

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФУЗІДІЄВОЇ КИСЛОТИ У ГЕЛІ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ВУГРОВОЇ ХВОРОБИ I-II СТАДІЇ

А.Ю. Куликов, П.П. Байва, І.І. Баранова

*Національний фармацевтичний університет (Харків)*

### Вступ

Вугрова хвороба дуже поширене шкірне захворювання. За статистикою, їм страждає до 80% населення у віці від 12 до 25 років, і приблизно 30-40% осіб старше 25 років. Тенденція «дорослішання» цього захворювання зараз та його значний вплив на психоемоційну сферу, соціальний статус і громадську адаптацію хворих обумовлюють актуальність цієї проблеми та необхідність розробки нових ефективних засобів [3, 4, 8].

На базі Національного фармацевтичного університету нами був розроблений гель для лікування вугрової хвороби I-II стадії. До складу гелю у якості активної речовини була введена фузидієва кислота (ФК). Вона чинить виражену антимікробну дію. Високоактивна відносно *Staphylococcus* spp., особливо *Staphylococcus aureus* і *Staphylococcus epidermidis* (включаючи метицилін-резистентні штами), *Nocardia asteroides*, *Clostridium* spp. Менш активний відносно *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Neisseria* spp., *Bacteroides* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*. ФК активна відносно деяких найпростіших, включаючи *Giardia lamblia*, *Plasmodium falciparum* [7, 11].

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана у відповідності із планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету та є фрагментом теми «Технологія одержання оригінальних та комбінованих фармацевтичних засобів у різних лікарських формах» (№ державної реєстрації 0108U009174) та проблемної комісії «Фармація» МОЗ і НАМН України.

**Метою** нашого дослідження була розробка методики високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) для визначення ФК в новому лікарському засобі, а також її валідація для цілей кількісного визначення за вимогами Державної фармакопеї України (ДФУ).

### Матеріали та методи дослідження

Ідентифікація обраних компонентів лікарських рослин була виконана згідно вимогам ДФУ 2.2.29 [1]. На хроматограмі випробовуваного розчину час утримування піків ФК відповідають часам утримування піків ФК на хроматограмі розчину порівняння. Кількісне визначення ФК складається з наступних етапів: приготування випробовуваного розчину та розчину порівняння [2, 9, 10]. Для виконання аналізу використовували 10 мкл розчину порівняння та випробовуваного розчину хроматографували на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором, отримуючи не менше 3 хроматограм у наступних умовах: колонка  $\mu$ -Porasil, розміром 300 мм x 4 мм, заповнено сорбентом з розміром часток 5 мкм або аналогічна; предколонка:  $\mu$ -Porasil 60 мм x 4 мм, заповнено сорбентом з розміром часток 5 мкм або аналогічна; рухома фаза: гексан – метилен хлористий – етанол 96% (69:25:6), дегазована зручним способом; температура термостату колонки 30,0°C; швидкість рухомої фази 1,5 мл/хв; детектування за довжиною хвилі 254 нм. За таких умов пік кислоти ФК відокремлюється від допоміжних компонентів гелю. Умови для виконання хроматографічної системи: ефективність хроматографічної системи, що розрахована за піком ФК, має бути не менше 1000 тт; фактор симетрії піку кислоти ФК бути не більше 2,0; відносне стандартне відхилення площ піків ФК має відповідати вимогам 2.2.46 (ДФУ 1.2) [5, 6, 12-14].

### Отримані результати та їх обговорення

За допомогою хроматографічних досліджень нами була встановлена специфічність методики. Це підтверджується хроматограмами плацебо та ФК (рис. 1-3.) Встановлено, що на хроматограмі розчину плацебо (рис. 1) відсутні піки з часом утримування, який співпадає з часом утримування ФК (рис. 3).

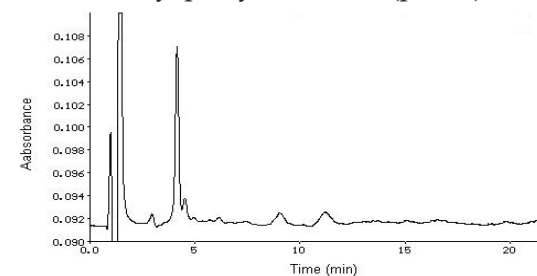


Рис. 1. Хроматограма розчину плацебо.

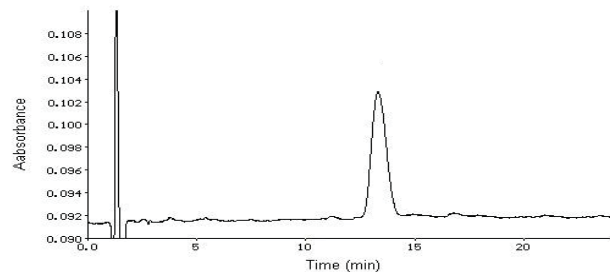


Рис. 2. Хроматограма розчину стандартного зразку.

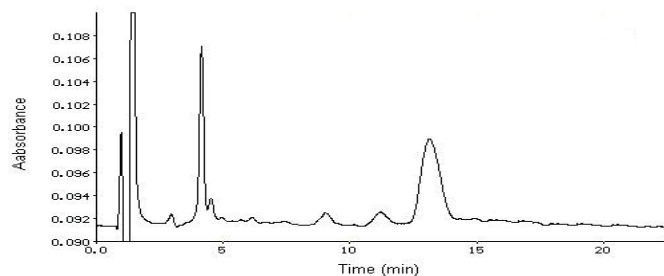


Рис. 3. Хроматограма випробовуваного розчину (препарат).

В розроблених умовах була перевірена залежність відгуку детектору від концентрації ФК. Для отримання даних про лінійну залежність готувались розчини ФК, що містили у своєму складі 80%, 90%, 100%, 110% та 120% від номінального складу. Розчини хроматографували тричі. За отриманими даними було побудовано графік (рис. 4).

Отримана лінійна залежність ( $Y=a+bX$ ) мала такі ознаки (табл. 1).

Таблиця 1

Ознаки лінійної залежності ( $Y=a+bX$ ) відгуку детектору від концентрації ФК

A	$2 \cdot 10^5$
Sa	$1 \cdot 10^5$
B	$66,4 \cdot 10^3$
Sb	$0,6 \cdot 10^3$
R	0,9991
Sd	$0,9 \cdot 10^2$
Межа детектування	4,97 мкг/мл
Межа кількісного визначення	15,1 мкг/мл

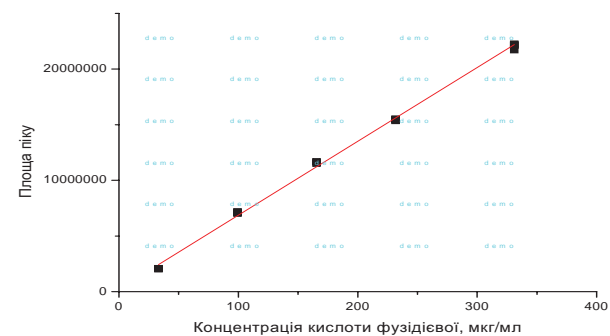


Рис. 4. Залежність відгуку детектору (площа піку) від концентрації ФК.

Для визначення точності методу хроматографували розчин стандартного зразку ФК, та за отриманими даними було розраховано відсоток знайденої ФК (табл. 2).

Таблиця 2

#### Відсоток знайденої ФК у розчинах

Концентрація кислоти фузидієвої у стандартному розчині, мкг/мл	Знайдено кислоти фузидієвої, мкг/мл	% знайдено
120,0	120,5	100,42
135,0	135,3	100,23
150,0	149,9	99,94
165,0	164,7	99,83
180,0	179,6	99,77
Середнє значення		100,04
RDS, %		0,34

Таблиця 3

#### Дані, отримані при використанні методу стандартних доданків

Доданок кислоти фузидієвої, мг	Знайдено кислоти фузидієвої, мг		%
	З доданком	Без доданка	
-	-	15,22	-
3,05	18,29	14,79	97,2
6,10	22,02	15,92	104,6
9,15	24,80	15,65	102,8
12,20	27,28	15,08	99,1
Середнє значення			100,9

Для перевірки повільності методики було використано метод стандартних доданків. Результати, що було отримано при валідація методики за даним показником, наведено у таблиці 3.

Також було перевірено відтворюваність методики. У різні дні було проведено кількісне визначення вмісту ФК в гелі (табл. 4).

Таблиця 4

## Кількісне визначення вмісту ФК в гелі

% від номінального вмісту	Збіжність середнє, % $\pm$ RSD, %	Прецизійність (відтворюваність)		
		Середнє, % $\pm$ RSD, %		
		День 1	День 2	День 3
80	100,2 $\pm$ 0,1	100,05 $\pm$ 0,09	100,3 $\pm$ 0,2	100,11 $\pm$ 0,06
100	100,03 $\pm$ 0,08	99,98 $\pm$ 0,05	100,2 $\pm$ 0,3	99,9 $\pm$ 0,1
120	100,2 $\pm$ 0,2	100,0 $\pm$ 0,3	99,95 $\pm$ 0,05	100,1 $\pm$ 0,1

Отримані дані показують, що методика є стабільною та відтворюється у різні дні.

## Висновки

1. На основі розрахованих даних ФК в препараті, була розроблена ВЕРХ методика для кількісного визначення ФК в розробленому гелі місцевої дії для лікування вугрової хвороби I-II стадії.

2. Підтверджена специфічність методики хроматограмами плацебо, розчину порівняння та типовою хроматограмою випробовуваного розчину активної речовини, що визначалися. Встановлено, що на визначення ФК допоміжні речовини не впливають. Проведено дослідження щодо валідації методики ВЕРХ кількісного визначення ФК у гелі. Відмічено, що запропоновані сучасні методики відповідали вимогам ДФУ та забезпечували специфічність, точність та відтворюваність результатів, що дозволяє одночасно проводити кількісне визначення та ідентифікацію досліджуваних речовин у гелі.

3. Отримані дані в перспективі будуть використані при розробці проекту методики контролю якості на розроблений гель місцевої дії.

## Література

1. Державна Фармакопея України. Доп. 1 / Держ. п-во "Науково-експертний фармакопейний центр". – [1-е вид.]. – Харків: РІРЕГ, 2004. – 520 с.
2. Валідація аналітичних методик для виробителів лікарств: типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / [под ред. В.В. Береговых]. – М.: Литтерра, 2008. – 132 с.

3. Клименко А.В. Вугрова хвороба (акне) і акнеподібні дерматози (розацеа, демодикоз): етіологія, патогенез, клінічний перебіг та визначення перспективних підходів до диференціальної діагностики / А.В. Клименко, В.І. Степаненко // Український журнал дерматології, венерології, косметології. – 2008. – № 2. – С. 19-27.

4. Резніченко Н.Ю. Вугрова хвороба: пошук нових шляхів патогенетичного лікування / Н.Ю. Резніченко. – Запоріжжя: Просвіта, 2007. – 108 с.

5. Спутник хроматографіста. Методы жидкостной хроматографии / [О.Б. Рудаков, И.А. Востров, С.В. Федоров и др.]. – Воронеж: Водолей, 2004. – 528 с.

6. Bliester D. Validating chromatographic methods: a practical guide / D. Bliester. – New York, London : John Wiley & Sons, 2006. – 304 p.

7. Brown E.M. Fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus* isolates / E.M. Brown, P. Thomas // *Lancet*. – 2002. – Vol. 359. – P. 803.

8. Cunliffe W.I. Acne / W.I. Cunliffe. – Chicago, 1990. – 391 p.

9. Handbook of affinity chromatography / Ed. David S. Hage. – London; New York; Singapore: Boca Raton; CRC Press/Taylor & Francis, 2006. – 857 p.

10. Ermer J. Validation in pharmaceutical analysis: Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data / J. Ermer, H.J. Ploss // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2005. – Vol. 37. – P. 859-870

11. Fusidic acid cream for impetigo: judicious use is advisable / E.M. Brown, R. Wise, O. Sule [et al.] // *BMJ*. – 2002. – Vol. 324. – P. 1394.

12. Trace determination of pesticide residues. – New York, London: Academic Press, 2004. – 510 p.

13. Shabir G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization / G.A. Shabir // *J. Chromatogr. A*. – 2003. – Vol. 987. – P. 57-66.

14. Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography / A. Streygel, W.W. Yau, J.J. Kirkland, D.D. Bly. – New York, London : John Wiley & Sons, 2009. – 494 p.

## Резюме

Куликов А.Ю., Байва П.П., Баранова І.І. Ідентифікація та кількісне визначення фузидієвої кислоти у гелі для лікування вугрової хвороби I-II стадії.

Розробили методики вискоєфективної рідинної хроматографії для визначення фузидієвої кислоти в новому лікарському засобі, а також її валідацію для цілей кількісного визначення за вимогами Державної фармакопеї України (ДФУ). Встановлено, що запропоновані сучасні методики відповідали вимогам

ДФУ, забезпечують специфічність, точність та відтворюваність результатів, дозволяють одночасно проводити кількісне визначення та ідентифікацію досліджуваних речовин у розробленому гелі.

**Ключові слова:** угрива хвороба, гель, фузидієва кислота, високоефективна рідинна хроматографія.

#### Резюме

**Куликов А.Ю., Байва П.П., Баранова И.И.** *Идентификация и количественное определение фузидиевой кислоты в геле для лечения угревой болезни I-II стадии.*

Разработали методики высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения фузидиевой кислоты в новом лекарственном средстве, а также ее валидацию для целей количественного определения по требованиям Государственной фармакопеи Украины (ГФУ). Установлено, что предложенные современные методики соответствовали требованиям ГФУ, обеспечивают специфичность, точность и воспроизводимость результатов, позволяющих одновременно проводить количественное определение и идентификацию исследуемых веществ в геле.

**Ключевые слова:** угревая болезнь, гель, фузидиевая кислота, высокоэффективная жидкостная хроматография.

#### Summary

**Kulikov A.Y., Bayva P.P., Baranova I.I.** *Identification and quantification of fuzid acid gel acne treatment stage I-II.*

A method of high performance liquid chromatography to determine the fuzid acid in the new medicines, as well as its validation for the quantitative determination of the requirements for the state pharmacopoeia of Ukraine. Found that the proposed methodology meet the requirements of state pharmacopoeia of Ukraine provide specificity, accuracy and reproducibility of results, enabling both a quantitative detection and identification of analytes in the gel.

**Key words:** acne, gel, fuzid acid, high performance liquid chromatography.

*Рецензент: д.фарм.н., проф. Л.Г. Алмакаєва*

УДК 618.3+618.5+618.7]-06-036-084:616.018.2

## МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АКЦЕНТЫ В ЛЕЧЕНИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВАГИНОЗА

**И.В. Лахно, О.В. Неелова**

*Харьковская медицинская академия последипломного образования*

Бактериальный вагиноз (БВ) представляет собой невоспалительное заболевание, сопровождающееся интенсивным размножением анаэробных микроорганизмов с практически полным исчезновением лактобациллярного биотопа. По сути, БВ опровергает классический постулат: «один микроорганизм – одно заболевание». При этом БВ не имеет этиологически значимого возбудителя и не передается половым путем. БВ характеризуется избыточным размножением анаэробных микроорганизмов: *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp., *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus* spp. Это является следствием блока воспалительных механизмов ответа организма женщины на наличие анаэробов и манифестирует экологическую катастрофу во влагалище.

У пациенток с БВ отмечаются иммунные нарушения в виде незавершенного фагоцитоза и снижения защитных свойств вагинального секрета, расстройства эндокринной регуляции функции слизистой влагалища, что сопровождается появлением адгезивных свойств и интенсивным размножением патогенной и условно-патогенной микрофлоры [1, 4, 5, 6, 17]. Причины отсутствия воспалительной реакции организма можно представить следующим образом. Продукты метаболизма анаэробных микроорганизмов блокируют участие провоспалительных цитокинов вагинального секрета в привлечении нейтрофильных гранулоцитов в воспалительный каскад на уровне слизистой влагалища. То есть размножение анаэробов приводит к отсутствию миграции лейкоцитов в очаг микробной инвазии, незавершенному фагоцитозу и отсутствию секреторной дегрануляции нейтрофилов. В процессе последней в физиологических условиях из лейкоцитов высвобождаются катионные полипептидные факторы защиты [2, 3]. С позиций электро-химических взаимодействий патогенез БВ представляет собой преобладание анионных форм микроорганизмов при полном отсутствии положительно заряженных лактобацилл и катионных