

УДК 615.276:543.544.5:54.062

Л. В. БРУНЬ, С. М. ГУБАРЬ

*Національний фармацевтичний університет*

## РОЗРОБКА МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ В ПЛАЗМІ КРОВІ ЩУРІВ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З УРАХУВАННЯМ ОСОБЛИВОСТЕЙ АНАЛІЗУ МІКРОКОНЦЕНТРАЦІЙ ДІЮЧОЇ РЕЧОВИНИ

*Проведено пробопідготовку біологічних об'єктів для вивчення кількісного вмісту диклофенаку натрію. Доведена лінійність залежності площі піку диклофенаку натрію від концентрації субстанції у розчині (5-25 мкг/мл). У якості методу екстракції був обраний метод твердофазної екстракції (ТФЕ). Аналіз показав, що концентрація диклофенаку натрію у зразках, які вивчалися, знаходиться у межах 2-4 мкг/мл. Розроблено методику кількісного визначення диклофенаку натрію в зразках плазми крові щурів методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з урахуванням особливостей аналізу мікроконцентрацій діючої речовини.*

*Ключові слова:* нестероїдні протизапальні препарати; диклофенак натрію; глюкозамін; високоефективна рідинна хроматографія

### ВСТУП

Більше тридцяти мільйонів людей у світі, з яких 20 %, які знаходяться у стаціонарах, кожен день приймають нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) [2, 4, 5]. На теперішній час ця група лікарських препаратів є однією з найбільших і клінічно важливих, оскільки саме НПЗП називають препаратами «першого ряду» в лікуванні запальних процесів системних захворювань сполучної тканини, зокрема остеоартрозу. Одним із препаратів групи НПЗП, який найбільш широко використовується у сучасній медицині та фармації, є диклофенак натрію.

Проведення досліджень лікарських препаратів є трудомістким процесом, який потребує великої затрати часу та коштів. У зв'язку з цим підвищення якості проведення досліджень стало можливим завдяки розвитку фармації: впровадженню високочутливих методів досліджень, таких як рідинна і газова хроматографія, радіоімунний і ферментохімічний аналізи. Тому вивчення особливостей фармакодинаміки та фармакокінетики при використанні відомих лікарських препаратів є актуальною задачею медицини та фармації.

**Мета роботи:** розробити методику кількісного визначення диклофенаку натрію в зразках плазми крові щурів методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з урахуванням особливостей аналізу мікроконцентрацій діючої речовини для подаль-

шого вивчення фармакокінетики диклофенаку натрію в експерименті на тваринах.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Диклофенак натрію – натрію 2-[(2,6 – дихлорофеніл) аміно] феніл] ацетат – володіє виразною проти-запальною, аналгетичною дією, а також помірно виразною жарознижуючою активністю. Для проведення досліджень використовували субстанцію диклофенаку натрію виробництва Борщагівського хіміко-фармацевтичного заводу (БХФЗ) серією № 20040609.

Експериментальні дослідження проведені на базі експериментально-біологічної клініки Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України». Тварини, які використовувалися в експерименті – нелінійні білі щури популяції експериментально-біологічної клініки ДУ «ІПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України».

Для проведення експерименту було відібрано 12 щурів-самців масою 250-300 г, яких утримували згідно з санітарними нормами на стандартному раціоні [1]. Робота з тваринами проводилась згідно з Міжнародними вимогами про гуманне ставлення до тварин та з дотриманням вимог директиви 86/609/ЕЕС з питань захисту тварин.

Диклофенак натрію розчиняли у воді очищеній та вводили перорально в об'ємі 0,5 мл на 100 г маси тварини у дозі  $\frac{1}{2}$  ЕД<sub>50</sub> – що складає відповідно 4 мг/кг маси тіла тварин [1, 4]. Тварини були поділені на 3 групи

© Брунь Л. В., Губарь С. М., 2016

(n = 4): першу групу тварин виводили з експерименту через 30 хв, другу – через 60 хв, третю – через 90 хв після введення препарату.

Кров відбирали у кількості 7-10 мл в промарковані пробірки, які були оброблені гепарином. Зразки крові центрифугували (3000 об/хв, 15 хв), отримували плазму крові. Проміжок між забором проби крові та її обробкою не перевищував 5 хв. До аналізу плазми проби зберігали при температурі – 80 °С.

Для визначення диклофенаку натрію в лікарських формах, а також в біологічних рідинах і органах людини існують наступні методи – рН-метричне титрування [11], газова хроматографія з мас-спектрометричним детектуванням [10, 11], електрофорез і електрокінетична капілярна хроматографія [9, 12], флуоресцентна спектроскопія [6], спектрофотометрія [7, 8]. Однак більшість авторів визначали диклофенак у біологічних середовищах з використанням хроматографії. Хроматографічне дослідження проводилося з використанням внутрішніх стандартів або без них. У літературі відмічено, що найбільш високочутливим є метод рідинної хроматографії. Тому саме цей метод був використаний нами для встановлення концентрацій досліджуваної субстанції на всіх етапах дослідження. В якості робочого стандартного зразка (РСЗ) використовували субстанцію диклофенаку натрію виробництва фірми «Amoli Organics Ltd» (серія № 20061013).

**Методика.** Випробовувану плазму крові об'ємом близько 1-0,8 мл поміщають у пробірку для центрифугування об'ємом 6 мл, додають 250 мкл розчину суміші для осадження білків (2,7 г сульфату цинку  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  в 7 мл 25 % фосфорної кислоти  $H_3PO_4$ ), струшують впродовж 30 с. Додають 5 мл суміші *гексан* : *ізопропанол* (95 : 5), струшують впродовж 1 хв. Розчин центрифугують протягом 10 хвилин зі швидкістю 6000 об/хв; 3,5 мл органічного шару відбирають і упарюють у струмі повітря насухо при температурі 40 °С. Залишок розчиняють в 150 мкл диметилсульфоксиду (ДМСО). Це зумовлено тим, що обов'язковим для двох введень проби (у разі, коли об'єм петлі дозатора складає 20 мкл і залишковий об'єм мікроставки віали – 15 мкл) об'єм випробовуваного розчину має бути не менше 134 мкл, а ДМСО обраний як універсальний нелеткий розчинник. По 20 мкл випробовуваного розчину і розчинів порівняння хроматографують на рідинному хроматографі з УФ-детектором у наступних умовах:

- колонка розміром 250 × 4,6 мм, заповнена сорбентом Waters XTerra RP18 з розміром часток 5 мкм;
- довжина хвилі детектування – 280 нм;
- температура колонки – 30 °С;
- об'єм, що хроматографується – 20 мкл;
- час аналізу – 8 хвилин;
- швидкість потоку – 1,5 мл/хв;
- рухома фаза А: вода для хроматографії – ацетонітрил для хроматографії – кислота трифторооцтова (200 : 800 : 1);

Таблиця 1

## ГРАДІЄНТ РУХОМОЇ ФАЗИ

Час, хв	Рухома фаза А, % (v/v)	Рухома фаза В, % (v/v)	Швидкість потоку, мл/хв
0-6,0	88	12	1,5
6,0-7,0	88 → 5	12 → 95	1,5
8,59-9,0	5	95	1,5 → 2
10,30-11,30	5 → 88	95 → 12	2
13,00-13,01	88	12	2 → 1,5
13,01-14,0	88	12	1,5

- рухома фаза В: ацетонітрил для хроматографії – кислота трифторооцтова (1000 : 1);
- співвідношення рухомих фаз А і В – 50 : 50.

Для екстрагування диклофенаку натрію із зразків плазми крові щурів був використаний метод твердофазової екстракції (ТФЕ) [11]. Для роботи використовували картриджі Supel™-Select HLB SPE (Supelco) 30 mg/1 ml.

Статистична обробка одержаних експериментальних даних проводилась за допомогою програми STATISTICA (StatSoft Inc., США). Вірогідність отриманих результатів оцінювали на рівні значущості не менше 95 % ( $p \leq 0,05$ ) [3].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Проведення пробопідготовки до визначення кількісного вмісту диклофенаку натрію**

На I етапі при визначенні кількісного вмісту диклофенаку натрію методом рідинної хроматографії за змістом вказаної вище методики були встановлені необхідні характеристики. Градієнт рухомих фаз, необхідних для проведення рідинної хроматографії, представлені у табл. 1.

**Приготування рухомої фази А.** 1 мл трифторооцтової кислоти Р розчиняють у 200 мл води Р, додають 800 мл ацетонітрилу для хроматографії Р і фільтрують крізь мембранний фільтр 0,45 мкм.

**Приготування рухомої фази В.** 1 мл трифторооцтової кислоти Р розчиняють в 1000 мл ацетонітрилу для хроматографії Р і фільтрують крізь мембранний фільтр 0,45 мкм.

На II етапі дослідження методика була адаптована до вивчення концентрації у біологічних об'єктах, де до вказаних умов проведення досліді додавалось використання ацетатного буфера.

**Приготування ацетатного буфера.** 4 г ацетату амонію розчиняють у 100 мл води, потенціометрично доводять рН отриманого розчину льодяною оцтовою кислотою до  $2,0 \pm 0,05$ .

**Приготування розчинів порівняння**

**Приготування розчину порівняння А (вихідний розчин порівняння).** Близько 0,020 г (точна навеска) РСЗ диклофенаку натрію поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 30 мл 20 % розчину метанолу, перемішують до розчинення, доводять

Таблиця 2

**ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ ПОРІВНЯННЯ  
В, С, D, E, F, G, H, I**

Код розчину порівняння	Об'єм вихідного розчину порівняння А, мл	Об'єм розчинника (20 % MeOH), мл	Концентрація розчину, мкг/мл
В	0,05	до 100	0,1
С	0,2	до 100	0,4
D	0,5	до 100	1
E	1	до 100	2
F	2,5	до 100	5
G	5	до 100	10
H	1	до 10	20
I	3	до 10	60

до позначки тим самим розчином та перемішують. Перед випробуванням розчини фільтрують крізь мембранний фільтр 0,45 мкм.

**Приготування розчинів порівняння В, С, D, E, F, G, H, I.** Відібраний об'єм розчину порівняння А (табл. 2) поміщають у мірну колбу, доводять до позначки 20 % розчином метанолу та перемішують. Перед випробуванням розчини фільтрують крізь мембранний фільтр 0,45 мкм.

Хроматограми розчинів порівняння В, С, D, F, G, H, I наведені на рис. 1.

**Перевірка залежності площі піку диклофенаку натрію від концентрації субстанції у розчині**

На першому етапі роботи була перевірена лінійність залежності площі піку диклофенаку від концентрації субстанції у розчині для очікуваного діапазону значень (5-25 мкг/мл). Для цього були приготовані

розчини стандарту диклофенаку натрію з концентраціями 5, 10, 15, 20 і 25 мкг/мл у воді.

**Приготування розчину стандарту А (вихідний розчин стандарту).** Близько 0,050 г (точна наважка) РСЗ субстанції диклофенаку натрію поміщають у мірну колбу місткістю 200 мл, додають 30 мл води для хроматографії, перемішують до розчинення, доводять до позначки тим самим розчином та перемішують.

**Приготування розчинів стандарту 5, 10, 15, 20 і 25 мкг/мл.** По 1, 2, 3, 4 і 5 мл розчину стандарту А поміщають в окремі мірні колби на 50 мл, доводять до позначки водою та перемішують. Отримують відповідно розчини з концентраціями 5, 10, 15, 20 і 25 мкг/мл. Перед випробуванням розчини фільтрують крізь мембранний фільтр 0,45 мкм.

Для приготованих розчинів отримані хроматограми (рис. 2) та розрахована лінійність (табл. 2, рис. 2). Перевірка лінійності представлена на рис. 2.

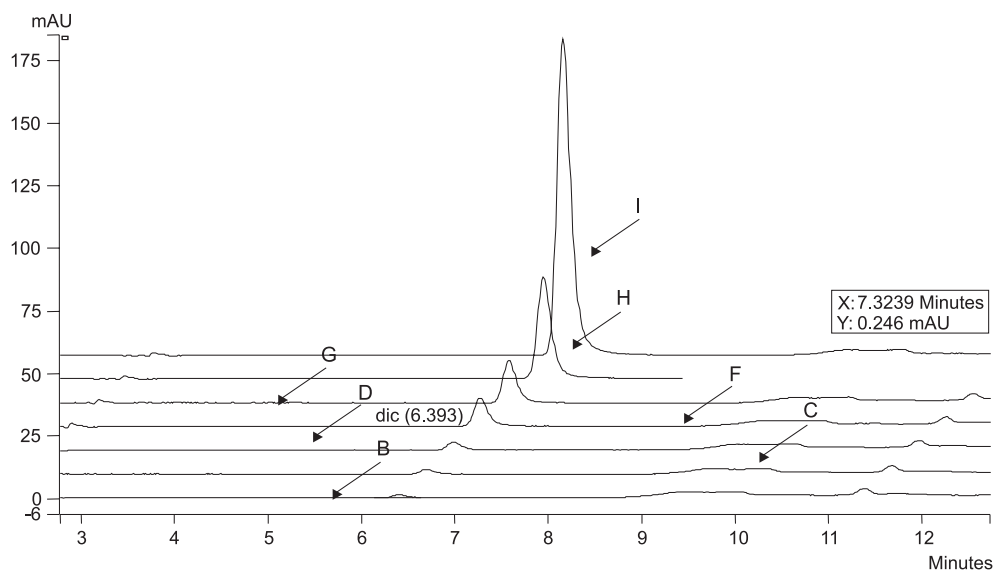
Залежність площі піку диклофенаку натрію від концентрації субстанції у розчині представлена на рис. 3.

Таким чином, залежність площі піку диклофенаку натрію від концентрації є лінійною ( $R^2 = 0,9997$ ).

**Розробка методики екстрагування та концентрування диклофенаку натрію**

У зв'язку з тим, що пряме визначення диклофенаку натрію у плазмі крові в наших умовах неможливе (за рахунок коагуляції білків плазми під час аналізу, що призводить до незворотного пошкодження колонки), треба було використовувати методи екстрагування диклофенаку натрію із зразків. У якості методу екстракції було обрано метод твердофазової екстракції (ТФЕ). Він відрізняється відносною простотою, відтворюваністю, достатньо високою ефективністю та експресністю. На III етапі роботи методика була використана для проведення досліджень.

Аналіз показав, що концентрація диклофенаку у зразках, які вивчалися, знаходиться у межах 2-4 мкг/мл.



**Рис. 1.** Хроматограми розчинів порівняння В, С, D, F, G, H, I

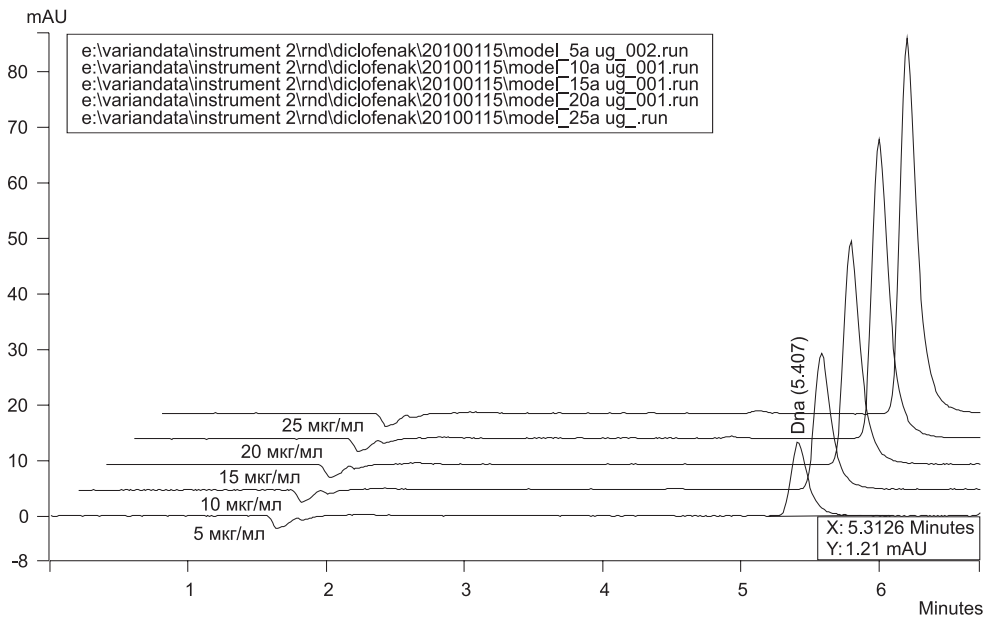


Рис. 2. Хроматограми диклофеналу натрію 5, 10, 15, 20 і 25 мкг/мл

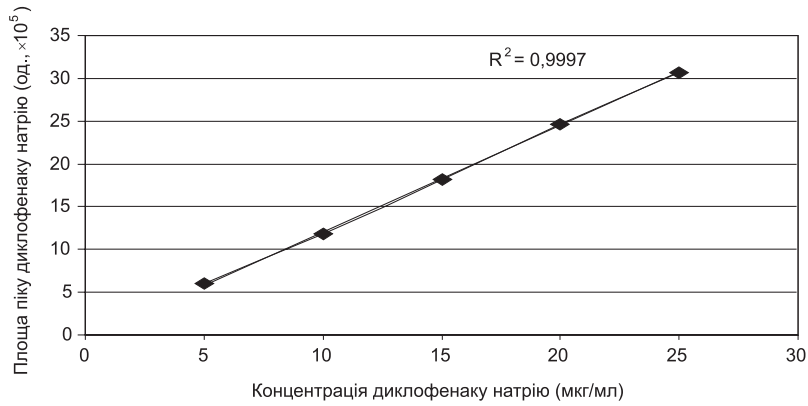


Рис. 3. Залежність площі піку диклофеналу натрію від концентрації субстанції у розчині

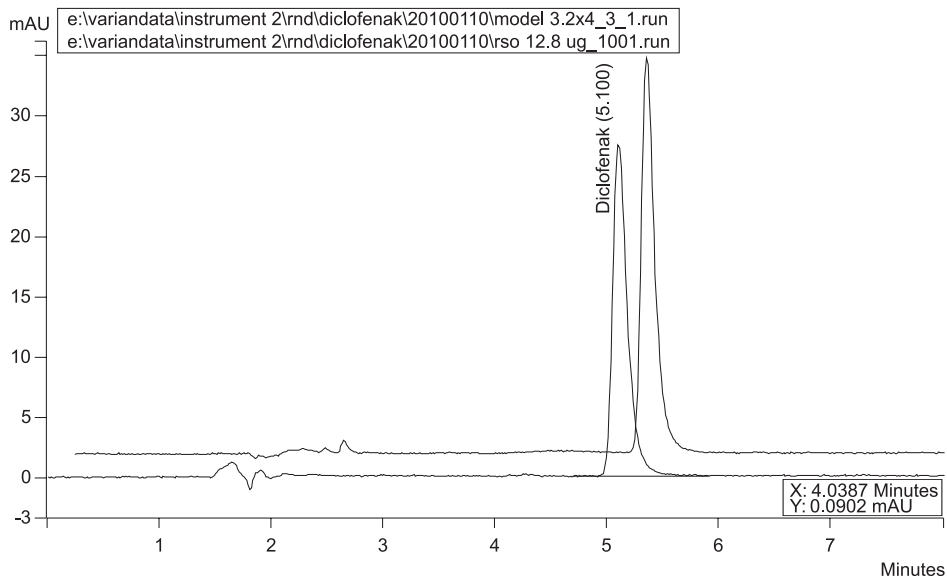


Рис. 4. Хроматограма сконцентрованої з використанням ТФА зразка з концентрацією 3,2 мкг/мл (1) у порівнянні з розчином стандарту 12,8 мкг/мл (2)



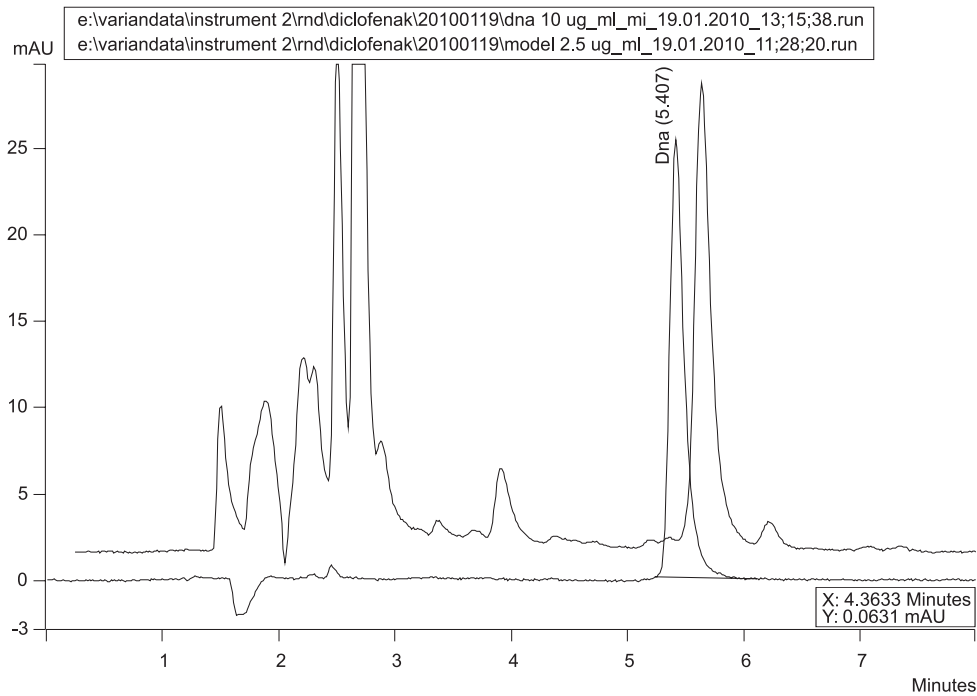


Рис. 5. Хроматограма сконцентрованої з використанням ТФА модельного розчину зразка плазми з концентрацією 2,5 мкг/мл (1) у порівнянні з розчином стандарту 10,0 мкг/мл (2)

Таблиця 3

#### СТУПІНЬ ЕКСТРАГУВАННЯ ДИКЛОФЕНАКУ НАТРІЮ З МОДЕЛЬНИХ РОЗЧИНІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ЩУРІВ

m	v	$X_i$	$X_{cp}$	$S^2$	$S_{cp}$	P	t(P,v)	Довірчий інтервал	$\epsilon, \%$
5	4	99,51	100,61	7,185730000	1,1988	0,95	2,78	100,61 ± 3,33	3,31
		99,68							
		100,05							
		105,29							
		98,50							

Така концентрація непридатна для детектування доліджуваної речовини в наших умовах, тому метод ТФЕ поєднали з концентруванням зразків.

Розробку методики пробопідготовки та екстрагування проводили з використанням водних розчинів диклофенаку натрію з концентраціями 3,2 мкг/мл та перевіряли на модельних зразках плазми крові щурів контрольної групи, до яких додавали диклофенак натрію до концентрації 2,5 мкг/мл.

До 1 мл розчину диклофенаку (2,5 мкг/мл) додавали 1 мл води для хроматографії або плазми крові щурів контрольної групи та 200 мкл ацетатного буфера. Розчин перемішували та повільно (1 крапля за секунду) пропускали через попередньо промитий 2 мл метанолу та 1 мл води очищеної картридж для ТФЕ. Картридж послідовно промивали 2 мл води очищеної та 0,5 мл 5 % розчину метанолу. Елюювання диклофенаку проводили сумішшю метанол – ацетонітрил (50 : 50, об/об) у кількості 250 мкл. Таким чином, ТФЕ поєднувалася з концентруванням зразків у 4 рази.

Для отриманих сконцентрованих зразків одержані хроматограми (рис. 4, рис. 5) та розрахований ступінь екстрагування диклофенаку (табл. 3).

Таким чином, ступінь екстрагування диклофенаку натрію з модельних розчинів складає  $100,61 \pm 3,33 \%$ .

#### ВИСНОВКИ

Розроблено методику кількісного визначення диклофенаку натрію в зразках плазми крові щурів методом високоефективної рідинної хроматографії з урахуванням особливостей аналізу мікроконцентрацій діючої речовини.

#### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів / За ред. О. В. Сефанова [метод. рекомендації]. – К.: Авіценна, 2001. – С. 528.
2. Компендиум 2015 – лекарственные препараты / Под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К.: Морион, 2015. – 2320 с.
3. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
4. Лобенко О. О., Корж М. О., Дедух Н. В. та співавт. Остеоартроз. Консервативна терапія / За ред.

- М. О. Коржа, Н. В. Дєдх, І. А. Зупанця. – Х.: Прапор, 1999. – 336 с.
5. Лоуренс Д. Р., Бенитт П. Н. Клиническая фармакология. – М.: Медицина, 1991. – Т. 1. – С. 485-524.
  6. Brunner L. A. An automated method for the determination of diclofenac sodium in human plasma / L. A. Brunner, R. S. Luders // J. Chromatogr. Sci. – 1991. – Vol. 29, № 7. – P. 287-291.
  7. Garcia M. S. Flow-injection spectrophotometric determination of diclofenac sodium in pharmaceuticals and urine samples / M. S. Garcia, M. I. Albero, C. Sanchez-Pedreno, J. Molina // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1998. – Vol. 17, № 2. – P. 267-273.
  8. In vivo bioequivalence guidances (1090) – U.S. Pharmacopeia 23, NF 18. – 1995. – P. 3028-3053.
  9. Kamath B. V. High-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma and urine / B. V. Kamath, K. Shivram, A. C. Shah // J. Chromatogr. – 1993. – Vol. 12, № 3. – P. 324-329.
  10. Kuhlmann O. Simultaneous determination of diclofenac and oxybuprocaine in human aqueous humor with HPLC and electrochemical detection / O. Kuhlmann, G. Stoldt, H. G. Struck, G. J. Krauss // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1998. – Vol. 17, № 8. – P. 1351-1356.
  11. United States Pharmacopeia / Official Monographs. – 1995. – P. 546.
  12. Zecca L., Ferrario P., Costi P. Determination of diclofenac and its metabolites in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection / L. Zecca, P. Ferrario, P. Costi // J. Chromatogr. – 1991. – Vol. 8, № 2. – P. 425-432.

### УДК 615.276:543.544.5:54.062

Л. В. Брунь, С. Н. Губарь

#### РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С УЧЕТОМ ОСОБЕННОСТЕЙ АНАЛИЗА МИКРОКОНЦЕНТРАЦИЙ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА

Проведена пробоподготовка биологических объектов для изучения количественного содержания диклофенака натрия. Доказана линейность зависимости площади пика диклофенака натрия от концентраций субстанции в растворе (5-25 мкг/мл). В качестве метода экстракции был выбран метод твердофазовой экстракции (ТФЭ). Анализ показал, что концентрация диклофенака натрия в изучаемых образцах находится в пределах 2-4 мкг/мл. Разработана методика количественного изучения диклофенака натрия в образцах плазмы крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с учетом особенностей анализа микроконцентраций действующего вещества.

**Ключевые слова:** нестероидные противовоспалительные препараты; диклофенак натрия; глюкозамин; высокоэффективная жидкостная хроматография

### UDC 615.276:543.544.5:54.062

L. V. Brun, S. N. Gubar

#### DEVELOPMENT OF METHOD OF DICLOPHENAC SODIUM QUANTITATIVE DETERMINATION IN RAT'S PLASMA BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WHICH BASED ON ANALYSIS OF CHARACTERISTICS OF THE ACTIVE SUBSTANCE MICROCONCENTRATIONS

For the study of the quantitative content of diclofenac sodium the sample preparation of biological objects was performed. The linearity of the diclofenac sodium peak area and the substance concentration in solution (5-25 mg/ml) was proved. The solid phase extraction (SPE) method was selected as the extraction method. The analysis showed that the concentration of diclofenac sodium in the samples was in the range of 2-4 mg/ml. The method for the quantitative study of diclofenac sodium in the blood plasma samples of rats by high performance liquid chromatography (HPLC) that takes into account the characteristics of the analysis of active ingredient microconcentrations has been developed.

**Key words:** nonsteroidal anti-inflammatory drugs; diclofenac sodium, glucosamine; high performance liquid chromatography

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Куликівська, 12.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 03.05.2016 р.