

Зуйкина С.С., Вишневская Л.И., Бевз Н.Ю.
Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина

Zuikina S., Vyshnevskaya L., Bevz N.
National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

Разработка методик контроля качества индометацина с целью изучения стабильности бигеля для комплексной терапии мастопатии

Development of Methods of Quality Control of Indometacin in
Order to Study Bigel Stability for Integrated Mastopathy Therapy

Резюме

Тканевый гомеостаз молочной железы является результатом равновесия между пролиферацией, дифференциацией и апоптозом ее клеточного состава, зависит от оптимального соотношения, как в сыворотке крови, так и в тканях молочной железы, концентрации основных половых гормонов (эстрогена и прогестерона), обеспечивающих указанные выше эффекты. Согласно прогнозу специалистов Национального института рака, диагноз «рак молочной железы» (РМЖ) до конца 2020 года может стать реальностью почти для 17% украинских женщин, что дает основание рассматривать его как социально значимую эпидемиологическую проблему.

В процессе многолетних поисков химических соединений, блокирующих развитие гиперпластических процессов в гормональных тканях, ученые обратили внимание на производные индола. Установлено, что они способствуют усилению экспрессии изоформы цитохрома P450 CYP1A1, что в свою очередь гидроксيليруется с образованием гидроксиэстрона. Установлено, что данный метаболит обладает антипролиферативной (антиэстрогенов) активностью.

Исходя из вышеприведенного, в качестве активного фармацевтического ингредиента (АФИ) в состав бигеля для комплексной терапии мастопатии был введен индометацин – нестероидное противовоспалительное средство (НПВС), обладающее противовоспалительными, анальгетическими, антиагрегационными свойствами за счет подавления активности медиаторов воспаления, гиалуронидазы, лизосомальных гидролаз.

Целью нашей работы стала разработка и проведение процедуры валидации методик идентификации и количественного определения индометацина в составе бигеля для применения в схеме комплексной терапии мастопатии.

Объектами исследования стали экспериментальные серии бигеля, индометацин (Indometacin EP, Batch no T17-417, Maoguantang bridge, Xinmao, Chengxiang, Taicang, 98,7%), вспомогательные вещества. В работе использовали лабораторную посуду класса А, растворы и реактивы, которые отвечают требованиям Государственной фармакопеи Украины (ГФУ), аналитические весы AXIS ANG200 (Польша), спектрофотометр Evolution 60s (USA).

Для использования спектрофотометрического метода для стандартизации индометацина и изучения фармакотехнологических параметров лекарственной формы исследовали характер ультрафиолетового спектра поглощения соединения в спирте.

Установили, что УФ-спектр поглощения 0,002%-ного спиртового раствора вещества в области от 220 до 400 нм характеризуется наличием максимумов поглощения при 234 и 320 нм и плечом при 262–268 нм. Путем разведения 0,1%-ного спиртового раствора индометацина 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной или 0,1 М раствором натрия гидроксида получали 0,002%-ные растворы и установили, что максимумы поглощения кислого раствора наблюдаются при длине волн 262 и 318 нм, щелочного – при 227 и 282 нм.

Согласно стандартизированной процедуре изучали основные валидационные характеристики методики – специфичность, линейность, правильность, прецизионность.

Таким образом, на основе проведенного эксперимента можно сделать вывод, что разработанная методика может быть использована для количественного определения индометацина в разработанном оригинальном препарате.

Для идентификации индометацина в лекарственной форме предложено использовать химическую реакцию с натрия гидроксидом.

Ключевые слова: индометацин, бигель, стабильность, контроль качества.

Abstract

Tissue homeostasis of the mammary gland is the result of a balance between proliferation, differentiation and apoptosis of its cellular composition; it depends on the optimal ratio, both in blood serum and in the tissues of the mammary gland, of the concentration of the main sex hormones (estrogen and progesterone), providing the mentioned above effects.

According to the forecast of specialists of the National Cancer Institute, the diagnosis of breast cancer (breast cancer) before the end of 2020 can become a reality for almost 17% of Ukrainian women, which gives reason to consider it as a socially significant epidemiological problem.

Long-term searches for chemical compounds that block the development of hyperplastic processes in hormonal tissues have drawn the attention of scientists to indole derivatives. It was found that they contribute to increased expression of the cytochrome P450 isoform of CYP1A1, which, in turn, is hydroxylated to form hydroxyestrene. It was established that this metabolite has antiproliferative (antiestrogen) activity [2, 3].

Based on the above, as an active pharmaceutical ingredient (API), indomethacin – NSAIDs with anti-inflammatory, analgesic, anti-aggregation properties, was introduced into the bigel for the complex treatment of mastopathy due to the suppression of the activity of inflammatory mediators, hyaluronidase and lysosomal hydrolases [4–6].

The aim of our work was to develop and conduct a validation procedure for identification methods and the quantitative determination of indomethacin in the composition of the bigel for use in the complex treatment regimen of mastopathy.

The objects of the study were experimental series of bigel, indomethacin (Indometacin EP, Batch no T17-417, Maoguantang bridge, Xinmao, Chengxiang, Taicang, 98.7%) and excipients. We used class A laboratory glassware, solutions and reagents that meet the requirements of SPhU, and AXIS ANG200 analytical balance (Poland) spectrophotometer Evolution 60s (USA).

To use the spectrophotometric method to standardize indomethacin and study the pharmacotechnological parameters of the dosage form, we investigated the nature of the ultraviolet absorption spectrum of the compound in alcohol.

It was found that the UV absorption spectrum of a 0.002% alcohol solution of a substance in the region from 220 nm to 400 nm is characterized by the presence of absorption maxima at 234 nm and 320 nm and a shoulder at 262–268 nm. By diluting a 0.1% alcohol solution of indomethacin with a 0.1 M hydrochloric acid solution or 0.1 M sodium hydroxide solution, 0.002% solutions were obtained and it was found that the absorption and acid maxima were observed at 262 nm and 318 nm, alkaline at 227 nm and 282 nm.

According to a standardized procedure, the basic validation characteristics of the methodology were studied – specificity, linearity, correctness, precision.

Thus, based on the findings, it can be concluded that the developed technique can be used to quantify indomethacin in the developed original drug.

To identify indomethacin in dosage form, it is proposed to use a chemical reaction with sodium hydroxide.

Keywords: indomethacin, bigel, stability, quality control.

■ ВВЕДЕНИЕ

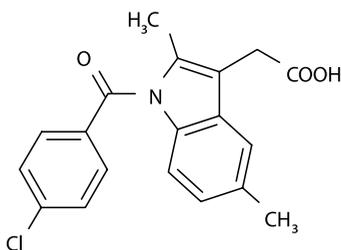
Тканевой гомеостаз молочной железы является результатом равновесия между пролиферацией, дифференциацией и апоптозом ее клеточного состава, зависит от оптимального соотношения, как в сыворотке крови, так и в тканях молочной железы, концентрации основных половых гормонов (эстрогена и прогестерона), обеспечивающих указанные выше эффекты.

Согласно прогнозу специалистов Национального института рака, диагноз «рак молочной железы» (РМЖ) до конца 2020 года может стать реальностью почти для 17% украинских женщин, что дает основание рассматривать его как социально значимую эпидемиологическую проблему.

Значительное количество публикаций в последние годы, посвященных эпидемиологии, результатам ультрамикроскопических, молекулярно-генетического и иммуногистохимического исследований биопсийных материалов, полученных у женщин с мастопатией и раком молочной железы, убедительно свидетельствует об общности не только факторов риска, но и этиопатогенетических механизмов развития указанных нозологических форм, которые различаются только количественным набором повреждений генетического аппарата клеток молочной железы, и определяет разнообразие фенотипических характеристик одного и того же процесса канцерогенеза и временные рамки проявления его клинических форм. Такой углубленный подход требует разработки новой философии профилактики РМЖ, опирается на современные знания об этиопатогенезе, канцерогенезе и этапности развития опухолевого процесса [1].

В процессе многолетних поисков химических соединений, блокирующих развитие гиперпластических процессов в гормональных тканях, ученые обратили внимание на производные индола. Установлено, что они способствуют усилению экспрессии изоформы цитохрома P450 CYP1A1, что в свою очередь гидроксيليруется с образованием гидроксизестрона. Установлено, что данный метаболит обладает антипролиферативной (антиэстрогенов) активностью [2, 3].

Исходя из вышеприведенного, в качестве активного фармацевтического ингредиента (АФИ) в состав бигеля для комплексной терапии мастопатии был введен индометацин – НПВС, обладающий противовоспалительными, анальгетическими, антиагрегационными свойствами за счет подавления активности медиаторов воспаления, гиалуронидазы, лизосомальных гидролаз [4–6].



Индометацин, или [1-(4-хлорбензоил)-5-метокси-2-метилиндол-3-ил] уксусная кислота, в химическом отношении является производным индолуксусной кислоты.

Для исследования времени, в течение которого происходит высвобождение индометацина из геля, стабильности и срока его хранения необходимо использовать быстрые и экспрессные методики контроля качества АФИ. К одному из таких методов исследования можно отнести метод абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой области.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка и проведение процедуры валидации методик идентификации и количественного определения индометацина в составе бигеля для применения в схеме комплексной терапии мастопатии.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные серии геля, индометацин (Indometacin EP, Batch no T17-417, Maoguantang bridge, Xinmao, Chengxiang, Taicang, 98,7%), вспомогательные вещества. Лабораторная посуда класса А, растворы и реактивы, которые отвечают требованиям ГФУ [7].

Аналитические весы AXIS ANG200 (Польша), спектрофотометр Evolution 60s (USA).

Идентификация. Массу навески геля, эквивалентную 25 мг индометацина, помещают в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, добавляют 30,0 мл этанола 96% Р, взбалтывают в течение 20 мин. с помощью магнитной мешалки, доводят объем тем самым растворителем до 50,0 мл, перемешивают и фильтруют через фильтр «белая лента». Первые 10–15 мл порций фильтрата отбрасывают; 5,0 мл фильтрата доводят 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной до объема 100,0 мл. Ультрафиолетовый спектр поглощения в области от 300 нм до 350 нм должен иметь максимум при длине волны 318 нм. Удельный показатель поглощения в максимуме должен быть от 175 до 205.

Массу навески геля, эквивалентную 25 мг индометацина, взбалтывают с 2 мл воды и добавляют 2 мл 2 М раствора натрия гидроксида; постепенно образуется коричневато-желтый осадок.

Методика количественного определения. Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой области (ГФУ, 2.2.25).

Растворы используют свежеприготовленными.

Испытуемый раствор. Массу навески геля, эквивалентную 50 мг индометацина, помещают в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, добавляют 30,0 мл этанола 96% Р. Взбалтывают в течение 20 мин. с помощью магнитной мешалки, доводят объем тем самым растворителем до 50,0 мл и перемешивают (при необходимости фильтруют через фильтр «белая лента», первые 10–15 мл порций фильтрата отбрасывают).

1,0 мл полученного раствора доводят 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения. 50,0 мг СЗ индометацина (Indometacin EP, Batch no T17-417, Maoguantang bridge, Xinmao, Chengxiang, Taicang, 98,7%) растворяют в этаноле 96% Р и доводят тем самым растворителем до объема 50,0 мл.

1,0 мл полученного раствора доводят 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной до объема 50,0 мл.

Компенсационный раствор. 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной.

Оптическую плотность испытуемого раствора и раствора сравнения измеряют при длине волны 318 нм относительно компенсационного раствора.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для стандартизации индометацина используют химические и физико-химические методы анализа. Методы идентификации и количественного определения состава основываются на наличии в молекуле карбоксильной группы. Так, количественное определение индометацина в субстанции рекомендуется определять методом алкалиметрии [7–9]. Для идентификации и количественного определения индометацина в лекарственных формах, таких как капсулы и суппозитории, Британская фармакопея рекомендует использовать метод абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой области спектра, рассчитывая содержание действующего вещества методом удельного показателя поглощения [10, 11] или методом жидкостной хроматографии [9, 12].

Спектрофотометрический метод на сегодня является распространенным и широко применяется в рутинном анализе активных фармацевтических ингредиентов в готовых лекарственных формах. Для использования спектрофотометрического метода для стандартизации индометацина и изучения фармакотехнологических параметров лекарственной формы изучали характер ультрафиолетового спектра поглощения соединения в этаноле. Установили, что УФ-спектр поглощения 0,002%-ного спиртового раствора вещества в области от 220 до 400 нм характеризуется наличием максимумов поглощения при 234 и 320 нм и плечом при 262–268 нм (рис. 1).

Путем разведения 0,1%-ного спиртового раствора индометацина 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной или 0,1 М раствором натрия гидроксида получали 0,002%-ные растворы и установили, что максимумы поглощения кислого раствора наблюдаются при длине волн 262 и 318 нм, щелочного – при 227 и 282 нм (рис. 1).

В качестве аналитической длины волны избран максимум при 318 нм спиртового раствора индометацина, подкисленного 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной. По выбранной длине волны

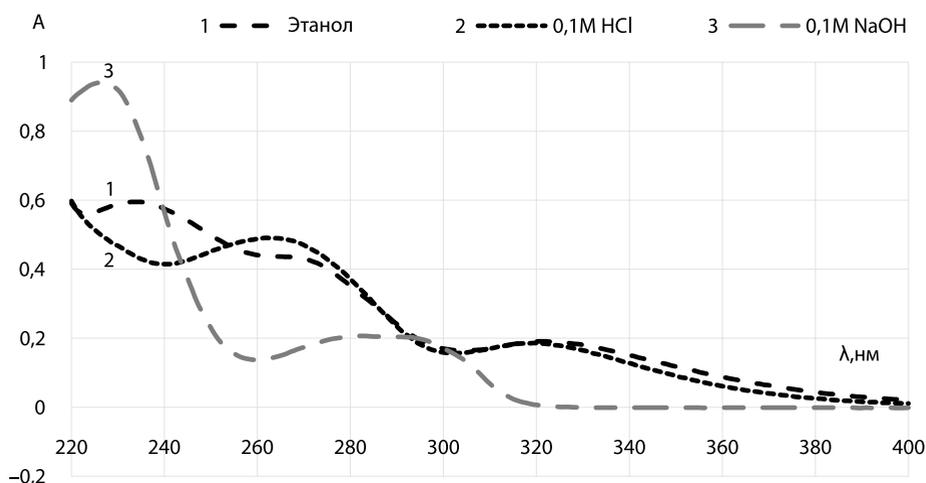


Рис. 1. УФ-спектры 0,002%-ного раствора СЗ индометацина: 1 – в спирте; 2 – в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной; 3 – в 0,1 М растворе натрия гидроксида

Fig. 1. UV spectra of a 0.002% C3 solution of indomethacin: first alcohol; a second 0.1 M hydrochloric acid solution; 3 in 0.1 M sodium hydroxide solution

устанавливали зависимость оптической плотности от концентрации полученных стандартных растворов индометацина в соответствии с основным законом светопоглощения. Как показали результаты исследований, подчинение растворов индометацина в данных условиях закону Бугера – Ламберта – Бера наблюдается в пределах концентраций от 0,005 до 0,05 мг/мл (рис. 2), удельный показатель поглощения составляет 190 ± 15 . Рассчитанную величину удельного показателя поглощения можно использовать как для идентификации индометацина, так и для количественной оценки активного фармацевтического ингредиента.

Согласно стандартизированной процедуре изучали основные валидационные характеристики методики – специфичность, линейность, правильность, прецизионность [13, 14].

Установлено, что вспомогательные вещества препарата не влияют на достоверность полученных результатов, поскольку фоновое поглощение является незначительным $\delta_{\text{noise}} = 0,19\% \leq \max \delta = 0,51\%$.

Условия пробоподготовки хотя и влияют на методику анализа $\Delta_{\text{sp}} = 1,23\% \leq 0,512$, но полная прогнозируемая неопределенность не превышает критического значения $\Delta_{\text{AS}} = 1,42\% \leq \max 1,60\%$.

Линейность, правильность и прецизионность методики количественного определения индометацина изучали в диапазоне применения от 80 до 120%. Параметры линейности (рис. 3, табл. 1) соответствуют требованиям ГФУ на всем диапазоне концентраций ($a = 0,59 \leq 2,60$; $r = 0,9997 \geq 0,9981$). Методика прецизионная, поскольку значение относительного доверительного интервала меньше критического значения для сходимости результатов: $\Delta\% = 0,65 \leq 1,60\%$ и выполняется критерий незначимости систематической погрешности $\delta = 0,39 \leq 0,51\%$ (табл. 2).

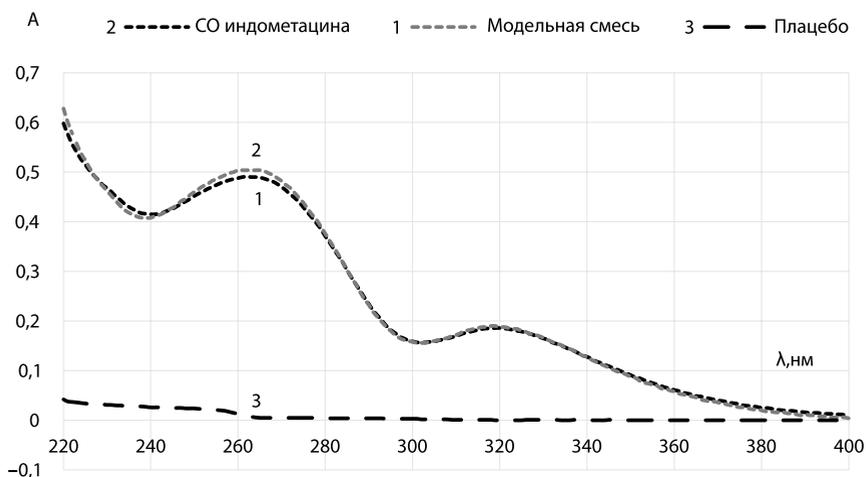


Рис. 2. УФ-спектры: 1 – раствора модельной смеси; 2 – раствора сравнения; 3 – раствора плацебо

Fig. 2. UV spectra: 1 – a solution of a model mixture; 2 – comparison solution; 3 – placebo solution

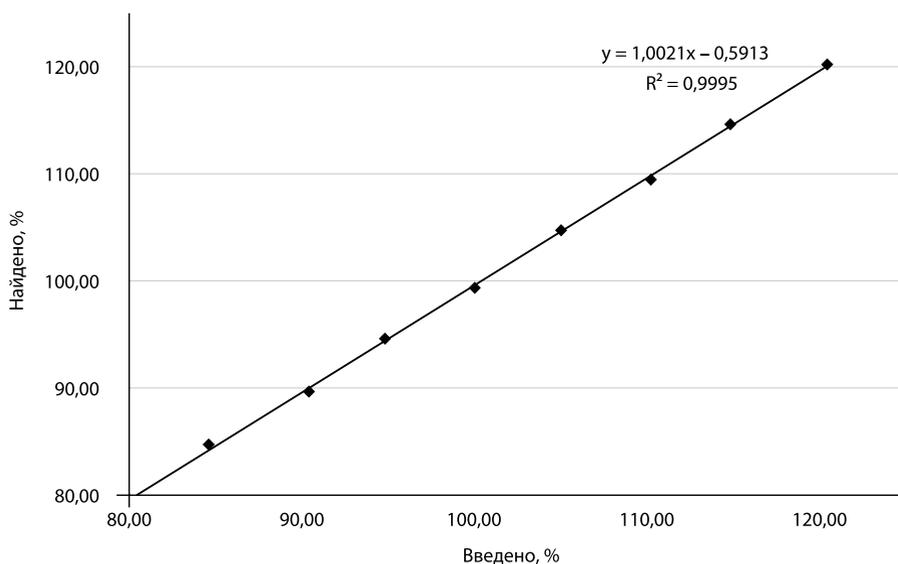


Рис. 3. Зависимость отношения оптической плотности от концентрации раствора индометацина

Fig. 3. The dependence of the ratio of optical density on the concentration of the solution of indomethacin

Так, на основе проведенного эксперимента можно сделать вывод, что разработанная методика может быть использована для количественного определения индометацина в разработанном оригинальном препарате – бигели для комплексной терапии мастопатии.

Таблица 1
Метрологические характеристики линейной зависимости

Величина	Значение	Требования	Оценка результатов (выдерживаются либо не соблюдаются)
b	1,0021		
s_b	0,0080		
a	0,5913	$\leq 2,60$	выдерживаются
s_a	0,8026		
s_0	0,3094		
$s_{0/b}$	0,3088	$\leq 0,84$	выдерживаются
s_y	13,75		
r	0,9997	$\geq 0,9981$	выдерживаются

Table 1
Metrological characteristics of a linear relationship

Value	Value	Requirements	Evaluation of results (aged or not respected)
b	1,0021		
s_b	0.0080		
a	0.5913	≤ 2.60	are kept
s_a	0.8026		
s_0	0.3094		
$s_{0/b}$	0.3088	≤ 0.84	are kept
s_y	13.75		
r	0,9997	≥ 0.9981	are kept

Таблица 2
Результаты анализа модельных смесей и их статистическая обработка

Относительное стандартное отклонение, s_z , %	0,34
Относительный доверительный интервал $\Delta\% = T(95\%, 8) \times s_z = 1,8565 \times s_z$	0,65
Критическое значение для сходимости результатов $\Delta A_y, \% \leq$	1,60
Систематическая погрешность $\delta = X - 100 $	0,39
Критерий незначительности систематической погрешности $\delta \leq \Delta\% / 3 = 0,65 / 3 = 0,22$	выполняется
Общий вывод о методике	корректная

Table 2
The results of the analysis of model mixtures and their statistical processing

Relative standard deviation, s_z , %	0.34
Relative Confidence Interval $\Delta\% = T(95\% .8) \times s_z = 1.8565 \times s_z$	0.65
Critical for convergence $\Delta A_y, \% \leq$	1.60
Systematic error $\delta = X - 100 $	0.39
The criterion for the insignificance of systematic error $\delta \leq \Delta\% / 3 = 0.65 / 3 = 0.22$	performed
General conclusion about the technique	correct

Для идентификации индометацина в лекарственной форме предложено использовать химическую реакцию с натрия гидроксидом.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложены условия спектрофотометрического определения индометацина в разработанном бигеле для терапии мастопатии, которые можно использовать для идентификации и количественного определения действующего вещества при изучении стабильности. Установлено, что максимумы поглощения кислотного раствора наблюдаются при длине волн 262 и 318 нм, щелочного – при 227 и 282 нм.

Проведена процедура валидации спектрофотометрической методики количественного определения индометацина с использованием критериев приемлемости для допусков содержания $\pm 50\%$, подтверждающая специфичность, линейность, прецизионность и правильность предложенной методики.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование – Л.И. Вишневская; концепция и дизайн исследования, сбор материала, обработка, написание текста – С.С. Зуйкина; концепция и дизайн исследования – Н.Ю. Бевз.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Potapov V.A. (2016) Multitarget approach to the treatment of fibrocystic mastopathy and prevention of breast cancer. *Women's Health*, no 1 (107), pp.18–29.
2. Zulkarnaeva E.T., Khakimova P.X., Lapan E.I., Blagodetev I.L. (2008) Indinol-3 carbinol in the treatment of benign breast diseases. Tumors of the female reproductive system, no 3, pp. 50–54.
3. Brew C.T., Aronchik I., Hsu J.C. (2006) Indole-3-carbinol activates the ATM signaling pathway independent of DNA damage to stabilize p53 and induce G1 arrest of human mammary epithelial cells. *Int J. Cancer*, vol. 118 (4), pp. 857–68.
4. Lucas S. (2016) The Pharmacology of Indomethacin. *Headache*, no 56 (2), pp. 436–446. doi: 10.1111 / head.12769.
5. Papich M.G. (2016) Indomethacin. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs (Fourth Edition)*, pp. 369–367.
6. Zuykina S.S., Vishnevskaya L.I. (2020) Methodology of development of combined medicines on the basis of medicinal plant raw materials for treatment of mastopathy. *Management, economics and quality assurance in pharmacy*, no 1 (61), pp. 6–13.
7. (2015) *State Pharmacopoeia of Ukraine: in 3 volumes*. State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines». The second type. Kharkiv: State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Drug Quality», vol. 1, 1128 p.
8. (2018) *The European Pharmacopoeia. 9th ed.* European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe, Strasbourg, vol. 6. URL:<http://online6.edqm.eu/ep900/>.
9. (2007) *The Japanese Pharmacopoeia*. The National Institute of Health Sciences. 15th ed. Tokyo, 1788 p.
10. (2018) *British Pharmacopoeia*. The British Pharmacopoeia secretariat. London, URL:<https://www.pharmacopoeia.com/>
11. Rathod S.B., Salunke P.A., Kulkarni V.C. (2017) Spectroscopic Quantitation and analytical validation of Indomethacin in bulk drug and capsule formulation. *Journal of Pharmacy Research*, vol.11 (2), pp. 124–127.
12. Novakova L., Matysova L., Havlikova L., and Solich P. (2005) Development and validation of HPLC method for determination of indomethacin and its two degradation products in topical gel. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 37, pp. 899–905.
13. Reddy B.V., Ujwala P., Sandeep P., Deepthi A. (2014) Pharmaceutical Validation-A Review. *International Journal of Research in Pharmacy and Life Sciences*, no 2 (2), pp. 236–247.
14. Gryzodub A.I. (2016) *Standardized procedures for validation of methods of quality control of drugs*. Kharkiv: State Enterprise «Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Drug Quality», 396 p.

Поступила/Received: 14.07.2020

Контакты/Contacts: zujkin.svetlana@gmail.com