

Ю. А. Полковникова¹, К. Н. Корянова², А. И. Сливкин¹,
У. А. Тульская¹, С. П. Сенченко²

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНИБУТА В МИКРОКАПСУЛАХ

¹ ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Россия, 394006, Воронеж,
ул. Студенческая; e-mail: juli-polk@mail.ru

² Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава РФ,
Россия, 357532, Ставропольский край, Пятигорск, пр. Калинина, 11

Методом капиллярного электрофореза проведена разработка и валидация методики количественного определения фенибута в микрокапсулах. Показано, что при использовании в качестве ведущего электролита 10 мМ раствора натрия тетраборнокислого 10-водного с рН 9,2 достигаются достаточно высокие параметры эффективности (около 200 000 т.т.) и необходимое разрешение ($R_s \geq 1,5$). Проведенная валидационная оценка разработанной методики показала, что методика является специфичной, а по показателям аналитическая область и линейность соответствует требованиям ГФ XIII изд.

Ключевые слова: фенибут; микрокапсулы; капиллярный электрофорез; валидация.

Основной целью государственной политики Российской Федерации в области фармацевтической индустрии является реализация программы «Стратегия развития фармацевтической промышленности на период до 2020 г.», одним из ключевых моментов которой является разработка и производство инновационных отечественных лекарственных препаратов, обладающих максимальной терапевтической эффективностью и минимумом нежелательных лекарственных реакций [1].

В последние годы возросла тенденция к повышению частоты хронических цереброваскулярных расстройств. Необходимо отметить высокую медико-социальную и экономическую значимость данного вида патологии, сопровождающейся высоким уровнем смертности и инвалидизации населения [2, 3].

Все это делает необходимым поиск и разработку более эффективных и безопасных ноотропных лекарственных препаратов, в частности на основе фенибута [4].

Популярной и востребованной лекарственной формой являются микрокапсулы с эффектом пролонгации, уменьшающие влияние влажности на стабильность субстанции фенибута [5, 6]. Дополнительное микрокапсулирование фенибута может в значительной степени пролонгировать его фармакологический эффект [7, 8].

В настоящее время известно несколько методов количественного определения фенибута в лекарственных формах.

Так, известно, что субстанцию фенибута количественно определяют методом неводного титрования (ФС 42-00380051-00), а в лекарственных формах (таблетки) прямого спектрофотометрического определения в УФ-области (ФС 42-1768-96).

Известен способ (патент РФ 2167410 МПК G01N21/78, опубл. 20.05.2001) количественного определения алифатических аминокислот, применяемый для количественного определения фенибута в таблетках, который заключается в обработке анализируемой

пробы цветореагентом при нагревании с последующим спектрофотометрированием полученного окрашенного раствора и отличается тем, что пробу обрабатывают 1 % спиртовым раствором нингидрина в среде фосфатного буферного раствора с рН = 6,4 – 7,6 в присутствии 1 мг аскорбиновой кислоты, разбавляют полученный окрашенный раствор водой, а оптическую плотность измеряют при длине волны 568 нм.

Известные методы анализа фенибута в лекарственных формах являются трудоемкими, требуют специфических подходов при определении действующего вещества.

Для анализа алифатических аминокислот в биологических жидкостях, лекарственных препаратах, продуктах питания широко используются методы капиллярного электрофореза (КЭ), основанные на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля [9]. При сравнении данного метода с ВЭЖХ можно выделить следующие преимущества КЭ: высокая эффективность разделения, недоступная для ВЭЖХ; минимальный расход дорогостоящих высококачественных органических растворителей и реактивов; экспрессность анализа, а также отсутствие необходимости в предколоночной модификации.

Целью работы являлась разработка и валидация методики количественного определения фенибута в микрокапсулах методом капиллярного электрофореза.

Экспериментальная часть

При получении микрокапсул в качестве активной фармацевтической субстанции использован γ -амино- β -фенилмасляной кислоты гидрохлорид, отвечающий требованиям ФСП 42-00380051-00, и вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению и отвечающие требованиям нормативной документации.

Испытуемые образцы — микрокапсулы, содержащие фенибут, микрокапсулы-плацебо.

Микрокапсулы фенибута. Для получения оболочек на основе солей альгиновой кислоты для микрокапсул фенибута к 50 г 1–2 % раствора натрия альгината в воде прибавляли 1,0 г лекарственной субстанции. Полученную суспензию по каплям с помощью шприца с иглой подавали в 500 мл 2 % раствор кальция хлорида. Время нахождения формирующихся микрокапсул в растворе кальция хлорида составляет 10 мин. За это время происходит взаимодействие ионного характера, в результате чего образуются сферические структуры с ядром из вязкого раствора альгината натрия и наружного слоя альгинатного гидрогеля.

По внешнему виду полученные микрокапсулы представляли собой мелкие частицы желтого цвета округлой формы размером от 0,1 до 1 мм.

Микрокапсулы-плацебо. Для получения оболочек на основе солей альгиновой кислоты для микрокапсул-плацебо получали 50 г 1–2 % раствора натрия альгината в воде. Полученный раствор по каплям подавали в 500 мл 2 % раствор кальция хлорида. Время нахождения формирующихся микрокапсул в растворе кальция хлорида составляет 10 мин.

Количественное определение фенибута проводили с использованием системы КЭ Капель 105 (НПФ Люмэкс, Санкт-Петербург) с кварцевым капилляром (диаметр 75 мкм, $L_{\text{общ}}/L_{\text{эф}} = 60/50$ см). Для подготовки капилляров и восстановления их поверхности осуществляли последовательную промывку водой очищенной, 0,5 М раствором натрия гидроксида, водой очищенной, 0,5 М раствором кислоты хлористоводородной, водой и затем ведущим электролитом.

Для приготовления раствора ведущего электролита 0,3732 г натрия тетраборнокислого 10-водного (D13003964.0100ф, лот: 37263, США, с содержанием основного вещества 102,2 %) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл воды очищенной, доводили до метки тем же растворителем и перемешивали [10].

Детектирование осуществляли спектрофотометрически при 193 нм, напряжение + 20 кВ, температура 30 °С. Ввод пробы проводили гидродинамически в режиме 150 мбар · с. Ведущий электролит — 10 мМ раствор натрия тетраборнокислого 10-водного с рН 9,2.

Фенибут из микрокапсул извлекали с помощью устройства перемешивающего ЛАБ-ПУ-01 (ЗАО “Лабо-

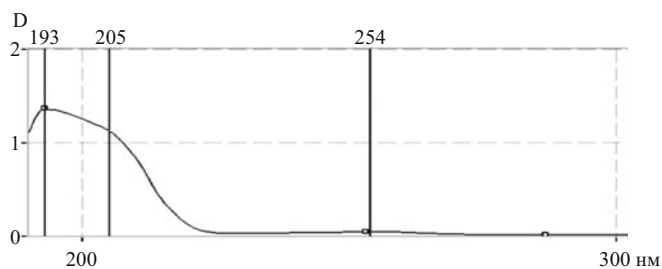


Рис. 1. Спектр поглощения фенибута в 10 мМ растворе натрия тетраборнокислого 10-водного с рН 9,2.

раторное оборудование и приборы”, Санкт-Петербург, Россия). Центрифугирование проб перед анализом осуществляли на центрифуге лабораторной с принадлежностями SIGMA 2-16P (“Сигма Лаборцентрифуген ГмбХ”, Германия).

Все промывочные, буферные растворы, а также растворы проб перед помещением их в прибор центрифугировали при 8000 мин^{-1} в течение 3 мин.

Методика анализа. Для приготовления раствора стандартного образца (СО) около 15 мг (точная навеска) фенибута помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяли в 100 мл воды, доводили до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор А). Далее 0,5 мл раствора А переносили при помощи микропипетки в пробирку типа Эппендорф объемом 1,5 мл, добавляли 0,5 мл воды и перемешивали (раствор Б). Полученный раствор центрифугировали 3 мин при 8000 мин^{-1} и подвергали анализу в указанных условиях.

Извлечение фенибута из испытуемых образцов проводили следующим образом: около 0,1 г (точная навеска) микрокапсул помещали в мерную колбу, вместимостью 100 мл и прибавляли 50 мл воды очищенной. Далее колбу с образцом устанавливали на устройство перемешивающее и встряхивали образец в течение 30 мин (скорость 200 мин^{-1}). По истечении указанного времени объем полученного раствора доводили водой очищенной до метки и перемешивали (раствор А₁). Из раствора А₁ готовили раствор Б₁ по схеме, приведенной для раствора СО фенибута. Полученный раствор Б₁ центрифугировали 3 мин при 8000 мин^{-1} и подвергали анализу в указанных условиях. Расчет содержания фенибута в микрокапсулах проводили с использованием раствора СО по формуле:

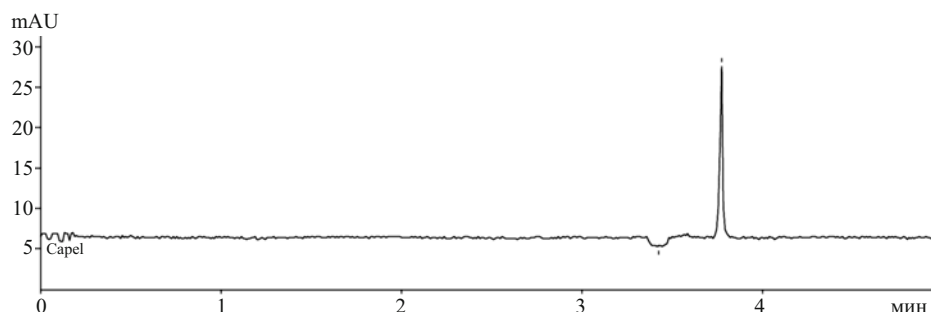


Рис. 2. ЭФГ водного раствора СО фенибута с концентрацией 30 мкг/мл ($\lambda = 193 \text{ нм}$, $T = 30 \text{ °С}$, ведущий электролит — 10 мМ раствор натрия тетраборнокислого 10-водного с рН 9,2).

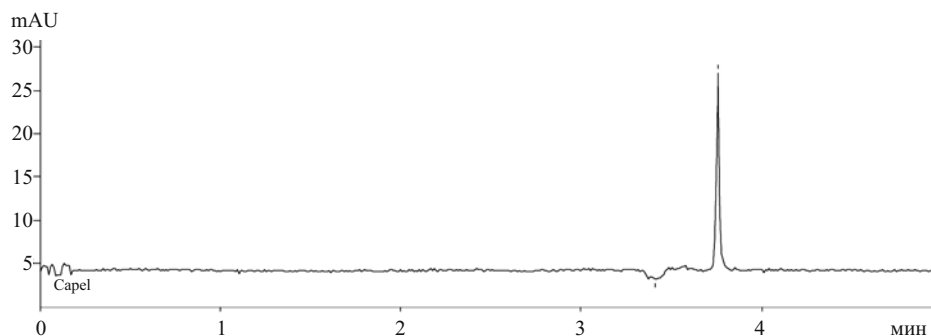


Рис. 3. ЭФГ извлечения микрокапсул фенибута.

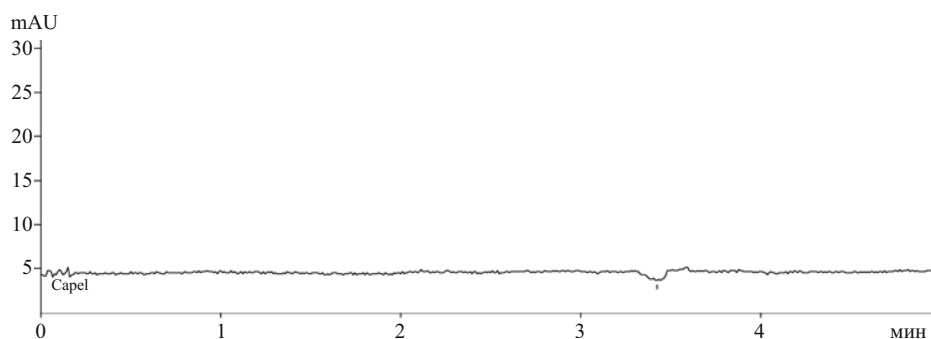


Рис. 4. ЭФГ извлечения микрокапсул плацебо.

$$X, \% = \frac{S_x \cdot a_0 \cdot W_x^1 \cdot W_x^2 \cdot V_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_x \cdot W_0^1 \cdot W_0^2 \cdot V_x}$$

где S_x и S_0 — площади пика фенибута на электрофореграмме (ЭФГ) раствора испытуемого и СО, соответственно; a_x — навеска микрокапсул, г; a_0 — навеска СО фенибута, г; W_x^1 , W_x^2 и W_0^1 , W_0^2 — объемы мерных колб, используемые для разведения извлечения из микрокапсул и СО фенибута, соответственно, мл; V_0 и V_x — аликвоты, используемые для разведения извлечения из микрокапсул и СО фенибута, соответственно, мл; P — содержание фенибута в СО, %.

Результаты и их обсуждение

Фенибут является производным γ -аминомасляной кислоты и к нему, в условиях КЭ, могут быть применимы те же подходы, что и к другим аминокислотам.

При определении фенибута в микрокапсулах в качестве ведущего электролита был выбран раствор натрия тетраборнокислого 10-водного с концентрацией 10 мМ и рН 9,2, температура эксперимента составляла 30 °С и являлась средней из используемого в анализе аминокислот температурного диапазона [11].

Для выбора аналитической длины волны измеряли спектр поглощения раствора фенибута (рис. 1). В качестве растворителя использовали раствор ведущего электролита.

Из рис. 1 видно, что в данном растворителе максимум поглощения фенибута наблюдается при 193 нм, именно поэтому данная длина волны была выбрана в качестве аналитической.

В выбранных условиях был проанализирован раствор СО фенибута, полученный по приведенной схеме. В качестве растворителя использовали воду очи-

щенную, так как фенибут является легко растворимым в воде веществом.

Типичная электрофореграмма (ЭФГ) раствора СО фенибута представлена на рис. 2.

Из полученных результатов следует, что время анализа составляет не более 5 мин, при этом эффективность (N) по пику фенибута составляет около 20000 кажущихся теоретических тарелок (т.т.), а его разрешение (R_s) с сигналом электроосмотического потока (ЭОП) находится на уровне 3. Данные электрофоретические характеристики фенибута позволяют использовать выбранные условия для дальнейших исследований.

Для установления возможного влияния сопутствующих компонентов микрокапсул на определение фенибута готовили извлечение как из микрокапсул, содержащих фенибут, так и микрокапсул-плацебо. ЭФГ извлечений из микрокапсул и микрокапсул-плацебо представлены на рис. 3 и 4.

В результате показано, что сопутствующие компоненты микрокапсул не оказывают влияния на определение фенибута, при этом на ЭФГ извлечения из микрокапсул обнаруживается только 1 пик, соответствующий как по времени миграции, так и по эффективности и разрешению, пику фенибута на ЭФГ раствора СО. Таким образом, выбранные условия позволяют вести определение фенибута в микрокапсулах.

С целью выбора оптимальных условий экстракции фенибута из микрокапсул в качестве экстрагентов использовали воду, 10 мМ боратный буферный раствор с рН 8 и 10 мМ боратный буферный раствор с рН 9,2.

Установлено, что на извлечение фенибута из микрокапсул значение рН экстрагента не оказывает достоверного влияния. В связи с этим в дальнейших исследованиях для экстракции фенибута из микрокапсул использовали воду.

На следующем этапе оценивали влияние температуры на высвобождаемость фенибута из микрокапсул. В опытах использовалось 3 температурных режима: 20, 37 и 50 °С. Извлечение микрокапсул получали согласно приведенной процедуре, поддерживая необходимую температуру в процессе встряхивания образца.

В ходе эксперимента установлено, что температура экстрагента также не оказывает достоверного влияния на извлечение фенибута из микрокапсул при времени экстракции 30 мин, что обуславливает использование для данного процесса комнатной температуры.

С целью оценки роли времени экстракции на извлечение фенибута из микрокапсул в работе использовали 4 временных промежутка: 15, 30, 45 и 60 мин. Извлечение микрокапсул получали согласно приведенной процедуре через указанные промежутки времени.

По результатам проведенных испытаний установлено, что увеличение времени экстракции от 15 до 60 мин не оказывает достоверного влияния на извлечение фенибута из микрокапсул. Однако в целях минимизации возможных потерь при использовании 15-минутной экстракции при составлении методики было принято решение использовать время экстракции 30 мин.

Таким образом, разработана экспрессная методика количественного определения фенибута в микрокапсулах.

Валидационная оценка разработанной методики проводилась в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 “Валидация аналитических методик” ГФ XIII изд. по показателям специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность (на уровне повторяемости (сходимости)) [12].

При оценке специфичности методик количественного определения должно быть подтверждено, что присутствие сопутствующих веществ не влияет непредусмотренным образом на результат анализа. Поэтому ввиду того, что при анализе микрокапсул плацебо (рис. 4) было установлено отсутствие влияния сопутствующих компонентов микрокапсул на определение фенибута, то предложенную методику можно считать специфичной.

Линейность методики проверяли измерением аналитических сигналов для 5 проб с различными концентрациями фенибута. В эксперименте использовали растворы СО фенибута. Приготовление анализируемых растворов СО фенибута проводили из раствора А. Для этого отбирали 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 и 0,7 мл раствора А и переносили при помощи микропипетки в пробирки по типу Эппендорф, объемом 1,5 мл, прибавляли также с использованием микропипетки соответственно 0,7, 0,6, 0,5, 0,4 и 0,3 мл воды и перемешивали. Полученные растворы центрифугировали 3 мин при 8000 мин⁻¹ и подвергали анализу в указанных условиях. В табл. 1 представлены значения концентраций измеряемых растворов СО фенибута и соответствующие им средние значения площадей пиков.

Графическое выражение зависимости аналитического сигнала фенибута от его концентрации в измеряемом растворе представлено на рис. 5.

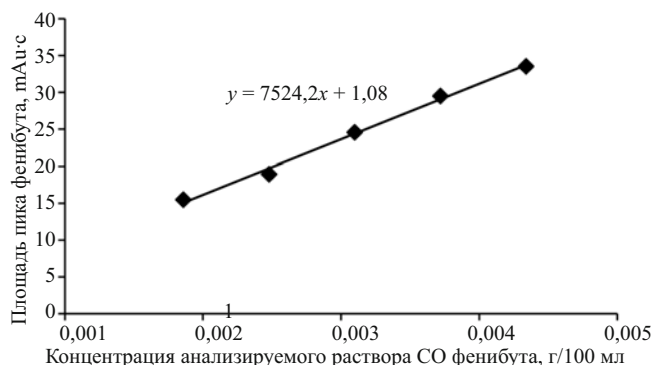


Рис. 5. Градуировочный график зависимости аналитического сигнала фенибута от его концентрации в измеряемом растворе.

В указанном диапазоне концентраций график характеризовался линейной зависимостью, а обработка экспериментальных данных методом наименьших квадратов с использованием линейной модели позволила получить следующее уравнение: $y = 7524,2x + 1,08$. При этом значение коэффициента корреляции (r) составило 0,998, что отвечает необходимым требованиям ($r \geq 0,99$) к данному валидационному показателю.

Правильность методик оценивали при изучении их линейности. Согласно статистической обработке полученного уравнения линейной регрессии коэффициент b имеет доверительный интервал $7524,2 \pm 958,62$, а свободный член a значимо не отличается от нуля, т.к. его доверительный интервал намного больше значения и равен $3,09 (1,08 \pm 3,09)$. Ввиду того, что свободный член $a = 0$, уравнение принимает вид: $y = 7846,8x$, а предлагаемая методика неотягощена систематической погрешностью.

Оценку прецизионности проводили на уровне повторяемости (сходимости) по результатам 6 определений для образцов, подготовленных в соответствии с методикой. Результаты оценки прецизионности методики характеризовались соответствующими значениями величины стандартного отклонения результатов отдельного определения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что предложенная методика характеризуется довольно низкой величиной случайной погрешности, что позволяет использовать ее для количественного определения фенибута в микрокапсулах.

Аналитическую область методики устанавливали по диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих требованиям линейной модели. В результате

Таблица 1
Концентрации измеряемых растворов СО фенибута и соответствующие им средние значения площадей пиков

Концентрация раствора СО фенибута, г/100 мл	Площадь пика фенибута (среднее из 2 вводов), мАУ · с
0,00186	15,485
0,00248	18,945
0,00310	24,565
0,00372	29,495
0,00434	33,535

Таблица 2

Результаты оценки прецизионности методики количественного определения фенибута в микрокапсулах

Навеска микрокапсул, г	Площадь пика фенибута (среднее из 2 вводов), mAU · с	Содержание фенибута в микрокапсулах, %	Характеристики прецизионности
0,1054	24,125	5,78	$\bar{x} = 5,84 \%$ $SD = 0,08$ $RSD = 1,35 \%$
0,1120	25,615	5,77	
0,1113	25,880	5,87	
0,0940	21,490	5,77	
0,1033	24,195	5,91	
0,1026	24,180	5,95	

методика количественного определения фенибута в микрокапсулах применима в интервале от 60 до 140 % от номинального значения, что соответствует предъявляемым требованиям (от 80 до 120 %) Кроме того, в этом интервале методика характеризуется приемлемым уровнем правильности (результаты, свободные от систематической ошибки) и прецизионности (5,84 ± 0,08) %, что подтверждает ее применимость в данном диапазоне.

Также в валидируемую методику включали такую процедуру, как проверка пригодности аналитической системы. В соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0022.15 “Капиллярный электрофорез”, в качестве параметров пригодности системы использовали: кажущееся число теоретических тарелок (N) пика фенибута; разрешение (R_s) пика фенибута и сигнала ЭОП; фактор симметричности (A_s) пика фенибута. При установлении нормативов данных параметров использовали значения, полученные в ходе оценки прецизионности методики. Для каждой пробы использовали среднее значение 2 последовательных вводов. Результаты представлены в табл. 3.

Можно заключить, что система считается пригодной, если разрешение пика фенибута и сигнала ЭОП составляет не менее 3,0, кажущееся число теоретических тарелок пика фенибута составляет не менее 200000 т.т., а фактор симметричности пика фенибута – не менее 0,5 и не более 0,9.

Таким образом, разработана методика количественного определения фенибута в микрокапсулах с использованием КЭ. Проведена валидационная оценка методики количественного определения фенибута в микрокапсулах по показателям специфичность, аналитиче-

Таблица 3

Оценка параметров пригодности системы

№ п/п	R_s	N	A_s
1	3,24	239328	0,75
2	2,94	221237	0,98
3	3,37	211666	0,56
4	3,18	233228	0,66
5	3,32	260998	0,62
6	3,30	260824	0,57
\bar{x}	3,23	237880	0,69
$(\bar{x} \pm \Delta\bar{x})$	3,23 ± 0,16	237880 ± 21238	0,69 ± 0,17

ская область, линейность, правильность и прецизионность. Установлено, что методика является специфичной, а по показателям аналитическая область и линейность соответствует требованиям ГФ XIII изд.

ЛИТЕРАТУРА

1. Приказ “Об утверждении Стратегии развития медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 г.”, Министерство промышленности и торговли Российской Федерации, Москва (2009); URL: <http://minprom-torg.gov.ru/ministry/sectoral/7/utverzhdennaya-strategiya-farma2020-231009.pdf>.
2. В. В. Багметова, И. Н. Тюренков, Л. Е. Бородкина и др., *Фунд. исслед.*, № 3, 22 – 36 (2013).
3. В. Н. Тянь, В. С. Гойденко, О. Н. Дубровина, *Мануал. тер.*, **53**(1), 3 – 10 (2014).
4. Ю. А. Полковникова, *Биофарм. ж.*, **7**(4), 10 – 15 (2015).
5. Я. В. Постраш, О. М. Хишова, *Вестник фармации*, **48**(2), 1 – 7 (2012).
6. М. В. Сардушкин, *Автореф. дис. ... канд. техн. наук*, Москва (2013).
7. A. S. Lenshin, Y. A. Polkovnikova, P. V. Seredin, *Results in Physics*, **6**, 337 – 338 (2016); .
8. Ю. А. Полковникова, А. И. Сливкин, *Хим.-фарм. журн.*, **50**(8), 56 – 58 (2016); *Parm. Chem. J.*, **50**(8), 553 – 555 (2016).
9. О. В. Тринеева, *Разработка и регистрация лек. средств*, **11**(2), 120 – 140 (2015).
10. ГОСТ 4919.2–77 Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления растворов индикаторов и буферных растворов, Стандартинформ, Москва (2010).
11. Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев, *Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза “КАПЕЛЬ”*, Вета, Санкт-Петербург (2006).
12. Государственная фармакопея Российской Федерации, 13 изд., Министерство здравоохранения Российской Федерации, Москва (2015); Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml>.

Поступила 26.06.16

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A TECHNIQUE FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF PHENIBUT IN MICROCAPSULES

Yu. A. Polkovnikova^{1*}, K. N. Koryanova², A. I. Slivkin¹, U. A. Tul'skaya¹, and S. P. Senchenko²¹ Voronezh State University, Voronezh, 394006 Russia² Pyatigorsk Medico-Pharmaceutical Institute, Branch of the Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, 357532 Russia

* e-mail: juli-polk@mail.ru

We have developed and validated a method for the quantitative determination of phenibut in microcapsules using the capillary electrophoresis technique. It is shown that the use of 10 mM solution of borax decahydrate at pH 9.2 as the driving electrolyte, it is possible to achieve sufficiently high performance parameters (about 200 000 theoretical plates) and required resolution (R_s 1.5). Validation of the proposed technique demonstrated its specificity and showed that the parameters of analytical range and linearity correspond to requirements of the Russian State Pharmacopeia (XIII edition).

Keywords: phenibut; microcapsules; capillary electrophoresis; validation.