

УДК 615.453.8–036.7:615.281.9:615.282

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛОТРИМАЗОЛА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПЛЕНКАХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОТОМИКОЗОВ

Н.Д. Афонина, Л.Н. Ерофеева, С.С. Воронкина

(Курский государственный медицинский университет, кафедра фармацевтической, аналитической и токсикологической химии, кафедра фармацевтической технологии; e-mail: lnerofeeva@rambler.ru)

Разработана методика количественного определения клотримазола в полимерных лекарственных пленках для лечения больных отомикозом УФ-спектрофотометрическим методом по собственному поглощению. Валидация методики по таким параметрам, как линейность, правильность и прецизионность, показала возможность ее использования для анализа пленок с клотримазолом.

Ключевые слова: клотримазол, полимерные лекарственные пленки, количественное определение, УФ-спектрофотометрический метод, валидация.

В последние годы выросло число заболеваний, связанных с грибковыми поражениями ЛОР-органов, при этом чаще всего диагностируется отомикоз (до 50% всех больных с микозами ЛОР-органов). Микотический процесс поражает наружное, среднее ухо и послеоперационные полости, при неправильном и неэффективном лечении приводит к распространению и хронизации грибкового процесса. Проблема лечения отомикозов приобретает важное значение не только вследствие их все более широкого распространения, но и потому, что грибковое поражение протекает тяжелее, чем другие воспалительные процессы и может стать, особенно в детском возрасте, первичным очагом диссеминированного висцерального микоза, а также причиной грибкового сепсиса [1].

Для лечения больных с отомикозами целесообразно использование клотримазола, сочетающего противогрибковое и антибактериальное фармакологическое действие [2, 3]. Причем успех лечения зависит не только от правильного выбора действующего компонента, но также и от лекарственной формы, и от способа ее введения. В настоящее время для лечения отомикозов применяют растворы клотримазола, действие которых кратковременно. Возникает необходимость частого введения препарата, что неудобно как для больных, так и для медицинского персонала. Применяемый растворитель вызывает раздражение слизистых и кожи наружного слухового прохода, боль. В связи с этим представляется рациональной разработка биорастворимых

полимерных пленок, обеспечивающих пролонгирование, локализацию действия и снижение побочных явлений. Нами предложены полимерные пленки антимикробного и противогрибкового действия с клотримазолом (3 мг/см²). В качестве полимеров-носителей использованы водорастворимые производные целлюлозы. Пленки представляют собой тонкие, эластичные, прочные на разрыв пластинки круглой формы, белого цвета, диаметром 0,8 см. Для изучения стабильности пленок в процессе хранения необходимо разработать методики анализа. Клотримазол (1-[дифенил(2-хлорфенил)метил]-1H-имидазол) (рис. 1) обладает широким спектром противогрибкового действия и антибактериальными свойствами, эффективен в отношении дерматофитов, дрожжеподобных и плесневых грибов, угнетает рост грамположительных микроорганизмов, в том числе стафилококков и стрептококков. В клинической практике используют 1%-й крем в тубах

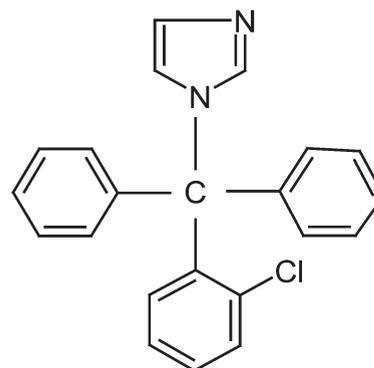


Рис. 1. Формула клотримазола

по 20,0 г, 1%-й раствор во флаконах по 15 мл, которые применяются при микозах кожи, ногтей, и таблетки интравагинальные по 0,1 г для лечения урогенитального кандидоза [2, 3].

Количественный анализ клотримазола проводят титриметрическими и фотометрическими методами [4–6]. Титрование клотримазола в среде неводных растворителей обусловлено слабыми основными свойствами вещества. Титруют раствором хлорной кислоты в среде ледяной уксусной кислоты с индикатором β -нафтобензеин. Метод трудоемок и требует особых условий работы. Возможно также титрование клотримазола натрий-лаурилсульфатом, для чего препарат растворяют в хлороформе, в качестве индикатора используют хлороформный раствор диметилового желтого. Недостаток метода заключается в длительности определения и труднодоступности реактивов, полимеры-носители пленок не растворяются в хлороформе [7]. Кроме того, титриметрические методы требуют значительных количеств веществ для анализа.

Известна экстракционно-фотометрическая методика определения клотримазола с применением тропеолина 00. Она основана на образовании ионного ассоциата тропеолината клотримазола. Необходимое значение pH водных растворов создается 0,1 М и 0,2 М растворами натрия гидроксида и кислоты хлористоводородной соответственно. Максимум поглощения ионного ассоциата наблюдается при длине волны 402–405 нм. Для метода характерны избирательность, достаточная точность и чувствительность [8].

Широко применяется ультрафиолетовая спектрофотометрия. Это один из наиболее удобных, доступных и в то же время универсальных методов количественного определения органических соединений. Он основан на собственном поглощении спиртовых растворов клотримазола или растворов вещества в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной.

Метод отличает высокая чувствительность, что делает возможным определение небольших количеств вещества.

Цель исследования – разработка методики количественного определения клотримазола в полимерных пленках УФ-спектрофотометрическим методом по собственному поглощению.

Экспериментальная часть

Аппаратура и реагенты. Исследования выполняли на спектрофотометре «СФ-2000». Взвешивание точных навесок проводили на весах «ВЛР-200», точность которых составляла 0,00005 г.

В работе использовали следующие реактивы, лекарственные и вспомогательные вещества: клотримазол (содержание вещества не менее 98,5%, «Taiyuan Pharmaceutical Factory», Китай), оксипропилметилцеллюлоза (ОПМЦ) Methocel 65 Нг-50 («HARKE Pharma GmbH», Германия), метолоза (ГПМЦ) Metolose 65SH-50 («Shin-Etsu Chemical Co., Ltd», Япония), натрий-карбоксиметилцеллюлоза (NaКМЦ) Sekol 2000 («Chemimco GmbH», Швеция), 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной (ХП Государственная фармакопея Российской Федерации. Ч. 1. С. 441), вода очищенная (ФС 42-2619-97).

В качестве объекта анализа использовали свежеизготовленные лекарственные пленки с клотримазолом (3 мг/см²). Для выявления возможностей количественного определения клотримазола в пленках спектрофотометрическим методом изучали зависимость оптической плотности растворов пленок и растворов полимеров-носителей от длины волны (рис. 2).

С этой целью готовили 0,01%-й раствор клотримазола в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной. Для этого 0,1 г вещества (точная навеска) растворяли в 100 мл указанного растворителя, затем раствор разводили и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре «СФ-2000» в области от 230 до 290 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной. Спектр клотримазола имеет максимум поглощения при длине волны 264±1 нм.

Для выявления прямолинейного участка зависимости оптической плотности от концентрации клотримазола строили калибровочный график. Для этого готовили серию стандартных растворов с содержанием от 0,025 до 0,250 мг/мл клотримазола в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной и измеряли оптическую плотность каждого раствора в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм при 264±1 нм.

Расчетные данные калибровочного графика для клотримазола представлены в табл. 1. Показана прямо пропорциональная зависимость оптической плотности от концентрации в интервале от 0,025 до 0,250 мг/мл. Методом наименьших квадратов рассчитывали уравнение калибровочного графика для клотримазола:

$$D = 0,033 + 2,358 C,$$

где D – оптическая плотность раствора; C – концентрация исследуемого раствора, мг/мл.

Используемые в качестве основ пленок полимеры не растворимы в кислоте хлористоводородной, поэ-

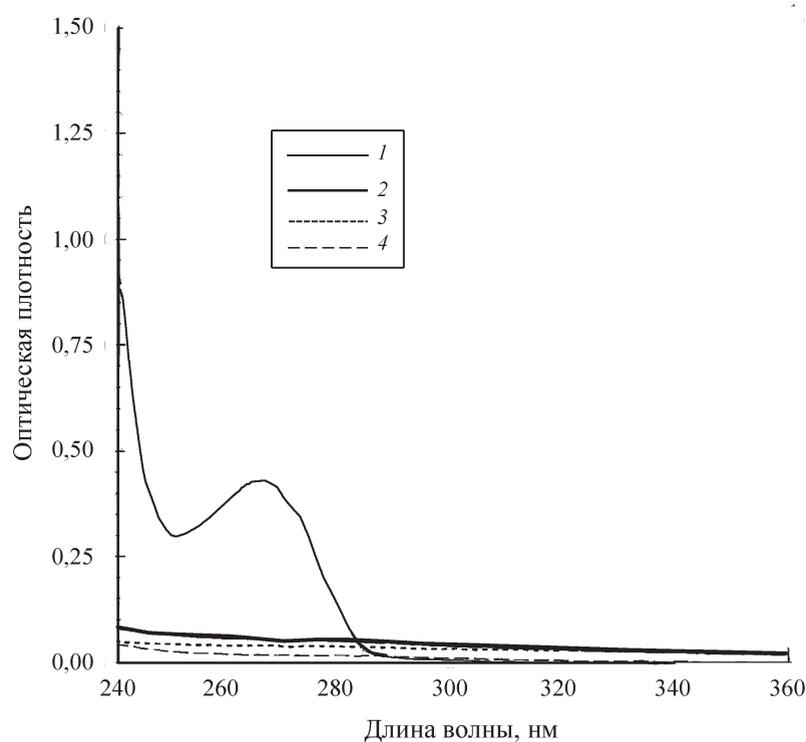


Рис. 2. Спектры поглощения: 1 – клотримазол, 2 – NaKMЦ, 3 – ГПМЦ, 4 – ОПМЦ

Таблица 1

Данные для построения калибровочного графика клотримазола

Номер раствора	C , мг/мл	D	C/D	C^2	D^2
1	0,025	0,095	0,002375	0,000625	0,009025
2	0,050	0,136	0,006800	0,002500	0,018496
3	0,075	0,210	0,015750	0,005625	0,044100
4	0,100	0,291	0,029100	0,010000	0,084680
5	0,150	0,376	0,056400	0,022500	0,141376
6	0,200	0,504	0,100800	0,040000	0,254016
7	0,250	0,623	0,155750	0,016250	0,388124
Суммарные данные	0,850	2,235	0,366975	0,143750	0,939722

тому для количественного определения клотримазола в лекарственной форме пленки сначала растворяли в воде очищенной, а затем добавляли раствор кислоты. Спектр поглощения свежеприготовленного раствора пленок с клотримазолом в УФ-области имеет максимум поглощения при 264 ± 1 нм. Установлено, что оптическая плотность растворов основ пленок соответствующей концентрации в изучаемой обла-

сти спектра составляет от 0,015 до 0,020, в то время как оптическая плотность растворов пленок с клотримазолом при 264 ± 1 нм находится в пределах 0,300–0,600, что позволяет в качестве раствора сравнения использовать 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной.

Методика количественного определения клотримазола в полимерных пленках. В 5 мл воды очи-

щенной растворяли 10 пленок (точная навеска), затем доводили объем в мерной колбе до 100,0 мл 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной и измеряли оптическую плотность раствора в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм при длине волны 264 ± 1 нм на фоне раствора сравнения.

Процедуру валидации методики осуществляли по следующим параметрам: линейность, правильность, прецизионность [9, 10].

Для оценки линейности методики использовали стандартные растворы клотримазола с concentra-

цией от 0,025 до 0,250 мг/мл. Полученная линейная зависимость оптической плотности от концентрации имеет вид:

$$D = 0,033 + 2,358 C.$$

Определение валидационных характеристик проводили на модельных смесях, включающих все вспомогательные вещества и известное количество клотримазола. Диапазон методики 80–120%; изучаемые концентрации (%): 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120 от прописанного количества. Результаты, представленные

Т а б л и ц а 2

Результаты валидации методики количественного определения пленок с клотримазолом (диапазон $D = 80\text{--}120\%$, шаг 5%, $P = 95\%$, $n = 9$)

Валидационный критерий	Полученное значение	Критическое значение
Линейность		
Требование к свободному члену (a): критерий статистической незначимости $ a \leq \Delta_A = t(95\%, n-2) \cdot S_a$	$0,033 < 0,0488$	—
Требования к остаточному стандартному отклонению S_0 , %.	0,032	max $S_0 = 1,69\%$
Односторонний доверительный интервал: $S_0/b \leq \Delta_{S_0}/t(95\%, n=2)$	0,18	
Относительное стандартное отклонение (RSD)	0,49%	max RSD = 13,69%
Правильность и прецизионность		
Коэффициент корреляции, (r)	0,9966	min $r = 0,99236$
Отношение «найдено : введено» Z, %	99,66 %	—
$ Z - 100 $, %	0,34 %	$\pm 2\%$
Критерий статистической незначимости $\delta\% = Z - 100 \leq \Delta_Z/\sqrt{n}$	$0,34 < 0,64$	max $\delta = 1,02\%$
Односторонний доверительный интервал $\Delta_z = S_z(\%) \cdot t(95\%, n-1) \leq \Delta_{As}$	$1,015\% < 3,2$	max $\Delta_{As} = 3,2\%$
Полная неопределенность анализа $\Delta_{As} = \Delta_{SP} + \Delta_{\epsilon AO}$	0,59 %	max $\Delta_{As} = 3,2\%$

Т а б л и ц а 3

Метрологическая характеристика количественного определения клотримазола в пленках ($n = 10$, $f = 9$, $P = 95\%$, $t(P, f) = 2,26$)

Полимер-носитель	\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta \bar{x}$	ϵ
Оксипропилметилцеллюлоза	99,94	2,290	0,726	1,64	1,64
Метолоза	94,70	1,330	1,161	1,66	1,75
Натрий-карбоксиметилцеллюлоза	98,70	1,335	1,168	1,67	1,69

Примечание. \bar{x} – среднее арифметическое; S – стандартное отклонение; $S_{\bar{x}}$ – стандартное отклонение среднего результата; $\Delta \bar{x}$ – 95%-й доверительный интервал результата отдельного определения; ϵ – относительная погрешность (%) отдельного определения.

в табл. 2, позволяют сделать вывод, что разработанная методика может быть использована для количественного определения клотримазола в полимерных пленках, изготовленных на разных основах. Методику использовали для анализа полимерных лекарственных пленок с клотримазолом. Количественное содержание вещества в растворе рассчитывали по уравнению ка-

либровочного графика и пересчитывали на содержание в навеске и 1 см² пленки. Результаты количественного определения клотримазола в пленках (модельные опыты) представлены в табл. 3. Относительная ошибка методики не превышает $\pm 1,75\%$. Найденное содержание клотримазола удовлетворяет требованиям нормативной документации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шляга И.Д. // Проблемы медицинской микологии. 2006. № 3. С. 8.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М., 2006. С. 919.
3. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств. М., 2007. С. 433.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. Ч. 1. М., 2008. С. 563.
5. British Pharmacopoeia. London, 2009.
6. The United States Pharmacopoeia. Rockville, 2007.
7. Полимеры в фармации / Под ред. А.И. Тенцовой, М.И. Алюшина. М., 1985. С. 20, 25.
8. Щеряков А.А. // Здоровоохранение. Минск, 1999. № 1. С. 46.
9. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. I. Основные положения и определения.
10. Руководство ICH «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» Q2 (R1) // Фармация. 2008. № 4. С. 3.

Поступила в редакцию 25.10.12

DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF CLOTRIMAZOLE IN MEDICATED FILMS FOR TREATMENT OF OTOMYCOSIS

N.D. Afonina, L.N. Yerofeeva, S.S. Voronkina

(Kursk State Medicine University)

Method of quantitative determination of clotrimazole in polymeric medicated films has been developed for treatment of patients with otomycosis with ultraviolet spectrophotometric method by self absorption. Validation of the method in the parameters of linearity, accuracy and precision demonstrated the possibility of its use for analyses of films with clotrimazole.

Key words: *clotrimazole, polymeric medicated films, quantitative determination, UV-spectrophotometric method, validation.*

Сведения об авторах: *Афонина Нина Дмитриевна* – доцент кафедры фармацевтической, аналитической и токсикологической химии Курского государственного медицинского университета, канд. фарм. наук (afonina_nina@bk.ru); *Ерофеева Лия Никифоровна* – профессор кафедры фармацевтической технологии Курского государственного медицинского университета, докт. фарм. наук (lnerofeeva@rambler.ru); *Воронкина Светлана Сергеевна* – аспирант кафедры фармацевтической технологии Курского государственного медицинского университета.