

С. И. Гусева¹, М. В. Карлина², О. Н. Пожарицкая², А. Н. Шиков^{1, 2},
Н. М. Фаустова³

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИКЛОФЕНАКА ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ТРАНСДЕРМАЛЬНЫХ ГЕЛЕЙ *IN VITRO*

¹ Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И. И. Мечникова,
Санкт-Петербург, Россия;

² Санкт-Петербургский институт фармации, Санкт-Петербург, Россия;

³ ЗАО "Межрегиональный центр "Адаптоген", Санкт-Петербург, Россия

Валидирован метод количественного определения диклофенака для оценки биоэквивалентности трансдермальных гелей. Показано, что метод является точным и правильным и имеет линейный характер зависимости для рассмотренного диапазона концентраций диклофенака. Изучение процесса высвобождения диклофенака из трансдермальных гелей с различной вязкостью и препарата сравнения проводили методом "лопасть над диском". Для описания процесса растворения диклофенака при моделировании трансдермального применения использовали различные математические зависимости. Полученные данные позволили предположить, что высвобождение диклофенака из гелей происходит путем диффузии и подчиняется закону Higuchi. Показано, что на скорость растворения диклофенака оказывает влияние вязкость геля. Для сравнения профилей растворения диклофенака и определения их эквивалентности вычисляли коэффициент подобия. На основании полученных данных заключили, что экспериментальные образцы гелей диклофенака средней и высокой вязкости эквивалентны препарату сравнения.

Ключевые слова: диклофенак, трансдермальные гели, биоэквивалентность *in vitro*.

Диклофенак (2-[(2,6-дихлорфенил)амино]бензолуксусная кислота) — нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП) (рис. 1) [1]. На рынке лекарственных средств диклофенак представлен в виде свободной кислоты, натриевой и калиевой соли [2].

Диклофенак широко применяется в медицинской практике в различных лекарственных формах, как для системного действия, так и для локальной терапии [3 – 7].

Одной из перспективных лекарственных форм для локальной противовоспалительной терапии являются гели. Наличие спиртовых растворителей, используемых, как правило, при приготовлении геля, обеспечивает быстрое проникновение лекарственного средства через кожу [8]. Дополнительно в состав гелей вводят компоненты, обеспечивающие проведение действующего вещества через дерму и подлежащие ткани [9].

Оценка биоэквивалентности ("фармакокинетической эквивалентности") лекарственных средств является основным видом медико-биологического контроля воспроизведенных (генерических) лекарственных средств, не отличающихся лекарственной формой и содержанием действующих веществ от соответствующих оригинальных лекарственных средств [10]. В качестве альтернативы классическим исследованиям для оценки биоэквивалентности можно использовать тесты *in vitro*, в частности тест растворение.

Целью настоящей работы является валидация методики количественного определения диклофенака в среде растворения, а также сравнение профилей высво-

бождения диклофенака из опытных образцов геля различной вязкости и препарата сравнения диклонат П.

Материалы и методы

В качестве исследуемых препаратов применялись опытные образцы геля диклофенака низкой, средней и высокой вязкости и препарат сравнения: диклонат П (Плива Хрватска д.о.о., Хорватия). Содержание диклофенака в каждом образце составляло 1 %. В качестве модификатора вязкости в опытных образцах использовали гидроксипропилцеллюлозу в разной концентрации.

Высвобождение диклофенака из исследуемых препаратов осуществляли методом "лопасть над диском" согласно USP 30 с использованием тестера для проверки растворимости Egweka серии DT 600 (Германия) [11].

Условия: температура среды растворения 32 ± 1 °C; скорость вращения лопасти 50 об/мин; среда растворения — вода; объем среды растворения 150 мл. По истечению заданных промежутков времени (5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 мин) отбирали пробы по 3 мл, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Объем среды растворения восполняли водой.

Для количественного анализа диклофенака использовали метод спектрофотометрии при длине волны 275 нм. Измерения проводили на UV-VIS-спектрофотометре PharmaSpec 1700 (Shimadzu, Япония).

Описание процесса растворения диклофенака проводили следующими методами: уравнение Higuchi,

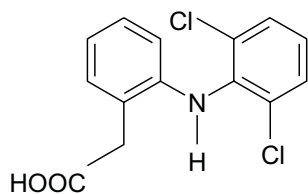


Рис. 1. Структурная формула диклофенака (C₁₄H₁₁Cl₂NO₂).

уравнение кинетики первого порядка, закон кубического корня, модель Weibull [12].

Константы скорости растворения рассчитывали методом наименьших квадратов [13].

Для сравнения профилей растворения рассчитывали коэффициент подобия f_2 [14, 15] по формуле:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n |R_j - T_j|^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\},$$

где n — количество временных точек, R_j , T_j — процент растворившегося вещества из препарата в каждый момент времени j .

Результаты и их обсуждение

Валидация методики количественного определения

Процесс валидации является важной частью системы обеспечения и контроля качества и обязателен в практике качественного производства медицинской продукции.

Таблица 1

Валидационные параметры методики определения диклофенака

Показатель	Величина
Линейность (Linearity) и аналитическая область (Range), мкг/мл	2,57 – 20,24
Уравнение регрессии ($Y = bX + a$)	$Y = 0,0343X + 0,0051$
Коэффициент корреляции r	0,9970
Относительное стандартное отклонение, RSD , %	0,17
Стандартное отклонение для b (S_b)	0,00068
Стандартное отклонение для a (S_a)	0,0092
Точность (Accuracy), %	97,5 – 102,5
Прецизионность	
Внутридневная прецизионность (Intraday precision), RSD , %	
2,53 мкг/мл	2,36
10,1 мкг/мл	1,41
20,2 мкг/мл	0,58
Междневная прецизионность (Interday precision), RSD , %	
2,53 мкг/мл	2,77
10,1 мкг/мл	1,46
20,2 мкг/мл	0,60
Предел обнаружения LOD, мкг/мл	0,50
Предел количественного определения LOQ, мкг/мл	1,67

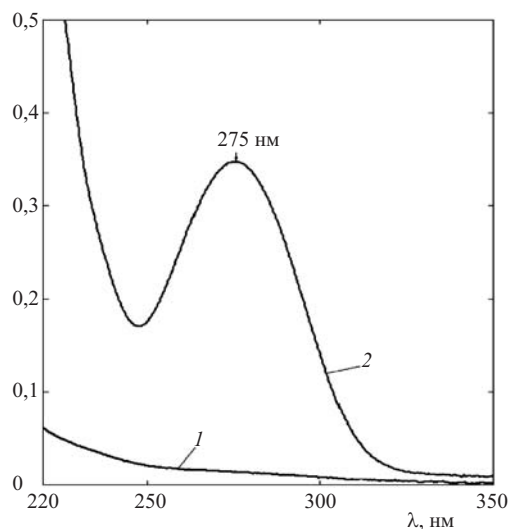


Рис. 2. Наложение спектров раствора плацебо (1) и раствора геля диклофенака (2) в воде.

Для анализа диклофенака в среде растворения был выбран спектрофотометрический метод, как точный, достаточно быстрый, позволяющий совместить качественную и количественную оценку основного компонента. Выбор длины волны детектирования (275 нм) обусловлен присутствием специфического максимума в УФ-спектре субстанции.

Валидация методики определения диклофенака в среде растворения была выполнена в соответствии с рекомендациями, предъявляемыми к методикам, используемым в тесте “Растворение” [16 – 18]. В качестве параметров валидации методики были выбраны специфичность, линейность и аналитическая область методики, прецизионность, точность (или правильность), предел обнаружения и предел количественного определения. Валидационные параметры методики представлены в табл. 1.

Для проверки специфичности методики были сняты спектры модельной смеси вспомогательных ве-

Таблица 2

Коэффициенты детерминации (R^2) математических моделей и константы скорости растворения для препаратов диклофенака

Модель	Диклонат П	Гель диклофенака		
		низкой вязкости	средней вязкости	высокой вязкости
Уравнение Higuchi	0,9689	0,8464	0,9841	0,9679
Уравнение кинетики 1 порядка	0,9412	0,7608	0,9780	0,9233
Закон кубического корня	0,6280	0,4267	0,6976	0,6144
Функция распределения Weibull	0,9888	0,8926	0,9961	0,9793
Константа скорости растворения, мин ⁻¹	0,7915	1,0856	0,6517	0,9095

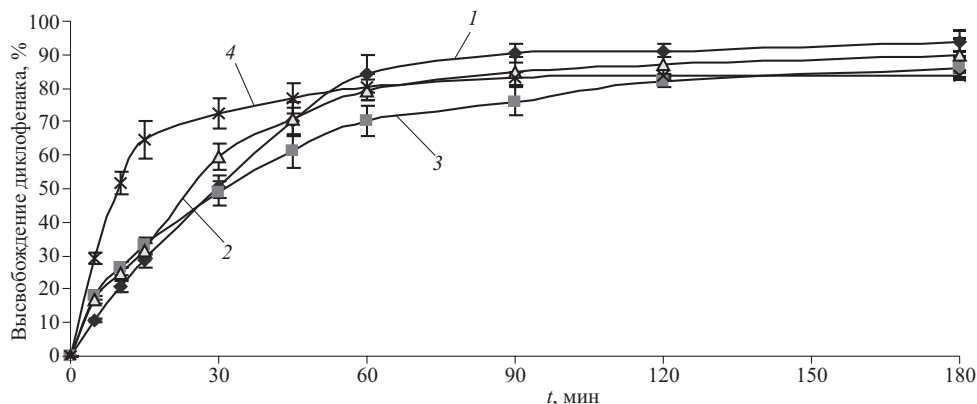


Рис. 3. Профили высвобождения диклофенака из опытных гелей диклофенака низкой, средней и высокой вязкости и препарата сравнения диклоната П ($M \pm m$, $n = 12$): 1 — диклонат П; 2 — гель высокой вязкости; 3 — гель средней вязкости; 4 — гель низкой вязкости.

ществ, входящих в состав препарата (плацебо). Было показано, что вспомогательные вещества не мешают определению диклофенака в среде растворения (рис. 2).

Полученные значения статистических критериев для рассмотренного диапазона концентраций удовлетворяют требованиям [18]. Следовательно, валидируемая методика может быть использована для теста “Растворение”.

Дополнительно оценивали стабильность диклофенака в среде растворения. Показано, что растворы стабильны в течение 1 сут при комнатной температуре и в течение 2 сут при температуре 8 – 10 °С.

Определение скорости высвобождения диклофенака

Моделирование процесса местного применения осуществляли с использованием метода “лопасть над диском”, применяемого для трансдермальных лекарственных форм [11]. В качестве среды растворения выбрана вода дистиллированная. Для каждого препарата проведено 12 определений. Полученные результаты приведены на рис. 3.

Анализируя данные, представленные на рис. 3, видно, что высвобождение диклофенака из всех изученных образцов протекает практически линейно в течение 60 мин за исключением образца диклофенака с низкой вязкостью, что связано с разрушением и/или растворением матричной основы геля, в которую инкорпорирована субстанция. В среднем через 60 мин в среду растворения переходит около $78,5 \pm 6,0$ % действующего вещества. Затем процесс замедляется и к 3 ч составляет $88,4 \pm 4,7$ %. Константы скорости растворения, рассчитанные методом наименьших квадратов (табл. 2), показали, что наиболее быстро протекает процесс растворения из геля диклофенака низкой вязкости ($1,0856 \text{ мин}^{-1}$). Скорость растворения для препарата сравнения и опытных образцов геля с высокой вязкостью отличалась незначительно и составила $0,8459 \pm 0,0815 \text{ мин}^{-1}$ (RSD 9,6 %).

Для описания процесса растворения диклофенака при моделировании трансдермального применения ис-

пользовали различные математические зависимости. После линеаризации кривых высвобождения установили, что для описания процесса высвобождения диклофенака из препаратов наилучшим образом подходит функция распределения Weibull и уравнение Higuchi (табл. 2).

Полученные данные позволили предположить, что высвобождение диклофенака как из опытных гелей средней и высокой вязкости так и из диклоната П так происходит путем диффузии и подчиняется закону Higuchi [19].

Для сравнения профилей растворения диклофенака и определения их эквивалентности вычисляли коэффициент подобия (f_2), который отражает ошибку между 2 кривыми по всем временным точкам. Профили растворения можно считать подобными, если значения f_2 находятся в пределах от 50 до 100 [14, 15]. Для исследуемых препаратов коэффициент подобия составили:

диклонат П — гель диклофенака низкой вязкости 35,55

диклонат П — гель диклофенака средней вязкости 55,15

диклонат П — гель диклофенака высокой вязкости 63,89.

На основании полученных данных по расчету коэффициентов подобия заключили, что экспериментальные образцы диклофенака средней и высокой вязкости эквивалентны препарату сравнения диклонату П.

Работа выполнена при финансовой поддержке ЗАО “Натур Продукт Интернешнл” (Россия).

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Ч. 1, Медицина, Москва (1993), сс. 214 – 215.
2. Г. Л. Вышковский (ред.), *Энциклопедия лекарств. Серия Регистр лекарственных средств России РЛС*, Вып. 12, РЛС-2005, Москва (2004).
3. Е. Л. Насонов, *Нестероидные противовоспалительные препараты (Перспективы применения в медицине)*, Анко, Москва (2000).

4. E. C. Ku, W. Lee, H. V. Kothari, and D. W. Scholer, *Am. J. Med.*, **80**(4B), 18 – 23 (1986).
5. M. Banning, *Expert. Opin. Pharmacother.*, **9**(16), 2921 – 2929 (2008).
6. P. S. Tugwell, G. A. Wells, and J. Z. Shainhouse, *J. Rheumatol.*, **31**(10), 2002 – 2012 (2004).
7. Н. В. Чичасова, *Consilium Med.*, **3**(5), (2001).
8. S. Baboota, F. Shakeel, and K. Kohli, *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **28**(2), 109 – 114 (2006).
9. A. Arellano, S. Santoyo, C. Martín and P. Ygartua, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **7**(2), 129 – 135 (1999).
10. *Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence*, The European Agency for the Evaluation of Medical Products, London (2001).
11. *The United States Pharmacopoeia / The National Formulary 30/25* (2007), Article <724>.
12. P. Costa and Lobo J. M. Sousa, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **29**(1), 89 – 97 (2003).
13. В. Д. Пономарев, В. Г. Беликов, Н. И. Коковкин-Щербак, *Математические методы в фармации*, Медицина, Москва (1983).
14. P. Costa and Lobo J. M. Sousa, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **13**, 123 – 133 (2001).
15. *Проведение качественных исследований биоэквивалентности лекарственных средств. Методические указания*, М-во здравоохранения и соц. развития РФ, Москва (2004).
16. А. П. Арзамасцев, Н. П. Садчикова, Ю. Я. Харитонов, *Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств*, № 1, 28 – 29 (2001).
17. *The United States Pharmacopoeia / The National Formulary 30/25*, (2007), Article <1225>.
18. *Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств*, М-во здравоохранения и соц. развития РФ, Москва (2007).
19. W. I. Higuchi, *J. Pharm. Sci.*, **51**(8), 802 – 804 (1962).

Поступила 29.04.09

VALIDATION OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF DICLOFENAC FOR *IN VITRO* EVALUATION OF THE BIOEQUIVALENCE OF TRANSDERMAL GEL PREPARATIONS

S. I. Guseva¹, M. V. Karlina², O. N. Pozharitskaya², A. N. Shikov^{1,2}, and N. M. Faustova³

¹ Mechnikov St. Petersburg State Medical Academy, St. Petersburg, 195067, Russia;

² St. Petersburg Institute of Pharmacy, St. Petersburg, 195067, Russia;

³ Adaptogen Corporation, Interregional Medical Center, St. Petersburg, Russia

A method of the quantitative determination of diclofenac for studying the bioequivalence of transdermal gel preparations of this drug has been validated. It was established that the proposed method is precise, reproducible, and linear in a certain concentration range. The release of diclofenac from transdermal gels with different viscosities and from the reference preparation was studied using the paddle-over-disk technique. The drug release from the transdermal gel preparation was modeled using various mathematical laws, including the Higuchi law, first-order kinetics, cubic root, and Weibull function. An analysis of the experimental data showed that the release of diclofenac from gels proceeds by diffusion and obeys the Higuchi law. It was found that the rate of drug release from the gel significantly depends on the viscosity. It was concluded that experimental samples of diclofenac gel with medium and high viscosity were equivalent to the reference preparation.

Key words: Diclofenac, transdermal gel preparations, bioequivalence testing *in vitro*