

РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ СТОМАТОЛОГІЧНИХ ЛІКАРСЬКИХ ПЛІВОК ІЗ ХЛОРГЕКСИДИНОМ, МЕТРОНІДАЗОЛОМ ТА ГЛЮКОЗАМІНОМ

Ключові слова: стоматологічні плівки, методики контролю якості, високоефективна рідинна хроматографія

Розроблення нових стоматологічних пролонгованих лікарських засобів є надзвичайно важливим, зважаючи на високу поширеність захворювань пародонта у світі та в Україні [1, 2]. Актуальним також є створення комбінованих лікарських засобів, що впливали б на різні ланки патогенезу захворювання та мали етіотропну дію. Враховуючи вищезазначене, виконано фармацевтичну розробку стоматологічних плівок на основі хлоргексидину, метронідазолу та глюкозаміну, що мають тривалу дію та одночасно антибактеріальний, протизапальний та репаративний ефекти.

Основним етапом розроблення нового лікарського засобу є розроблення технологічних методик контролю якості.

Метою цієї роботи було розроблення методик визначення та виявлення активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) – глюкозаміну, хлоргексидину та метронідазолу у складі стоматологічного лікарського засобу – пародонтальних плівок та підтвердження відтворюваності розроблених методик.

Дослідження здійснено на базі кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації Харківської медичної академії післядипломної освіти.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктами дослідження були стоматологічні плівки на основі хлоргексидину, метронідазолу та глюкозаміну, їх кількісний та якісний склад.

Ідентифікацію та кількісне визначення глюкозаміну гідрохлориду виконували методом ВЕРХ на рідинному хроматографі Agilent 1100 (США). Рухома фаза: елюент А – фосфатний буфер з рН 4,7, елюент Б – ацетонітрил (60:40). Швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв. Температура колонки – 25 °С, об'єм проби – 50 мкл. Хроматографічна колонка розміром 250 × 4,6 мм, заповнена сорбентом силікагель октилсилільний для хроматографії Р із розміром частинок 5 мкм (Grace Spherisorb NH₂). Детектування здійснювали за допомогою спектрофотометричного детектора за довжини хвилі 215 нм. Для одержання фосфатного буфера з рН 4,7 розчиняли 6,805 г калію дигідрофосфату в 900 мл води високоочищеної і доводили рН до 4,7 розчином натрію гідроксиду Р, після чого доводили об'єм у мірній колбі на 1 000 мл до мітки. Одержаний буфер фільтрували через мембранний фільтр Nylon 0,45 мкм.

Для приготування випробуваного розчину плівок близько 0,032 г (точна наважка) плівок вміщували у мірну колбу ємністю 10 мл, додавали 5 мл розчинника (вода високоочищена), перемішували на орбітальному шейкері протягом 10 хв до повного розчинення зразка. Доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 10 мл, перемішували та фільтрували через мембранний фільтр із розміром пор 0,45 мкм.

Для приготування розчину порівняння близько 10 мг (точна наважка) стандартного зразка глюкозаміну гідрохлориду вміщували у мірну колбу ємністю 50 мл, додавали 30 мл розчинника (вода високоочищена), перемішували на орбітальному шейкері протягом 10 хв до повного розчинення зразка. Доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 50 мл, перемішували та фільтрували через мембранний фільтр із розміром пор 0,45 мкм. 5 мл одержаного розчину переносили у мірну колбу ємністю 20 мл та доводили об'єм розчину водою високоочищеною до мітки.

Вміст глюкозаміну гідрохлориду (X) у мг розраховували за формулою:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 5 \cdot 20 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 50 \cdot 20 \cdot m_1 \cdot 100} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot 10},$$

де S_0 – середнє значення площ піків глюкозаміну гідрохлориду, обчислене із хроматограм розчину порівняння;

S_1 – середнє значення площ піків глюкозаміну гідрохлориду, обчислене із хроматограм досліджуваного розчину;

m_0 – маса наважки стандартного зразка глюкозаміну гідрохлориду, мг;

m_1 – маса наважки зразка, г;

P – вміст глюкозаміну гідрохлориду в стандартному зразку.

Ідентифікацію та кількісне визначення хлоргексидину біглюконату здійснювали спектрофотометричним методом за довжини хвилі 253 нм, використовуючи однокомпонентний однохвильовий аналіз (спектрофотометр СФ-46, ЛОМО).

Із цією метою готували 2 основних розчини: випробуваний розчин та розчин стандартного зразка (СЗ). Як компенсаційний розчин використовували розчин, виготовлений із плівок без хлоргексидину біглюконату аналогічно випробуваному.

Для приготування випробуваного розчину близько 0,13 г плівок (точна наважка) розчиняли в мірній колбі на 50 мл у 20 мл води очищеної Р. Об'єм доводили до 50 мл водою очищеною Р. 5 мл одержаного розчину переносили у мірну колбу на 20 мл і доводили об'єм водою очищеною до мітки.

Для приготування розчину СЗ близько 50 мг хлоргексидину біглюконату (точна наважка) у перерахунку на суху речовину вміщували у мірну колбу на 100 мл і розчиняли у 50 мл води очищеної Р. Об'єм доводили до 100 мл водою очищеною Р. 2 мл одержаного розчину переносили у мірну колбу на 100 мл і доводили об'єм водою очищеною Р до мітки.

Кількісне визначення хлоргексидину біглюконату виконували спектрофотометрично за довжини хвилі 253 нм у кюветі з шаром завтовшки 10 мм. Паралельно вимірювали оптичну густину розчину СЗ. Як розчин порівняння використовували компенсаційний розчин. Вміст хлоргексидину біглюконату розраховували за формулою:

$$X = \frac{A \cdot m \cdot P}{A_0 \cdot 4\,000},$$

де A – оптична густина випробуваного розчину, нм;

A_0 – оптична густина розчину СЗ хлоргексидину біглюконату, нм;

m – маса наважки СЗ хлоргексидину біглюконату, мг;

P – масова частка хлоргексидину біглюконату у СЗ, %.

Ідентифікацію метронідазолу здійснювали за методикою Ph. Eur. [3]. До однієї плівки додавали 1 мл води, 10 мг цинкового пилу, 2 мл 2 М розчину натрію гідроксиду і нагрівали протягом 5 хв. З'являється червоно-фіолетове забарв-

лення, яке у разі додавання розведеної хлористоводневої кислоти переходило у жовте, а у разі додавання розчину натрію гідроксиду – знову у червоно-фіолетове.

Також для ідентифікації метронідазолу застосовували тонкошарову хроматографію (ТШХ) [4]. Для одержання хлороформної витяжки до двох плівок додавали 2–3 мл води для повного переведення їх у гелеподібний стан, 25%-й розчин аміаку до рН 7–8 і тричі екстрагували 3 мл хлороформу. Після чого хлороформні витяжки об'єднували і випарювали до об'єму 2–3 мл (розчин І).

Для одержання робочого стандартного зразка метронідазолу (РСЗ) до 1 мг (точна наважка) фармакопейного стандартного зразка метронідазолу додавали 10 мл хлороформу. Після повного розчинення метронідазолу розчин випарювали до об'єму 2–3 мл і досліджували.

На лінію старту хроматографічної пластинки Сорбфіл (АФ А УФ 254) розміром 10 × 20 см наносили по 2 мкл розчину І та розчину РСЗ. Пластинку вміщували в хроматографічну камеру із сумішшю розчинників: н-гексан–метиленхлорид–метанол–розчин амоніаку концентрований (60:30:10:1) і хроматографували висхідним способом. Коли фронт розчинників піднімався до 10 см від лінії старту, пластинку виймали, висувували у теплом повітрі та проявляли реактивом Драгендорфа, модифікованим за Мунье (0,85 г бісмуту нітрату основного розчиняють у 40 мл води і 10 мл оцтової кислоти; 8 г калію йодиду розчиняють у 20 мл води; змішують у рівних об'ємах. До 10 мл одержаного розчину додають 100 мл води і 20 мл оцтової кислоти).

Для кількісного визначення метронідазолу близько 0,17 г плівок (точна наважка) вміщували в мірну колбу ємністю 25 мл і додавали 10 мл метанолу. Колбу з пробою встановлювали на ультразвуковий нагрівник на 15 хв, доводили об'єм розчину до мітки водою очищеною Р і перемішували. 1 мл одержаного розчину переносили в мірну колбу на 10 мл і доводили об'єм водою очищеною Р до мітки. Перед хроматографуванням фільтрували розчин крізь мембранний фільтр із діаметром пор 0,45 мкм.

Для одержання РСЗ метронідазолу близько 0,005 г (точна наважка) фармакопейного СЗ метронідазолу переносили в мірну колбу ємністю 25 мл і додавали 10 мл метанолу. Колбу з пробою встановлювали на ультразвуковий нагрівник на 15 хв, доводили об'єм розчину до мітки водою і перемішували. 2 мл одержаного розчину переносили в мірну колбу на 50 мл і доводили об'єм водою очищеною Р до мітки.

Для приготування буферного розчину розчиняли 2,0 г калію дигідрофосфату у 800 мл води та доводили рН до 2,5 розчином кислоти фосфорної 85%-ї. Об'єм розчину доводили до 1 000 мл водою та перемішували.

По 20 мкл досліджуваного розчину та розчину порівняння поперемінно хроматографували на рідинному хроматографі з УФ-детектором, отримуючи не менше 5 хроматограм для кожного з розчинів, у таких умовах:

– колонка Symmetry C 18 розміром 250 × 4,6 мм із розміром частинок 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»;

– рухома фаза – буферний розчин: ацетонітрил (50:50);

– швидкість рухомої фази – 1,5 мл/хв;

– довжина хвилі детектування – 230 нм;

– температура колонки – 35 °С.

Вміст метронідазолу в лікарських плівках (ЛП) у мг розраховували за формулою:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 100 \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot 100 \cdot 100},$$

де S_1 – середнє значення площ піків метронідазолу, розраховане з хроматограм досліджуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків метронідазолу, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_1 – наважка препарату, г;

m_0 – наважка СЗ метронідазолу, г;

P – чистота стандартного зразка метронідазолу, %.

Вміст метронідазолу в 1 см² ЛП має становити 0,08 мг/см² (при нормі 0,072–0,088 мг/см²).

Перевірку придатності використаних хроматографічних систем здійснювали згідно з ДФУ, вид. 1 (п. 2.2) [4] за основними умовами:

– ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком глюкозаміну, на хроматограмі розчину порівняння має бути не менше 5 000, а метронідазолу – не менше 1 500 теоретичних тарілок;

– коефіцієнт симетрії піка, розрахований за піком глюкозаміну, має бути не менше 3,0, а метронідазолу – від 0,8 до 2,0;

– відносне стандартне відхилення, розраховане для площі піка глюкозаміну та метронідазолу (із хроматограм розчину порівняння) має бути не більше 2,0%.

– ступінь розділення між будь-якими піками в розчині препарату має бути не менше 5.

Результати дослідження та обговорення

Кількісне та якісне визначення глюкозаміну гідрохлориду, виконане методом ВЕРХ, свідчить, що описані умови хроматографування забезпечують достатню селективність та ефективність розділення. Час утримання піка глюкозаміну гідрохлориду становить 4,16 хв (рис. 1, 2).

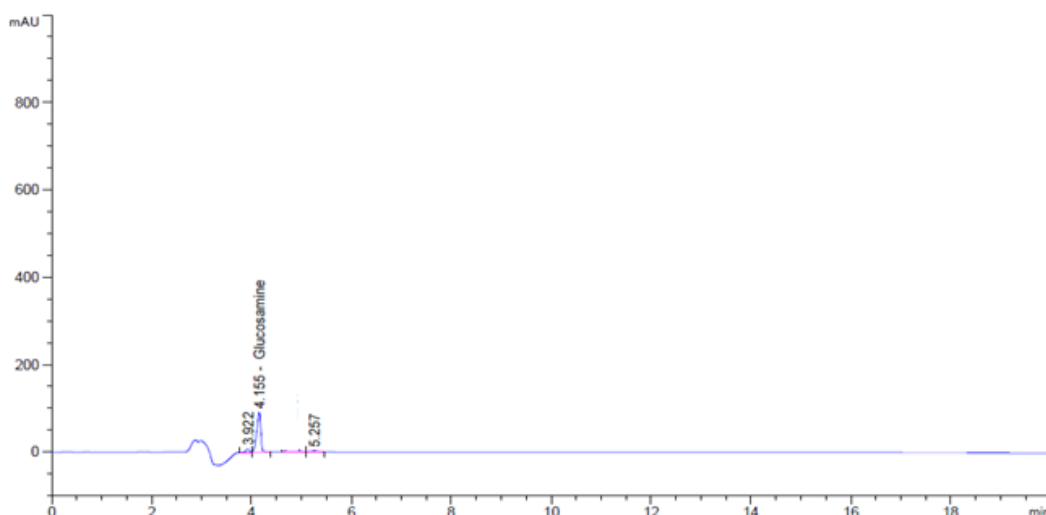


Рис. 1. Хроматограма розчину порівняння

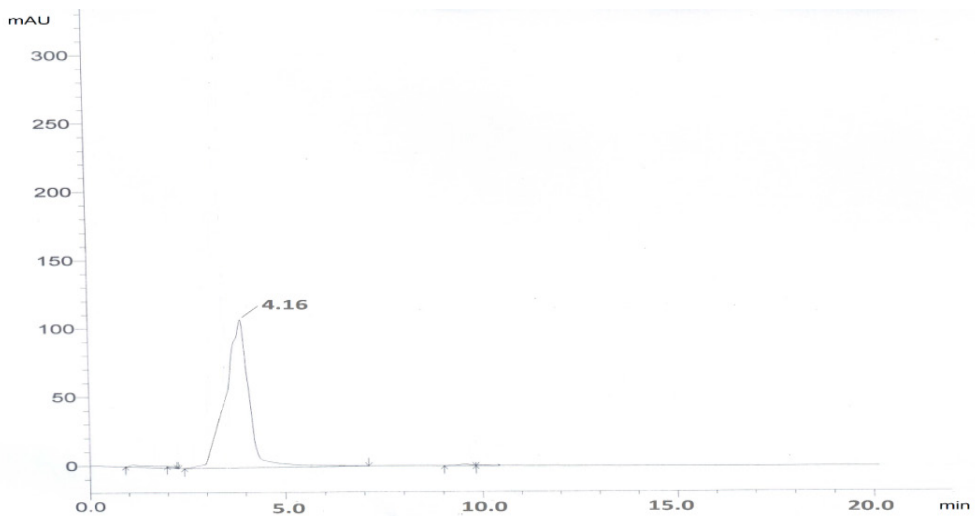


Рис. 2. Хроматограма досліджуваного розчину

Відповідно до результатів експериментальних досліджень щодо визначення глюкозаміну гідрохлориду встановлено, що його вміст у 1 cm^2 становить $0,5 \pm 0,0152 \text{ mg/cm}^2$ (при нормі $0,45\text{--}0,55 \text{ mg/cm}^2$).

Під час ідентифікації хлоргексидину біглоконату на спектрах поглинання випробуваного розчину та розчину СЗ хлоргексидину біглоконату в УФ-області спостерігали плече від 232 до 242 нм і максимум поглинання $253 \pm 2 \text{ nm}$. Спектр поглинання випробуваного розчину та розчину СЗ наведено на рис. 3.

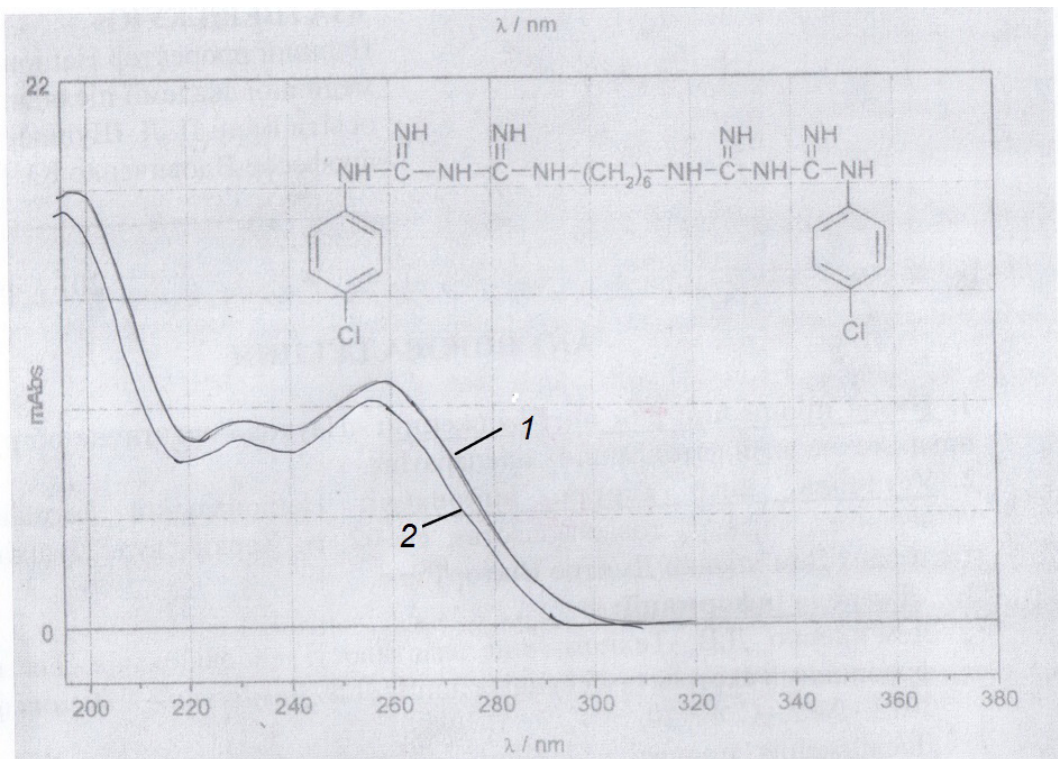


Рис. 3. Спектр поглинання розчину СЗ (1) та випробуваного розчину (2)

Згідно з результатами експериментальних досліджень щодо визначення хлоргексидину біглюконату встановлено його вміст у 1 см², що становить $0,08 \pm 0,002$ мг/см² (при нормі 0,072–0,088 мг/см²).

У разі ідентифікації метронідазолу (метод ТШХ) основні плями на хроматограмі досліджуваних розчинів за інтенсивністю та значеннями Rf відповідали основній плямі робочого стандартного зразка – Rf становить 0,8.

У разі ідентифікації метронідазолу (метод ВЕРХ) на хроматограмах досліджуваного розчину час утримання піка метронідазолу збігається з часом утримання піка метронідазолу на хроматограмах розчину порівняння з точністю $\pm 2\%$. При цьому час виходу піка для метронідазолу дорівнює 2 хв.

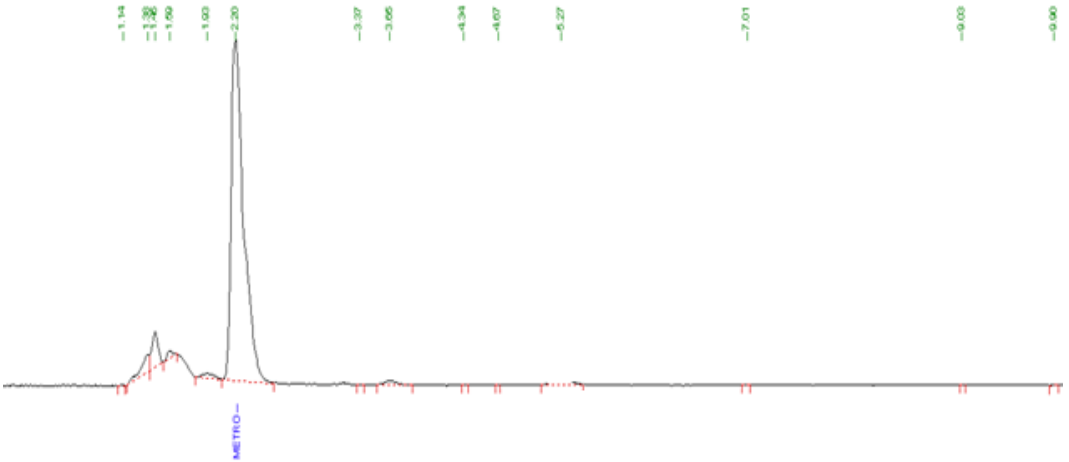


Рис. 4. Хроматограма розчину порівняння

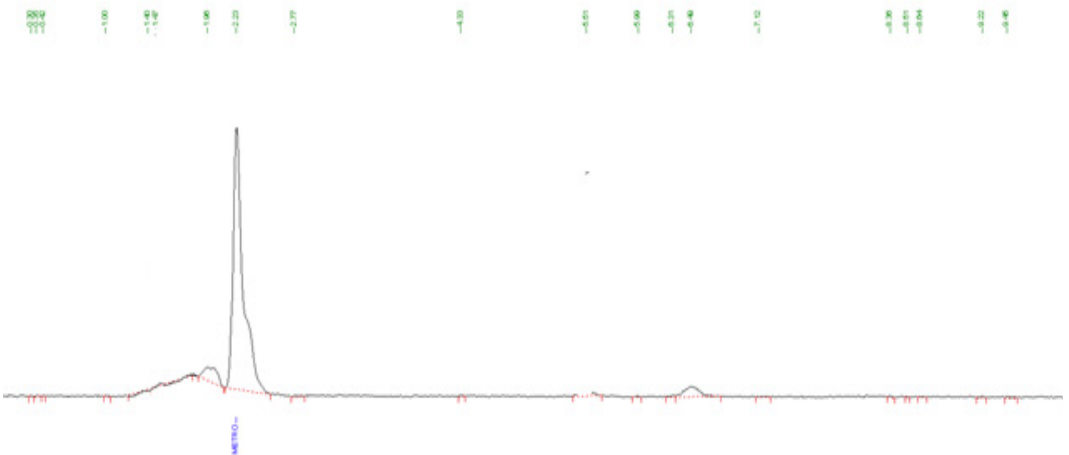


Рис. 5. Хроматограма досліджуваного розчину

Вміст метронідазолу в 1 см² ЛП становить $0,079 \pm 0,001$ мг/см² (при нормі 0,072–0,088 мг/см²).

У таблиці наведено результати кількісного визначення АФІ в опрацьованих плівках та їхні метрологічні характеристики.

Кількісний вміст активних фармацевтичних інгредієнтів у плівках

Інгредієнти	Вміст, мг/см ²	Визначено		
		мг/см ²	%	метрологічна характеристика
Глюкозаміну гідрохлорид	0,5	0,48	96	$\bar{X} = 99,2$ $S(X) = 3,63$ $S\bar{x} = 3,67$ $\varepsilon = \pm 3,04\%$ $X \pm S\bar{x} = 99,2 \pm 3,04$
		0,49	98	
		0,48	96	
		0,52	104	
		0,51	102	
		сер. 0,5		
Хлоргексидину біглоконат	0,08	0,081	101,25	$\bar{X} = 99,5$ $S(X) = 2,88$ $S\bar{x} = 2,32$ $\varepsilon = \pm 2,6\%$ $X \pm S\bar{x} = 99,5 \pm 2,6$
		0,082	102,50	
		0,08	100,00	
		0,079	98,75	
		0,076	95,00	
		сер. 0,08		
Метронідазол	0,08	0,080	100,00	$\bar{X} = 99,5$ $S(X) = 1,274$ $S\bar{x} = 1,10$ $\varepsilon = \pm 1,28\%$ $X \pm S\bar{x} = 99,5 \pm 1,28$
		0,079	98,75	
		0,081	101,25	
		0,08	100,00	
		0,078	97,50	
		сер. 0,079		

Перспективою подальших досліджень є використання розроблених методик контролю якості для технологічного контролю стоматологічних плівок на основі метронідазолу, хлоргексидину та глюкозаміну.

В и с н о в к и

1. Розроблено методики визначення та виявлення глюкозаміну гідрохлориду, метронідазолу та хлоргексидину біглоконату у складі лікарських стоматологічних плівок.

2. Кількісні та якісні дослідження АФІ, що проведено методами ВЕРХ та ТШХ (метронідазол) показали, що описані умови хроматографування забезпечують відтворюваність методик контролю якості досліджених стоматологічних плівок.

3. Вміст метронідазолу, хлоргексидину біглоконату та глюкозаміну гідрохлориду в опрацьованих стоматологічних плівках відповідає встановленим нормам допустимих відхилень $\pm 10\%$ і становить $0,079 \pm 0,001$ мг/см², $0,08 \pm 0,002$ мг/см² та $0,5 \pm 0,015$ мг/см² відповідно.

Список використаної літератури

1. Власенко І. О., Давтян Л. Л. Технологічний прийом створення двошарових лікарських плівок на полімерній основі // Фармац. журн. – 2010. – № 6. – С. 53–54.
2. Тимченко І. М., Давтян Л. Л., Власенко І. О. та ін. Обґрунтування фармакокінетичних показників лікарських плівок для задач математичного моделювання // Мед. інформатика та інженерія. – 2011. – № 1. – С. 45–48.
3. European Pharmacopoeia. 4th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2001. – 2416 p.
4. Державна фармакопея України / Державне п-во «Науково-експериментальний фармакопейний центр». 1-е вид., доп. 2. – Харків: PIPEГ, 2008. – 620 с.

Надійшла до редакції 1 серпня 2016 року.

Л. Л. Давтян¹, А. С. Воронкина², О. В. Чубенко³, В. В. Трохимчук¹

¹ *Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика, г. Киев*

² *Винницкий национальный медицинский университет им. М. И. Пирогова*

³ *Харьковская медицинская академия последипломного образования*

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ ПЛЁНОК С ХЛОРГЕКСИДИНОМ, МЕТРОНИДАЗОЛОМ И ГЛЮКОЗАМИНОМ

Ключевые слова: стоматологические плёнки, методы контроля качества, высокоэффективная жидкостная хроматография

АННОТАЦИЯ

В связи с широким распространением воспалительных заболеваний пародонта у населения различных возрастных категорий чрезвычайно актуальной становится разработка новых пролонгированных комбинированных стоматологических лекарственных средств в виде пародонтальных плёнок. Но новая комбинация действующих веществ и лекарственной формы вызывает необходимость разработки новых методов контроля качества.

Цель этой работы – разработка методов качественного и количественного определения метронидазола, хлоргексидина биглюконата и глюкозамина гидрохлорида для пародонтальных плёнок на полимерной основе.

В качестве методов контроля качества для стоматологических плёнок были использованы спектрофотометрический метод в ультрафиолетовой области для хлоргексидина биглюконата, высокоэффективная жидкостная хроматография для глюкозамина гидрохлорида, тонкослойная хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография для метронидазола.

В результате проведённых исследований были разработаны методы качественного и количественного анализа глюкозамина гидрохлорида, хлоргексидина биглюконата и метронидазола в составе стоматологических плёнок и подтверждена воспроизводимость этих методик.

Содержание активных фармацевтических ингредиентов в исследованных стоматологических плёнках соответствует нормам допустимых отклонений $\pm 10\%$ и составляет $0,079 \pm 0,001$ мг/см² для метронидазола, $0,08 \pm 0,002$ мг/см² для хлоргексидина биглюконата и $0,5 \pm 0,015$ мг/см² для глюкозамина гидрохлорида.

L. L. Davtyan¹, A. S. Voronkina², O. V. Chubenko³, V. V. Trohimchuk¹

¹ *Shupyk National Medical Academy of Post-graduate Education, Kyiv*

² *National Pyrogov Memorial Medical University, Vinnytsia*

³ *Kharkiv Medical Academy of Post-graduate Education*

DEVELOPMENT OF METHODS OF QUALITY CONTROL FOR STOMATOLOGIC FILMS CONTAINING CHLORHEXIDINE, METRONIDAZOLE AND GLUCOSAMINE

Key words: stomatologic films, methods of quality control, high performance liquid chromatography

ABSTRACT

Because of extensive grafting of inflammatory periodontal diseases in the population of different age groups the development of new prolonged combined dental medicines in the form of periodontal films is extremely important. But the new combination of active ingredients and the dosage form is a need to develop new methods of quality control.

The purpose of this work was the development of methods of qualitative and quantitative analysis of glucosamine, chlorhexidine and metronidazole consisting in polymer based periodontal films.

As methods of quality control for periodontal films were used spectrophotometry in ultraviolet region for chlorhexidine bigluconate, high performance liquid chromatography for glucosamine hydrochloride, thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography for metronidazole.

As a result of research methods of qualitative and quantitative analysis of glucosamine hydrochloride, chlorhexidine bigluconate and metronidazole consisting in stomatological films have been developed and the reproducibility of these methods has been confirmed.

Content of active pharmaceutical ingredients in followed periodontal films complies with norms of tolerance $\pm 10\%$ (content of metronidazole is $0,079 \pm 0,001$ mg/sm², content of chlorhexidine bigluconate is $0,08 \pm 0,002$ mg/sm², content of glucosamine is $0,5 \pm 0,015$ mg/sm²).

Електронна адреса для листування з авторами: algot2808@gmail.com