

УДК 543.544.943.3

3.4.1 Промышленная фармация и технология получения лекарств

DOI: 10.37903/vsgma.2021.4.25

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ПЕНТОКСИФИЛЛИНА
В МИКРОЧАСТИЦАХ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ЕЕ ВАЛИДАЦИЯ**
© Тимченко Т.В., Мезенова Т.Д., Компанцев Д.В., Маркова О.М., Компанцев В.А.,
Зяблицева Н.С., Санникова Е.Г., Васина Т.М.

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава
России, 357532, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, л. 11*

Резюме

Цель. Разработать и провести валидацию методики количественного определения пентоксифиллина в микрочастицах, полученных на основе поли-DL-лактид-ко-гликолида (PLGA), методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Методика. При получении микрочастиц использовали субстанцию пентоксифиллина, в качестве биоразлагаемого полимера – PLGA. Научное исследование проводилось с использованием лабораторного оборудования Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ.

Результаты. Разработана методика количественного определения пентоксифиллина в микрочастицах, полученных на основе PLGA, методом ТСХ. Среднее значение количества, высвободившегося пентоксифиллина из микрочастиц, определенное методом ТСХ, составило $67,7 \pm 2,7\%$. В ходе исследования была проведена валидация разработанной методики ТСХ. Погрешность методики в условиях эксперимента составила 4,0%.

Заключение. Разработана методика количественного определения пентоксифиллина в микрочастицах методом ТСХ, отвечающая нормативным положениям и пригодная для фармацевтического анализа.

Ключевые слова: микрочастицы пентоксифиллина, количественный анализ, метод ТСХ, валидация

DEVELOPMENT OF A METHOD OF QUANTITATIVE ANALYSIS OF PENTOXYPHYLLINE
IN MICROPARTICLES BY THE METHOD OF THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY. VALIDATION
OF METHODS

Timchenko T.V., Mezenova T.D., Kompantsev D.V., Markova O.M., Kompantsev V.A.,
Zyabliceva N.S., Sannikova E.G., Vasina T.M.

*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - a branch of the Volgograd State Medical University of the
Ministry of Health of Russia, l. 11, Kalinina Av., 357532, Pyatigorsk, Russia*

Abstract

Objective. The development and validation of methods for the quantitative determination of pentoxifylline in microparticles obtained on the basis of poly-DL-lactide-co-glycolide (PLGA) by thin layer chromatography (TLC).

Methods. In the preparation of microparticles, the substance pentoxifylline was used; PLGA was used as a biodegradable polymer. Scientific research was carried out using laboratory equipment of the Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - a branch of the Volgograd State Medical University.

Results. A method for the quantitative determination of pentoxifylline in microparticles, obtained on the basis of PLGA, was developed by TLC. The average value of the amount of pentoxifylline released from microparticles, determined by TLC, was $67.7 \pm 2.7\%$. During the studies, the developed TLC technique was validated. The error of the technique in the experimental conditions is 4.0%.

Conclusions. The developed method for the quantitative determination of pentoxifylline in microparticles by TLC, which meets regulatory requirements and is suitable for pharmaceutical analysis.

Keywords: pentoxifylline microparticles, quantitative analysis, TLC method, validation

Введение

Пентоксифиллин относится к блокаторам аденозиновых рецепторов, а также ингибитором фосфодиэстеразы [4]. Как правило, применение пентоксифиллина требует продолжительного курса лечения для достижения положительных результатов, и при нарушении приема лекарственного препарата уменьшается его терапевтический эффект. Выходом является применение пролонгированных форм препарата, которые не требуют ежедневного трехразового применения. Благодаря развитию нанотехнологий представляется возможным получать лекарственные препараты пролонгированного действия методом инкапсулирования на основе полимерных носителей с контролируемым высвобождением активных субстанций [6].

На базе Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ была разработана субстанция, состоящая из микрочастиц PLGA с включенным в полимер пентоксифиллином, обладающая пролонгированным действием, на которую авторами получен патент [6]. Благодаря свойствам поли-DL-лактид-ко-гликолида (PLGA), пролонгированное действие микрочастиц пентоксифиллина при однократном введении перорально лабораторным животным наблюдалось в течение 24 ч. [5]. Для данной субстанции возможна разработка разных технологических форм удобных в применении, а также оказывающих необходимый терапевтический эффект.

Фармацевтический анализ данной субстанции проводится с использованием методов спектрофотометрии, ИК – спектроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также метода тонкослойной хроматографии (ТСХ) [2]. В нормативных документах по фармацевтическому анализу лекарственных форм пентоксифиллина описан метод определения примесей в таблетках пентоксифиллина, покрытых оболочкой, с использованием метода ТСХ [7]. В связи с этим логично разработать методику количественного определения пентоксифиллина в микрочастицах, полученных на основе PLGA, используя метод ТСХ.

Целью исследования является разработка и валидация методики количественного определения пентоксифиллина в микрочастицах, полученных на основе биodeградируемого полимера PLGA, с помощью метода тонкослойной хроматографии с видеоденситометрической регистрацией аналитического сигнала.

Методика

Для приготовления микрочастиц (со средним динамическим радиусом = 155 нм) [6] использовалась субстанция пентоксифиллина («ТСИ», USA, Lot. BRDTB-FM, P 2050), PLGA (50:50), molwt 40.000-75.000 (Sigma), поливиниловый спирт (ПВС) марки ШЛ, а также растворители марки ХЧ, соответствовавшие требованиям ГФ XIV издания. Для получения испытуемого образца микрочастиц пентоксифиллина на основе PLGA, был применен гомогенизатор Ultra-Turrax T-18 (ФРГ) с диспергирующим элементом (S18N-S18F; S18N-19G), центрифуга ОПН-8 (Россия), ультразвуковая ванна Ultrasonic Cleaner, PS-20 (Китай).

Для хроматографирования использовали пластины марки Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ (тип сорбента – силикагель СТХ-1ВЭ, зернение – 8-12 мкм, УФ-254, размер пластины - 10x15), подогреваемую подложку УСП-1М, микрошприц «Агат» М-10 (допустимый предел случайной погрешности шприца – 1%), хроматографическую камеру ($V=2095 \text{ см}^3$), ультрафиолетовую камеру. Способ детектирования – в лучах УФ-лампы при длине волны 254 нм. Итоговый результат на пластине фиксировали при помощи камеры Canon EOS 60D. Редактирование фотографии проводили при помощи Adobe Photoshop Ligh 5.0. Цифровую обработку хроматограммы проводили при помощи программного обеспечения «Видеоденситометр Sorbfil» (г. Краснодар).

В ходе приготовления микрочастиц пентоксифиллина, навеску полимера и субстанции пентоксифиллина в соотношении 1:3 растворяли в хлороформе, после полного растворения субстанции и полимера капельно вводили готовый раствор к 50 мл водной фазы. Водная фаза представляет собой раствор ПВС с концентрацией 0,3%. Процесс введения проходит при непрекращающейся работе гомогенизатора со скоростью 20000 об/мин. Процесс гомогенизации протекает в течение 15 мин. Готовый раствор подвергали центрифугированию со скоростью 6000 об/мин в течение 40 мин. Надосадочную жидкость декантировали. Полученный осадок микрочастиц центрифугировали с водой очищенной (4 раза). Готовые микрочастицы вымывали 10 мл воды очищенной и переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл. Доводили объем полученной суспензии спиртом этиловым 95% до метки. Колбу погружали в ультразвуковую ванну на 30 мин при температуре 40°C. Полученный раствор охлаждали до комнатной

температуры. В связи с тем, что раствор был мутным, проводили повторное центрифугирование (10 мин.) раствора. Получали центрифугат разрушенных микрочастиц пентоксифиллина (ЦРМП). Данный образец был использован в дальнейшем анализе как испытуемый раствор [6].

При приготовлении раствора стандартного образца (СО) субстанции пентоксифиллина около 0,01 г вещества (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в спирте этиловом 95%, доводили спиртом раствор до метки и тщательно перемешивали. Концентрация раствора 0,2 мкг/мл.

При приготовлении хроматограммы пластинку помещали на подогреваемую подложку. На линию старта длиной 15 см в обозначенные треки наносили раствор СО пентоксифиллина объемом от 2-х до 10-и мкл с содержанием вещества от 0,4 до 2 мкг. На треки с контрольным образцом наносили по 10 мкл ЦРМП. После нанесения проб пластинку охлаждали до комнатной температуры и помещали в заранее подготовленную, насыщенную парами растворителя камеру для хроматографии (время насыщения - 30 мин.). Хроматографирование проводили при температуре 25°C в защищенном от света месте [2, 3].

Результаты исследования и обсуждение

В качестве системы растворителей для пентоксифиллина используют этилацетат – спирт метиловый (85:15) [7]. В процессе разработки методики токсичный метиловый спирт нами был замен на спирт этиловый. В обеих системах R_f вещества идентичны и равны $0,39 \pm 0,01$ в системе с метанолом и $0,40 \pm 0,01$ – с этанолом. В дальнейших исследованиях использовали систему этилацетат – спирт этиловый 95% (85:15). Путь прохождения фронта подвижной фазы составил около 8 см. Время хроматографирования – 17 мин. Пластинку извлекали из камеры, высушивали в вытяжном шкафу до удаления запаха растворителей, затем детектировали в лучах УФ-лампы. На треках СО пентоксифиллина и ЦРМП обнаруживались пятна фиолетового цвета на зеленом фоне (рис. 1).

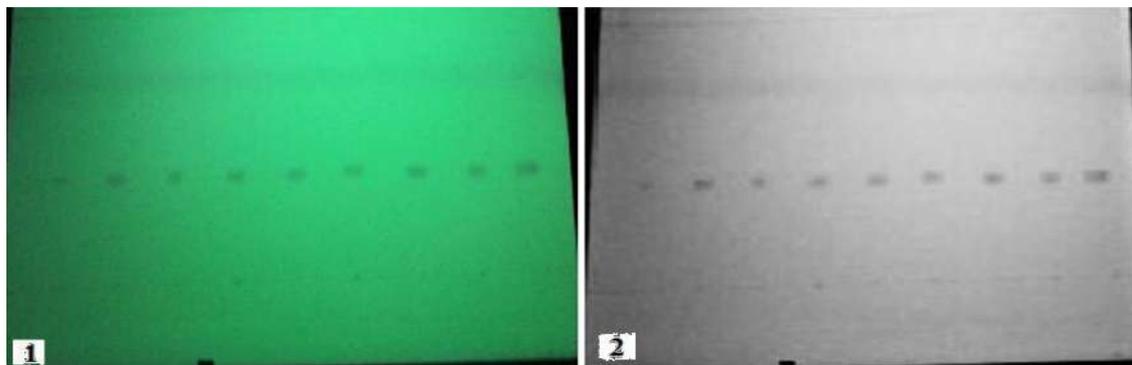


Рис. 1. Хроматографическая пластинка. 1 – фотография ТСХ пластины в лучах УФ лампы; 2 – отредактированный снимок ТСХ пластинки, использованный для цифровой обработки

Пластинку фотографировали, снимок подвергали обработке с помощью программы Adobe Photoshop Ligh 5.0. для получения более интенсивной окраски пятен по сравнению с фоном (рис. 1). При использовании компьютерной программы «Видеоденситометр Sorbfil» (г. Краснодар) провели цифровую обработку хроматографических пластин. Для каждого пятна были получены следующие хроматографические характеристики: цифровая хроматограмма, R_f , площадь пятна (S), число теоретических тарелок (NTR), асимметрия (As). Разрешение 120 dpi. (табл. 1)

Площадь пятна (S) в этом случае – понятие относительное. Оно включает в себя геометрическую площадь, объем в слое сорбента и яркость [3]. Кроме того, площадь пятен зависит от разрешения (dpi – плотность точек на дюйм), при котором обрабатывается пластинка. Большое число теоретических тарелок (NTR) указывает на высокую эффективность пластин для данного вещества.

В ходе количественного определения для получения наиболее достоверных результатов использовали несколько пластинок с четырьмя треками контрольного образца и пятью треками СО пентоксифиллина. По каждой пластинке определяли массовую долю вещества в ЦРМП по отношению к исходной массе вещества, используемого для получения включений, методом градуировочного графика (линейная аппроксимация). Статистическую обработку данных

проводили согласно ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» [2]. По результатам эксперимента содержание высвободившегося пентоксифиллина из микрочастиц составило $67,7 \pm 2,7\%$.

Таблица 1. Хроматографические характеристики пиков

№ пика	R _f	S	NTR	As
СО - 1	0,39	96535	1438	0,85
ЦМК - 2	0,39	90870	1317	0,90

Согласно положениям ОФС. 1.1.0012.15. «Валидация аналитических методик», а также, основываясь на разделы Европейской Фармакопеи, международные руководства и правила, необходимо проводить валидацию для каждой разрабатываемой аналитической методики. Этот процесс является экспериментальным доказательством того, что методика пригодна для использования, а результаты, полученные при ее использовании, достоверны [1, 2, 8].

Основываясь на требования имеющихся в нормативной документации, для данной методики количественного определения, высвободившегося пентоксифиллина из микрочастиц на основе PLGA, проводили валидацию по нижеприведенным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность [1].

Специфичность в методе ТСХ характеризует соответствие значения R_f пятен зоны сканирования трека с ЦМП со значением R_f зон сканирования стандартного образца или идентичность цифровых хроматограмм. R_f(ЦМП) = 0,39. R_f(СО) = 0,39 (рис. 2, табл. 2).

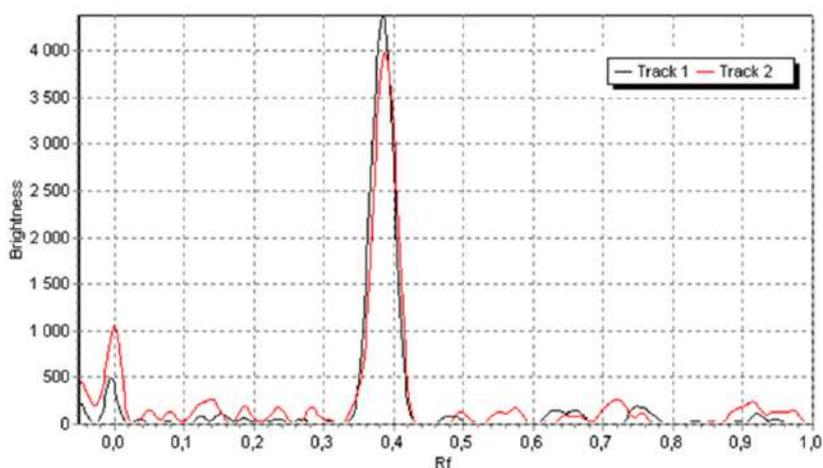


Рис. 2. Оцифрованная хроматограмма: «Трек 1» – СО пентоксифиллина, «Трек 2» – ЦМП

Линейность изучали с использованием метода абсолютной калибровки (линейная аппроксимация). Статистическую обработку данных проводили согласно ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» [2]. Данные эксперимента обрабатывали методом наименьших квадратов (МНК). Результаты для одной из пластин представлены в табл. 2 и на рис. 3.

Таблица 2. Статистические характеристики, полученные МНК для СО пентоксифиллина

Число точек	Угловой коэффициент (b)	Свободный член (a)	Станд. отклонение (A)	Доверительный интервал (A)	Коэффициент корреляции (r)
5	77052	10726	6765	21529	0,998

Посредством программы Microsoft Excel были вычислены такие параметры, как уравнение регрессии и коэффициент корреляции. Значимость свободного члена линейной зависимости (a), а также значение углового коэффициента (b) были установлены при помощи МНК. Доверительный интервал свободного члена гораздо больше его абсолютной величины, поэтому свободный член незначим. Это значит, что в системе координат прямая выходит из нуля. Уравнение регрессии в условиях эксперимента имеет вид: $S = 7,00 \cdot 10^4 m$ (рис. 3).

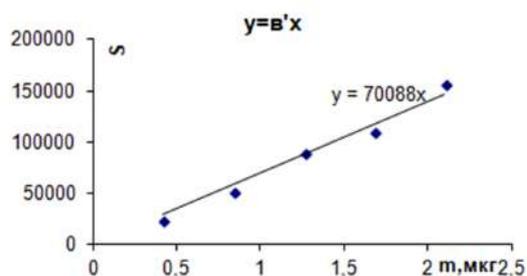


Рис. 3. Градуировочный график СО пентоксифиллина

Важной аналитической характеристикой является предел детектирования. Используя данные таблицы 2, рассчитывали предел обнаружения (ПО) и предел количественного обнаружения (ПКО) по формулам [1, 3]:

$$ПО = 3,3 \frac{S_a}{b};$$

$$ПКО = 10 \frac{S_a}{b}, \quad \text{где:}$$

S_a – стандартное отклонение (А);

b – угловой коэффициент.

Из расчетов следует: $ПО = 0,3 \text{ мкг}$; $ПКО = 0,9 \text{ мкг}$.

Для оценки линейности аналита использовали полученный в эксперименте центрифугат разрушенных микрочастиц пентоксифиллина. На линию старта наносили разные объёмы ЦРМП – от 4-х до 18-и мкл, хроматографировали и обрабатывали пластинку, как указано выше. Результаты представлены в табл. 3 и на рис. 4.

Таблица 3. Статистические характеристики, полученные методом наименьших квадратов для ЦРМП

Число точек	Угловой коэффициент (в)	Свободный член (а)	Станд. отклонение (А)	Доверительный интервал (А)	Коэффициент корреляции (r)
5	2307	234	1854	4766	0,996

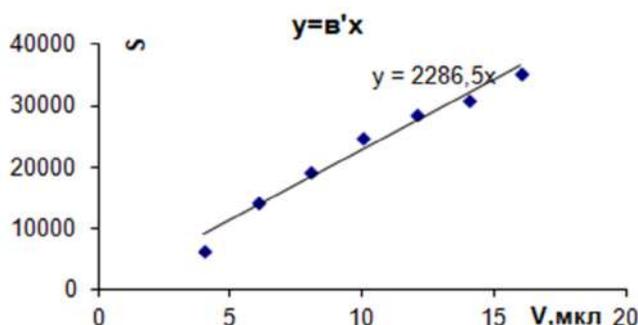


Рис. 4. Градуировочный график ЦРМП

Доверительный интервал стандартного отклонения больше величины стандартного отклонения (А), что указывает на незначимость свободного члена (а). Градуировочный график представляет прямую линию, выходящую из нуля.

Коэффициент корреляции – 0,998. Уравнение регрессии – $S = 2,3 \cdot 10^3 m$ (рис. 4)

Правильность методики оценивали методом «введено-найдено». Использовали данные пяти уровней концентраций в двух повторностях СО пентоксифиллина. Содержание вещества в пятне рассчитывали по уравнению регрессии. Результаты оценивали по метрологическим характеристикам. Результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4. Оценка правильности определения пентоксифиллина

Уровень	Взято, мкг	Найдено, мкг	Открываемость, %	Метрологические характеристики
1	0,4	0,41	103	$\bar{X}_{cp} = 99,1$ $SD = 1,8$ $\Delta X = 4,0$ $RSD = 5,7\%$ $E\% = 4,0\%$
		0,39	98	
2	0,8	0,82	102	
		0,75	94	
3	1,2	1,16	97	
		1,35	107	
4	1,6	1,52	95	
		1,49	93	
5	2,0	2,16	108	
		1,84	92	

Внутрилабораторную прецизионность оценивали по результатам определения вещества в ЦРМП. Эксперимент проводили на четырёх пластинках с несколькими треками для ЦРМП на каждой [1]. Результаты количественного определения содержания, высвободившегося пентоксифиллина, в ЦРМП (ω , %): 72; 69; 68; 66; 66; 65. Метрологические характеристики: $\omega\%$, $\bar{c}_{p.} = 67,7\%$; $RSD\% = 3,8\%$; $\Delta \omega\% = 2,58\%$ $E\% = 4,0\%$.

Заключение

Разработана высокоэффективная, чувствительная методика идентификации и количественного определения пентоксифиллина в микрочастицах, полученных на основе PLGA, методом ТСХ, а также проведена ее валидация. Данная методика имеет небольшую погрешность и не требует использования дорогостоящего оборудования. Из проведенного количественного определения пентоксифиллина в микрочастицах, полученных на основе PLGA (приготовленных с учетом всех ранее разработанных технологических параметров, а также с предварительным их разрушением), был получен следующий результат: среднее значение количества, высвободившегося пентоксифиллина из микрочастиц, по методу ТСХ составило – 67,7%.

По итогам исследования можно утверждать, что разработанная методика количественного определения пентоксифиллина в микрочастицах методом ТСХ, отвечает нормативным положениям и пригодна для фармацевтического анализа.

Литература (references)

1. Валидация аналитических методик для производителей лекарств / типовое руководство предприятие по производству лекарственных средств. – М.: Литтерра, 2008. – С. 59-65. [Validaciya analiticheskikh metodik dlya proizvoditelej lekarstv. Validation of analytical procedures for drug manufacturers. – Moscow: Litterra, 2008. – P. 59-65. (in Russian)]
2. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание. 02.09.2019. URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>. [Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 02.09.2019. URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php> (in Russian)]
3. Красиков В.Д. Основы планарной хроматографии. – СПб.: Химиздат, 2005. – С. 106. [Krasikov V.D. Osnovy planarnoj hromatografii. Fundamentals of planar chromatography. – St. Petersburg: Khimizdat, 2005. – P. 106. (in Russian)]
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 16-е издание. – М.: Новая волна, 2019. – 540 с. [Mashkovskij M.D. Lekarstvennyye sredstva. Medicines: 16th edition. – Moscow, Novaya volna, 2019. – 540 p. (in Russian)]
5. Тимченко Т.В., Погорелый В.Е., Воронков А.В., Макарова Л.М., Щербакова Л.И., Компанцев В.А., Медвецкий А.И., Платонова А.Ю. Экспериментальное изучение антитромбоцитарной активности микрочастиц пентоксифиллина на основе поли-DL-лактид-ко-гликолида в сравнении с пентоксифиллином // Фармация и фармакология. – 2019. – Т.7, №2. – С. 97-104. [Timchenko T.V., Pogorely V.E., Voronkov A.V., Makarova L.M., Shcherbakova L.I., Kompancev V.A., Medvecskij A.I., Platonova A.Yu. Experimental study of antiplatelet activity of pentoxifyllin micro-particles based on poly-DL-lactide-co-glycolide in comparison with pentoxifyllin // Pharmacy and pharmacology. – 2019. – T.7, №2. – P. 97-104.]

- Pogorelyj V.E., Voronkov A.V., Makarova L.M., Sherbakova L.I., Kompancev V.A., Medveckij A.I., Platonova A.Yu. Farmaciya i farmakologiya. Pharmacy and Pharmacology. – 2019. – V.7, N2. – P. 97-104. (in Russian)]
6. Тимченко Т.В., Щербакова Л.И., Компанцев В.А., Маркова О.М., Погорельый В.Е., Губанова Л.Б., Платонова А.Ю. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей пентоксифиллин // Патент РФ на изобретение № 2702012. Опубликовано 03.10.2019. Бюллетень № 28. [Timchenko T.V., Sherbakova L.I., Kompancev V.A., Markova O.M., Pogorelyj V.E., Gubanova L.B., Platonova A.Yu. Sposob polucheniya farmacevticheskoy kompozicii, soderzhashchej pentoksifillin // Patent of Russian Federation N2561332. Publication 03.10.2019. Bulletin N28. (in Russian)]
 7. ФСП-42-0055-7276-05. Пентоксифиллин таблетки пролонгированного действия. – М., 2011. [FSP-42-0055-7276-05. Pentoksifillin tabletki prolongirovannogo dejstviya. FSP-42-0055-7276-05. Pentoxifylline extended-release tablets. – Moscow, 2011. (in Russian)]
 8. European Pharmacopoeia 8.0. – V.I. – EDQM, 2013. – P. 42-79.

Информация об авторах

Тимченко Татьяна Викторовна – аспирант кафедры неорганической, физической и коллоидной химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. E-mail: akmivan@mail.ru

Мезенова Татьяна Дмитриевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры аналитической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. E-mail: akmivan@mail.ru

Компанцев Дмитрий Владиславович – доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. E-mail: akmivan@mail.ru

Маркова Ольга Михайловна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. E-mail: akmivan@mail.ru

Компанцев Владислав Алексеевич – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры неорганической, физической и коллоидной химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. E-mail: vladislavkompantsev@mail.ru

Зяблицева Надежда Сергеевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры неорганической, физической и коллоидной химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. E-mail: akmivan@mail.ru

Санникова Евгения Геннадиевна – кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры неорганической, физической и коллоидной химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. E-mail: Je-Je4ka2012@yandex.ru

Васина Татьяна Михайловна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры неорганической, физической и коллоидной химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России. E-mail: akmivan@mail.ru

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.