этилового 95%, перемешивали до растворения. Раствор доводили спиртом этиловым 95% до метки, тщательно перемешивали. Концентрация полученного раствора 1 мкг/мкл.

#### **Методика идентификации и количественного определения глицирама в геле**

Хроматографирование проводили на пластинках марки «Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ» размером 10×15 см. В качестве подвижной фазы использовали систему н-бутанол – спирт этиловый 95% – концентрированный раствор аммиака (6:1:3). Для детектирования нами предложено использовать 50% раствор серной кислоты. Линию старта обозначали на расстоянии 1,5 см от края пластинки длиной 15 см.

На линию старта хроматографической пластинки наносили 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкл раствора PCO с содержанием глицирама 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкг соответственно. На этой же пластинке обозначали 4 линии контрольных треков, куда наносили по 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкл спиртового извлечения геля. Пробы наносили при помощи микрошприца М-10Н. Пластинки помещали в камеру для хроматографирования. Высота подъема растворителя 8 см. Пластинки вынимали, высушивали при комнатной температуре, обрабатывали детектирующим реактивом методом опрыскивания и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100–105°C в течение 30 мин. Наблюдали появление коричневых пятен. Пластинки сканировали при помощи планшетного сканера hp scanjet 3670 (разрешение 100 dpi) и далее осуществляли их цифровую обработку с помощью компьютерной программы

«Видеоденситометр Sorbfil» (г. Краснодар). Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по градуировочному графику зависимости «масса вещества – площадь пика» (линейная аппроксимация).

#### **Определение хроматографических характеристик**

*Чувствительность* аналитической реакции на пластинке, установленная по величине открываемого минимума (предела обнаружения) (мкг), которая визуалью проявлялась после детектирования, составила 1 мкг глицирама в пятне.

Идентификацию глицирама в спиртовом извлечении из геля проводили по величине  $R_f$  пятна контрольного трека, которая соответствует  $R_f$  пятна стандартного образца ( $0,13 \pm 0,01$ ) (рис. 1, 2).

*Эффективность* пластинки определяли по числу теоретических тарелок пятен стандартных образцов. Данный показатель для глицирама составил около 250 теоретических тарелок. Полученные результаты свидетельствуют о достаточной чувствительности и эффективности хроматографической методики.

Для валидации методики количественного анализа определяли линейность, правильность и сходимость.

*Линейность* устанавливали по градуировочному графику, полученному при компьютерной обработке хроматограмм в координатах площадь пика (S) – масса (m, мкг). Под площадью пика в видеоденситометрии понимается интегральная характеристика, включающая собственно площадь пятна, его объем в пространстве и интенсивность его окраски [5]. Для этой цели использовали раствор PCO глицирама с концентрацией 1 мкг/мкл. Хроматограмму готовили, как указано выше. Диапазон масс глицирама в пятнах 1,0–5,0 мкг. По данным градуировочного графика рассчитывали статистические характеристики и коэффициент корреляции. Методом наименьших квадратов определяли значимость свободного члена линейной зависимости (a), величину углового коэффициента (b). Расчеты проводили с помощью программы Microsoft Excel. Градуировочный график описывается уравнением  $S = (7,5 \pm 0,8) \cdot 10^3 m$ , коэффициент корреляции  $r = 0,997$ .

*Правильность* методики определяли методом «введено – найдено». По градуировочному графику рассчитывали содержание глицирама на 5-ти уровнях концентраций стандартного образца и рассчитывали метрологические характеристики. Результаты приведены в табл. 1.

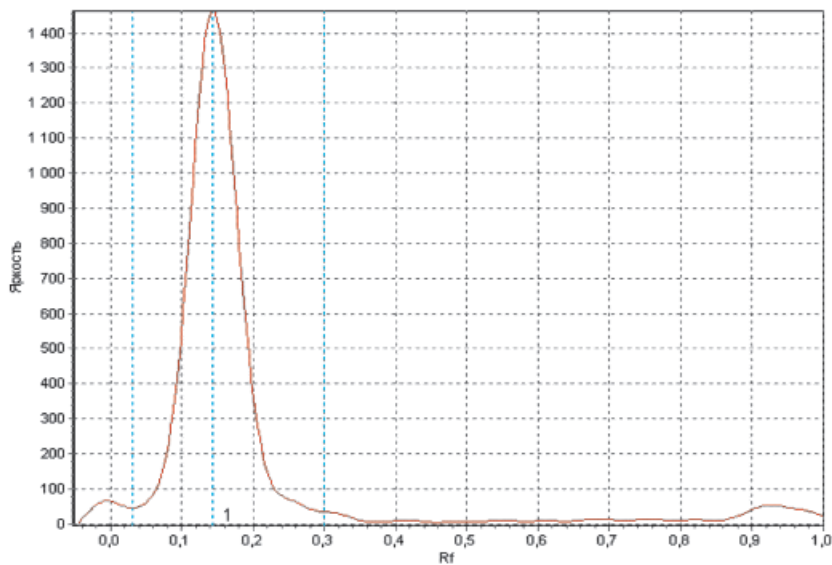


Рис. 1. Хроматограмма РСО глицирама

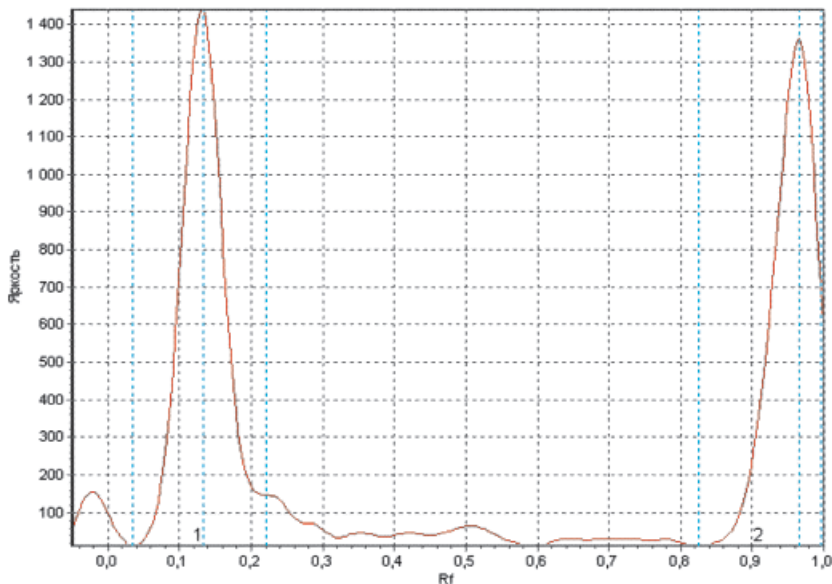


Рис. 2. Хроматограмма спиртового извлечения геля с глицирамом:  
1 – глицирам

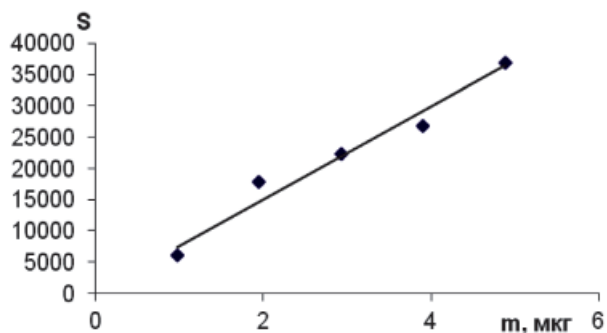


Рис. 3. Градуировочный график глицирама

Таблица 1

Оценка правильности определения глицирама

| Уровень | Введено, мкг | Найдено, мкг | Открываемость, % | Метрологические характеристики                                  |
|---------|--------------|--------------|------------------|---|
| 1       | 1,0          | 1,02         | 102              | $X_{cp} = 102,8$<br>$SD = 9,36$<br>$RSD = 9,1\%$<br>$E = 8,0\%$ |
| 2       | 2,0          | 2,3          | 115              |   |
| 3       | 3,0          | 3,06         | 102              |   |
| 4       | 4,0          | 3,56         | 89               |   |
| 5       | 5,0          | 5,3          | 106              |   |

Сходимость методики оценивали по результатам повторных определений содержания глицирама в геле. Результаты и метрологические характеристики представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты определения глицирама в геле. Оценка сходимости

| Содержание глицирама в геле, г/100 г | Метрологические характеристики   |
|--------------------------------------|--|
| 4,2                                  | $X_{cp} = 4,91$<br>$\Delta X = 0,43$<br>$SD = 0,467$<br>$RSD\% = 9,5\%$<br>$E\% = 8,8\%$ |
| 4,5                                  |  |
| 4,6                                  |  |
| 5,2                                  |  |
| 5,3                                  |  |
| 5,3                                  |  |
| 5,3                                  |  |

### Выводы

1. Методом тонкослойной хроматографии с последующей денситометрической обработкой хроматограмм был идентифицирован и количественно определен глицирам в геле противорубцового действия.

2. Установлены параметры линейности, правильности и сходимости разработанной методики определения глицирама.

### Список литературы

1. Циклоферон, раствор для внутреннего и внутримышечного введения 125 мг/мл. Изменение № 2: ФСП 42-0320-1700-06. – Введ. 2010. – 05.03. – ООО НТФФ «Полисан», Россия, 2010. – 10 с.

2. Циклоферон, линимент 5%: ФСП 42-1702-07. – Введ. 2008. – 14.03. – ООО НТФФ «Полисан», Россия, 2008. – 10 с.

3. Качественный и количественный анализ сырья и препаратов солодки / М.В. Егоров [и др.] // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2005. – № 1. – С. 175–180.

4. Масло шиповника: ФС 42–2067-95. – Введ. 1995. – 08.11. – МЗ РФ Фармакопейный гос. комитет, Россия, 1995. – 6 с.

5. Красиков В.Д. Основы планарной хроматографии. – СПб.: Химиздат, 2005. – С. 106.

### References

1. FSP 42-0320-1700-06 Tsikloferon, rastvor dlya vnutrennego i vnutrimyshechnogo vvedeniya 125 mg/ml. Izmenenie no. 2. Vved. 2010.05.03. ООО NTFF «Polisan», Russia, 2010. 10 p.

2. SP 42-1702-07 Tsikloferon, liniment 5%. Vved. 2008.14.03. ООО NTFF «Polisan», Russia, 2008. 10 p.

3. Kachestvennyy i kolichestvennyy analiz syrya i preparatov solodki. M.V. Egorov [i dr.]. Vestnik VGU. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya. 2005, no. 1, pp. 175–180.

4. FS 42-2067-95 «Maslo shipovnika». Vved. 1995.08.11. MZ RF Farmakopeynnyy gos. komitet, Russia, 1995. 6 p.

5. Krasikov V.D. Osnovy planarnoy khromatografii [The basis of the plan chromatography]. SPb., Chimizdat, 2005, pp. 106.

### Рецензенты:

Власова И.В., д.х.н., доцент, профессор кафедры аналитической химии, ФГБОУ ВПО «Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского», г. Омск;

Андреева И.Н., д.фарм.н., профессор кафедры «Туризм», Институт сервиса и технологий, филиал ФГОУ ВПО «ДГТУ», г. Пятигорск.

Работа поступила в редакцию 17.10.2013.