

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА DIOL В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Э. А. Пашковская

Научный руководитель: профессор, д.х.н. А. А. Бакибаев

Научный консультант: заведующий лаб. аналитической химии Отдела фармакологических разработок
ООО «ИФАР» А. Е. Квач

Национальный исследовательский Томский государственный университет,

Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36.

E-mail: elvirapashkovskaya@gmail.com

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HPLC METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ACTIVE SUBSTANCE DIOL IN DOSAGE FORM

E. A. Pashkovskaya

Scientific Supervisor: Prof., PhD A. A. Bakibaev

Scientific consultant: head of the laboratory of Analytical Chemistry, Department of Pharmacological Development, "IFAR", A. E. Kwach

Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: elvirapashkovskaya@gmail.com

***Abstract.** In this work was studied the substance DIOL, which has a therapeutic effect against the symptoms of Parkinson's disease (in preclinical studies were conducted at the Institute of Organic Chemistry in Novosibirsk). In the course of the study conditions were chosen for quantifying the substance of DIOL in the dosage form. The result of the work is the developed procedure for determining the DIOL by HPLC, which corresponds to all parameters considered in the validation process.*

Введение. На сегодняшний день одним из заболеваний, трудно поддающихся лечению, является болезнь Паркинсона. Ее проявления (мышечная ригидность, гипокинезия, тремор, постуральная неустойчивость) купируются с помощью комплексной терапии препаратами, одним из которых является Леводопе. Кроме побочных эффектов (тошнота, головная боль, головокружение, аритмия и пр.) недостатком данного препарата является его высокая стоимость, что заставляет задуматься о разработке более доступного для пациентов аналога Леводопе, способного улучшить качество жизни больных с диагнозом паркинсонизм. Разработать препарат, который можно использовать при такой терапии, возможно на основе запатентованной Новосибирским институтом органической химии (НИОХ) молекулы 3-МЕТИЛ-6-(1-МЕТИЛ-ЭТЕНИЛ)ЦИКЛОГЕКС-3-ЕН-1,2-ДИОЛА, синтезируемой из альфа-пинена, основного компонента скипидара. Доклинические исследования, проведенные в НИОХ *in vivo*, показали терапевтическую эффективность данного агента против искусственно вызванных симптомов болезни Паркинсона, а длительный 30-дневный эксперимент - отсутствие токсического воздействия на жизненно важные органы животных [1]. Одним из этапов, предшествующих выпуску препарата, является разработка аналитической методики количественного определения действующего вещества DIOL в лекарственной форме

(ЛФ) методом ВЭЖХ и экспериментальное доказательство ее пригодности. Это и является целью данной работы. В ходе работы необходимо решить следующие задачи: подобрать компоненты подвижной фазы и их оптимальное соотношение; разработать методику приготовления испытуемого раствора и раствора сравнения; экспериментально подобрать оптимальные условия хроматографического анализа; определить метрологические характеристики разработанной методики для подтверждения ее соответствия фармакопейным требованиям.

Материалы и методы исследования. Материалы. Раствор 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ), раствор ацетонитрила, испытуемый раствор DIOL и раствор сравнения.

Экспериментальная часть. В первую очередь была выбрана оптимальная длина волны для определения DIOL детектором хроматографа. При прочих равных условиях были записаны две хроматограммы испытуемого раствора DIOL при двух разных длинах волн: 200 и 210 нм. На полученной хроматограмме (рис.1) видно, что эффективность хроматографирования разная: высота пика, полученного при записи хроматограммы при 200 нм значительно выше пика DIOL, детектированного при 210 нм.

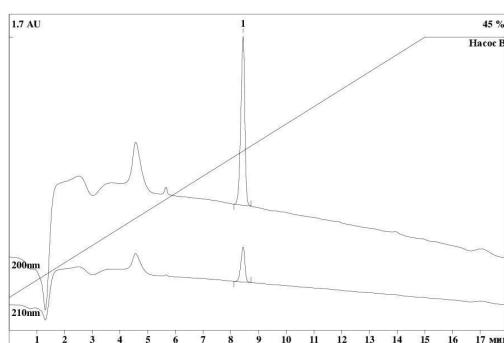


Рис.1. Хроматограммы, записанные для испытуемого раствора DIOL при разных длинах волн

На основании литературных данных было предложено использовать в качестве компонентов ПФ ТФУ и ацетонитрил. Хроматограммы, записанные в двух разных режимах: градиентном и изотоническом, - показывают неэффективность изотонического режима: в данном случае происходит недостаточное разделение пиков (рис.2), т.к. по нормативным требованиям разрешение между пиками DIOL и ближайшей примеси должно быть не менее 2,0. Этому требованию удовлетворяет градиентный режим (рис.3), при котором доля ПФ Б изменяется от 5 до 45%.

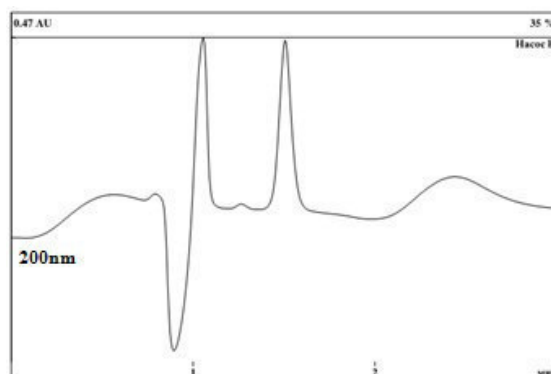


Рис.2. Хроматограмма, записанная для испытуемого раствора DIOL в изотоническом режиме

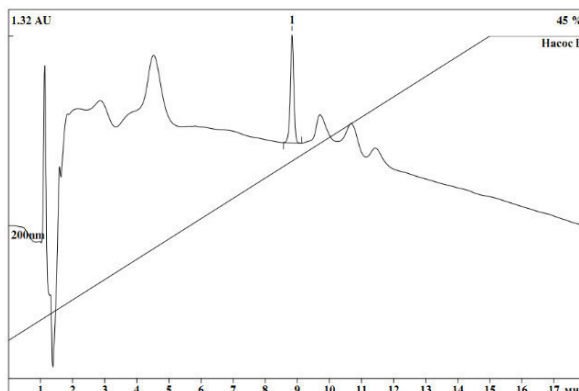


Рис.3. Хроматограмма, записанная для испытуемого раствора DIOI в градиентном режиме

Результаты. В результате работы была разработана методика количественного определения DIOI в ЛФ на хроматографе «Милихром А-02» (с УФ-детектором). Оптимальным был принят состав подвижной фазы (ПФ): ПФ А – 0,1% ТФУ, ПФ Б – ацетонитрил; колонка - ProntoSIL размером 75 x 2,0 мм, заполненная сферическими частицами силикагеля, поверхность которых ковалентно модифицирована октадецильными группами и эндкепированна, с размером частиц 5,0 мкм и диаметром пор 120 А (ООО «ЭкоНова», г.Новосибирск); режим элюирования – градиентный:

Таблица 1

Параметры градиентного режима элюирования для методики количественного определения DIOI в ЛФ

Время, мин	Доля ПФ А, %	Доля ПФ Б, %
0-2	95	5
2-15	95→55	5→45
15-18	55	45

Скорость потока – 0,15 мл/мин; детектор – спектрофотометрический, 200 нм; объём пробы – 5 мкл; температура колонки - 35°C. Кроме того была проведена валидация методики по следующим параметрам: специфичность; линейность; правильность; прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная прецизионность).

Заключение. Итогом работы является разработанная аналитическая методика количественного определения действующего вещества DIOI в лекарственной форме методом, пригодность которой была экспериментально доказана в процессе валидации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патент № 2418577 РФ МПК А61К31/015 А61К31/047 А61Р25/16 Средство для лечения болезни Паркинсона / Т. Г. Толстикова, А.В. Павлова, Е.А.Морозова, И.В.Ильина, О.В.Ардатов, К.П.Волчо, Н.Ф.Салахутдинов. Заявл. 24.12.2009; Оpubл. 20.05.2011, Бюл. № 6. - 5 с.: ил.