

ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИОКОЛХИКОЗИДА И ДИКЛОФЕНАКА ДИЭТИЛАММОНИЯ В ГЕЛЕВОЙ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОМ КВАДРАТНО-ВОЛНОВОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ

© 2020 г. Севилай Эрдоган Каблан^a, Нуран Озалтын^{a, *}

^aОтделение аналитической химии фармацевтического факультета, Университет Хаджеттепе, Хаджеттепе, 06100 Турция

*e-mail: nozaltin@hacettepe.edu.tr

Поступила в редакцию 18.12.2018 г.

После доработки 19.07.2019 г.

Принята к публикации 08.10.2019 г.

Разработан быстрый, простой, чувствительный, точный и специфический метод квадратно-волновой вольтамперометрии для одновременного определения тиоколхикозида (ТС) и диклофенака диэтиламмония (DDA) в гелевой композиции для местного применения. Комбинация ТС и DDA оказывает синергетическое действие при лечении ревматоидного артрита и других сопутствующих состояний. Оптимальные условия были получены в буфере Бриттона–Робинсона при pH 3.00 для электровосстановления на электроде в виде висячей ртутной капли. Четко определенные пики наблюдались для ТС при -0.85 В и для DDA при -1.18 В относительно Ag/AgCl/ 4.6 М KCl. В оптимальных условиях диапазоны линейного отклика для определения ТС и DDA составляли 1.07–24.2 и 5.64–45.8 мкМ с пределами обнаружения 0.54 и 3.25 мкМ соответственно. Электрохимические свойства веществ, такие как тип тока и обратимость электродных реакций, были исследованы с помощью циклической вольтамперометрии. Также были предложены механизмы восстановления. Метод был утвержден с точки зрения надежности, точности, чувствительности и специфичности в соответствии с руководящими принципами Международной конференции по гармонизации. Разработанный метод был применен для одновременного определения ТС и DDA в гелевой композиции для местного применения, включая бинарные смеси. Вспомогательные ингредиенты, присутствующие в композиции, не влияют на анализ. Метод подходит для применения в лабораториях контроля качества, потому что он является простым и быстрым, обеспечивая высокую точность и надежность.

Ключевые слова: одновременное определение, тиоколхикозид, диклофенак диэтиламмония, гель для местного применения, квадратно-волновая вольтамперометрия, валидация

DOI: 10.31857/S0424857020060067

ВВЕДЕНИЕ

Нестероидные противовоспалительные препараты широко используются при лечении ревматоидного артрита и других сопутствующих состояний. Однако они несут риск нежелательных системных побочных эффектов и раздражения желудочно-кишечного тракта при обычной дозе перорального приема [1]. Актуальные и трансдермальные продукты являются важными классами систем доставки лекарств, и их применение в терапии становится все более распространенным, поскольку они являются весьма привлекательными, включая повышенную приемлемость для пациентов (неинвазивность), предотвращение желудочно-кишечных расстройств [2] и пре-системный метаболизм лекарственного средства [3, 4].

Тиоколхикозид (ТС) представляет собой (s)-N-[3-(BD-глюкопираноксилокси)-5,6,7,9-тетрагидро-1,2-диметокси-10-(метилтио)-9-оксобензо[а]гептален-7-ил]ацетамид, серное производное колхикозида (рис. 1а), миорелаксанта, который, как утверждается, обладает миметическим и глицинергическим действием ГАМК. Его применяют при симптоматическом лечении болезненных мышечных спазмов [5].

Диклофенак диэтиламмония (DDA) представляет собой 2-[(2,6-дихлоранилино)фенил]ацетат (рис. 1б), ингибитор фермента простагландинсинтетазы, и широко используется при мышечно-скелетных заболеваниях, артрите, зубной боли, дисменорее и т.д., а также для симптоматического облегчения боли и воспаления [6].

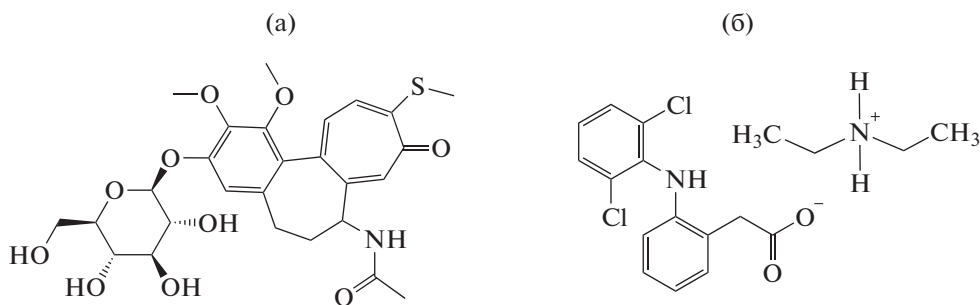


Рис. 1. Химическая структура: а – ТС, б – DDA.

В сочетании ТС и ДВР производят синергетическое действие и применяются для симптоматического облегчения боли в пояснице, послеоперационной боли, а также в случаях ревматического артрита, остеоартрита, травмы опорно-двигательного аппарата и хронической боли, связанной с раком [5]. Обзор литературы показал, что для анализа ТС, как отдельного компонента, так и в комбинации с другими препаратами, были описаны несколько аналитических методов, такие как спектрофотометрия [7], ТСХ [8], ВЭЖХ [9–11] и радиоиммуноанализ [12]. Аналогичным образом, были описаны несколько спектрометрических методов [13, 14], а также хроматографических методов [15–18] для определения некоторых солей диклофенака в качестве отдельного лекарственного средства или в сочетании с другими лекарственными средствами. Но есть только один метод ВЭЖХ для анализа DDA [19]. Не было найдено какой-либо литературы об одновременном определении ТС и DDA в фармацевтических препаратах. Метод ВЭЖХ требует использования токсичных органических растворителей, тщательной предварительной обработки образцов и высоких затрат на внедрение. В этом смысле разработка экологически чистого, недорогого и более простого аналитического метода очень важна для контроля качества фармацевтических составов и клинической диагностики. Вольтамперометрические методы представляют собой весьма удобный альтернативный подход для определения нескольких фармацевтических препаратов [20–25]. Квадратно-волновая вольтамперометрия (SWV) считается важной электрохимической методикой, используемой при разработке аналитических процедур для индивидуального и/или одновременного определения широкого спектра соединений, представляющих интерес для фармацевтики, поскольку она обеспечивает быстроту, чувствительность, надежность, точность и простоту [26]. SWV может использоваться для проведения эксперимента намного быстрее, чем обычные и дифференциально-импульсные вольтамперометрические (DPV) методы, которые обычно работают со скоростью сканирования от 1 до 10 мВ/с.

SWV использует скорости сканирования до 1000 мВ/с или выше, что позволяет намного быстрее определять. Есть преимущества: большая скорость анализа и меньшее потребление электроактивных соединений по отношению к DPV, а также уменьшенные проблемы с блокировкой поверхности электрода [27]. Отклик SWV в 4 и 3 раза выше, чем отклик DPV, для обратимой и необратимой систем соответственно. Следовательно, типичные измерения SWV занимают всего 1–5 с, в то время как DPV требует гораздо более длительного времени анализа, примерно 2–4 мин [28–32]. Другое преимущество SWV, разность тока больше, чем прямой или обратный ток, поэтому высота пика, как правило, довольно легко читается, что повышает точность. Прямой ток i_2 , обратный ток i_1 или разностный ток ($i = i_2 - i_1$) могут использоваться в качестве отклика в этом методе. Чистый ток вносит лишь очень небольшой вклад в ток зарядки. Также отображаются две составляющие чистого отклика, ток прямой и обратной серии импульсов. Чувствительность увеличивается из-за того, что чистый ток больше, чем прямая или обратная составляющая. Также чувствительность SWV выше, чем у DPV [32].

Эффект вспомогательных веществ, присутствующих в гелевой композиции для местного применения, важен из-за того, что мешает анализу. Анализ лекарственного средства в гелевой препаративной форме для местного применения требует трудоемких методов подготовки образцов для хроматографических и спектроскопических методов. В предлагаемом вольтамперометрическом методе наполнители, присутствующие в препарате, не влияют на анализ. Потому что они не восстанавливаются и не окисляются при использовании вспомогательного электролита для анализа лекарств. Таким образом, не наблюдалось никакого пика в отношении вспомогательных веществ.

Насколько известно авторам, нет опубликованных отчетов о методе одновременного вольтамперометрического определения ТС и DDA в фармацевтических композициях. Целью данного

исследования является разработка ранее не опубликованного дешевого и быстрого метода SWV для одновременного определения ТС и DDA в гелевой композиции для местного применения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приборы

Для вольтамперометрических измерений использовали электрохимический анализатор BAS 100 В/В (Bioanalytical System, США). В качестве рабочего, контрольного и противозэлектрода использовали, соответственно, электрод в форме висячей ртутной капли (HMDE), Ag/AgCl с насыщенным KCl (4.6 М) и платиновую проволоку. Начальный потенциал был приложен при -0.6 В с частотой 50 Гц, шаг потенциала составлял 8 мВ, амплитуда импульса составляла 60 мВ на HMDE. Все измерения проводились при комнатной температуре.

Реагенты и растворы

Рабочие стандарты ТС и DDA были любезно предоставлены АО “Али Раиф Илач Санайи” и АО “Абди Ибрагим Илачом Санайи ве Тикарет”, соответственно. H_3PO_4 , H_3BO_3 , HCl и NaOH были приобретены у компании Merck. Деионизованная вода, полученная из системы водоснабжения Milli-Q, использовалась для приготовления растворов. Стандартные исходные растворы ТС и DDA (2×10^{-3} М) готовили в деионизованной воде. Их хранили при $+4^\circ C$ и готовили ежедневно, разбавляя исходный раствор деионизованной водой.

Получение раствора фонового электролита

Буферный раствор Бриттона–Робинсона (BR) при pH 3.00 использовали в качестве фонового электролита для восстановления ТС и DDA. Буферный раствор BR готовили растворением 2.47 г H_3BO_3 в смеси 2.7 мл H_3PO_4 и 2.3 мл ледяной CH_3COOH , разбавленной до 1000 мл деионизированной водой, и pH доводили до 3.00 с помощью 0.1 М NaOH.

Получение образцов

Навеску 1.00 г гелевой композиции для местного применения в геле переносили в мерную колбу на 50 мл. Добавляли 50 мл воды Milli-Q и обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин для полного растворения ТС и DDA в растворах. Затем колбу разбавляли до объема дистиллированной водой. Подходящие аликвоты из раствора образца соответствующим образом разбавляли водой Milli-Q.

Процедура

Циклическая вольтамперометрия (CV) и квадратно-волновая вольтамперометрия были использованы для предварительных исследований электрохимического поведения ТС и DDA. Метод SWV был использован для разработки электроаналитической методологии для одновременного определения веществ. С использованием оптимальных параметров калибровочную кривую для ТС получали путем последовательного добавления аликвот стандартного раствора ТС в измерительную ячейку, содержащую 3.0 мл поддерживающего электролита и постоянное количество DDA. Калибровочную кривую для DDA получали путем последовательного добавления аликвот стандартного раствора DDA в измерительную ячейку, содержащую 3.0 мл фонового электролита и постоянное количество ТС. Квадратно-волновые вольтамперограммы регистрировали после каждого аликвотного добавления обоих веществ с использованием новой капли ртуть.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вольтамперометрическое поведение ТС и DDA на HMDE

Влияние pH. Электрохимическое поведение ТС и DDA было изучено при изменении pH буферного раствора BR (2.00–9.00) при одновременном анализе 4.61 мкМ ТС и 2.62 мкМ DDA. На рис. 2а показан SWV-профиль электрохимического восстановления ТС и DDA на HMDE при различных значениях pH. Как можно наблюдать, пиковый потенциал DDA был смещен в сторону положительных потенциалов, в то время как пиковый потенциал ТС смещен в отрицательную сторону при увеличении pH. При pH 3.00 наблюдались адекватные условия для одновременного количественного определения ТС и DDA с более высоким аналитическим ответом, связанным с хорошей разницей в значении пикового потенциала снижения (0.34 В), лучшей повторяемостью и линейностью для обоих препаратов (рис. 2б). Поэтому буфер с pH 3.00 BR был выбран в качестве фонового электролита для одновременного определения ТС и DDA.

Влияние приборных параметров. Приборные параметры метода SWV были исследованы для одновременного количественного определения ТС и DDA в буфере BR при pH 3.00. Самые высокие и четко определенные пики были получены путем применения начального потенциала -0.6 В с частотой 50 Гц, шагом потенциала 8 мВ и амплитудой импульса 60 мВ на HMDE. В этих оптимальных условиях четко определенные пики наблюдались для ТС при -0.85 В и для DDA при -1.18 В относительно Ag/AgCl/4.6 М KCl.

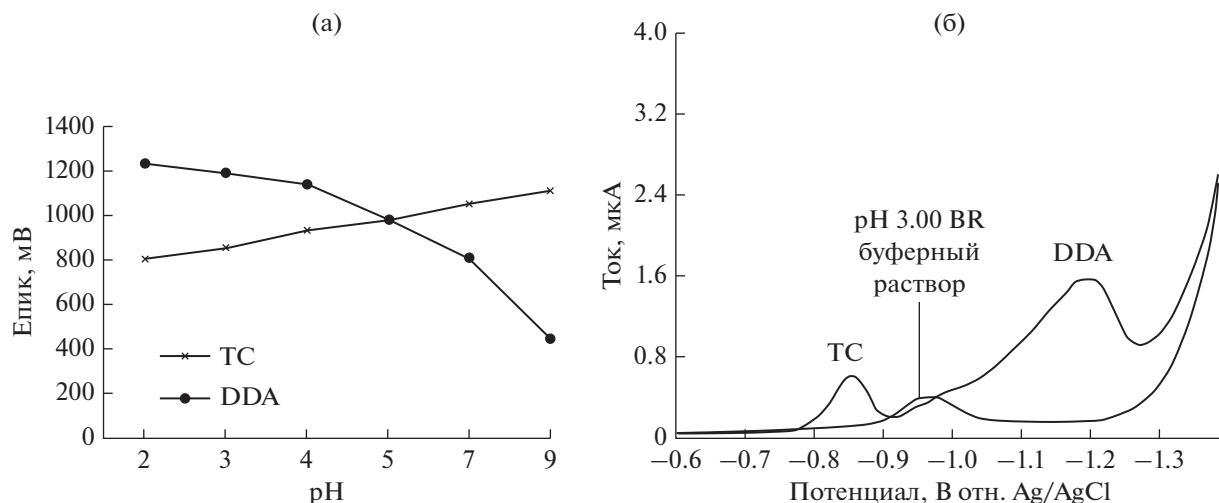


Рис. 2. (а) Влияние pH на потенциалы пиков квадратно-волновой вольтамперометрии для 4.61 мкМ ТС и 2.62 мкМ DDA. (б) Квадратно-волновые вольтамперограммы 4.61 мкМ ТС и 2.62 мкМ DDA при pH 3.00 в буферном растворе BR. Начальный потенциал: -0.6 , частота: 50 Гц, шаг потенциала: 8 мВ, амплитуда импульса: 60 мВ.

Обратимость и тип токов восстановления. Влияние скорости сканирования на отклик тока 18.7 мкМ ТС и 28.6 мкМ DDA на MDE было исследовано методом CV в буферном растворе BR (pH 3.00) при различных скоростях сканирования от 50 до 500 мВ с⁻¹. Соответствующие вольтамперограммы приведены на рис. 3. При обратном сканировании не наблюдалось анодных пиков для обоих препаратов, что свидетельствует о том, что реакции восстановления были необратимыми. Пиковые потенциалы смещались к более отрицательному значению с увеличением скорости

сканирования, подтверждая необратимый характер восстановительных процессов [26]. Между $\lg I_p$ и $\lg v$ наблюдалась линейная зависимость для обоих препаратов (вставка рис. 3). Наклон 0.5389 для DDA близок к теоретически ожидаемым значениям 0.50 для процесса, контролируемого диффузией. Наклон 0.8483 для ТС, который выше 0.50, также указывает на то, что на процесс влияет адсорбция [33].

Число (n) перенесенных электронов в электровосстановлении ТС и DDA на HMDE было оценено согласно следующему уравнению $E_p - E_p/2 = 47.7 \text{ мВ}/n$ [34]. Для этого исследования использовались циклические вольтамперограммы при 100 мВ/с. Для ТС значения E_p и $E_p/2$ составляли 1044 и 1000 мВ соответственно. Для DDA значения E_p и $E_p/2$ составляли 1247 и 1180 мВ соответственно. Если значение коэффициента переноса (α) принимается равным 0.5, что обычно используется для полностью необратимой системы [35], в электровосстановлении ТС и DDA число n оценивается равным 2.

Предлагаемые механизмы

Механизм восстановления DDA. DDA содержит карбоксильную группу и группу дифениламина (рис. 16). Вообще говоря, в водном растворе нет полярографических волн восстановления карбонильной группы в карбоксильной группе. Однако восстановление протона в карбоксильной группе может привести к каталитической волне водорода при определенных условиях, подобных ибупрофену, сходному с диклофенаком натрия по структуре в растворе пиридина [36]. Кроме того, атом азота группы дифениламина в

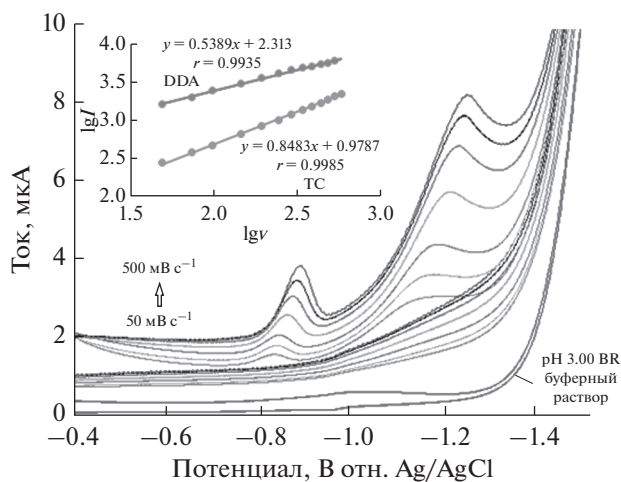
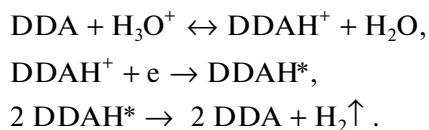


Рис. 3. Циклические вольтамперограммы 18.7 мкМ ТС и 28.6 мкМ DDA (в буферном растворе BR, pH 3.00) при разных скоростях сканирования. На вставке показана зависимость логарифма пикового тока от логарифма частоты сканирования для восстановления веществ.

DDA присоединяет ион водорода, образуя ониевые соединения, способные участвовать в электрохимической реакции на катоде. Соответственно, волна снижения DDA при 1.10 В, наблюдаемая в этой работе, должна быть каталитической водородной волной, которая возникла в результате восстановления протона, объединенного в карбоксильной группе, и атома азота дифениламинной группы в DDA. Потенциал пика смещался к более положительным значениям с ростом pH (рис. 2а). Эти результаты подтверждают вывод о наблюдаемой волне восстановления в виде каталитической волны водорода [37]. Волны каталитического водорода обусловлены наличием в растворе определенных каталитических веществ, которые способствуют выделению молекулярного водорода на ртутном электроде с одновременным потреблением ионов водорода. Эти волны наблюдаются при меньших отрицательных потенциалах, чем обычные волны разряда водорода в том же растворе. Кроме того, каталитическая волна водорода, имеющая значительное теоретическое значение, представляет большой практический интерес, поскольку обладает более высокой аналитической чувствительностью, чем другие полярографические каталитические волны [38]. Существует много исследований каталитических водородных механизмов, изученных с помощью SWV [39–42].

Согласно теории каталитической водородной волны органического соединения формирование каталитической водородной волны DDA включает следующие этапы [43]. DDA сначала присоединял протон с образованием протонированной формы $DDAH^+$. Затем $DDAH^+$ был полярографически восстановлен для получения промежуточной частицы $DDAH^*$ с природой атомарного водорода. Когда окислитель не присутствовал, частица $DDAH^*$ вступала впоследствии в бимолекулярное взаимодействие, что приводило к выделению молекулы водорода. Общая схема может быть описана следующим образом:



На рис. 3 четко выраженная волна каталитического водорода появилась при 1.10 В при катодном сканировании, в то время как при обратном сканировании волна окисления не появилась, показывая, что волна восстановления была полностью необратимой.

Механизм восстановления ТС. Потенциал пика, смещенный к более отрицательным значениям с увеличением pH (рис. 2а), свидетельствует об участии протонов в восстановлении ТС на НМДЕ. Поскольку химическая структура ТС очень похо-

жа на химическую структуру производных трополона, таких как колхицин, наиболее вероятно, что его восстановление происходит в карбонильной группе трополонового кольца. Восстановление трополона в кислых растворах описывается как двухстадийный процесс, каждый из которых включает перенос одного электрона [44]. В кислых растворах восстановление колхицина происходит при температуре около -1.0 В относительно $Ag/AgCl$ с участием $1H^+$ /перенесенного электрона, образующего соответствующий анион-радикал, что на первом этапе приводит к нейтральному свободному радикалу. При образовании нейтрального радикала могут происходить две возможные последующие реакции, такие как димеризация свободных радикалов или дальнейшее восстановление и протонирование свободного радикала. В кислых растворах радикал подвергается другому одноэлектронному восстановлению с участием того же трополонового кольца [45]. При первом одноэлектронном восстановлении образуется соответствующий анион-радикал. В протонных растворителях анионный радикал быстро протонируется, образуя нейтральный радикал, так что происходит второй перенос электрона и протона, что дает общий двухэлектронный процесс. Таким же образом считалось, что ТС превращается в анионный радикал за один перенос электрона, затем происходит последовательный перенос протона из поддерживающего электролита, а затем происходит второй перенос электрона и протона. В методе CV максимальный потенциал ТС смещается в сторону более отрицательных значений с увеличением скорости сканирования (рис. 3), что указывает на то, что химическая реакция происходит (протонирование) после электрохимического этапа [46]. Все эти результаты показывают, что была доказана реакция восстановления, включающая механизм ECE.

Одновременное определение ТС и DDA

На основании вышеупомянутых результатов предложенная вольтамперометрическая процедура использовалась для одновременного определения ТС и DDA в гелевых композициях для местного применения. Кривые SWV представили хорошее разделение пиковых потенциалов, что явно позволяет одновременно определять эти соединения. Были записаны серии SWV, которые поддерживали концентрацию одного компонента постоянной и варьировали концентрацию другого, а также одновременно увеличивали концентрацию анализируемого вещества. В первом случае концентрация одного соединения линейно увеличивалась в присутствии неизменных концентраций другого (рис. 4). На рис. 4а показаны вольтамперограммы для различных концентраций DDA с 16.1 мкМ ТС. Пиковый ток увеличива-

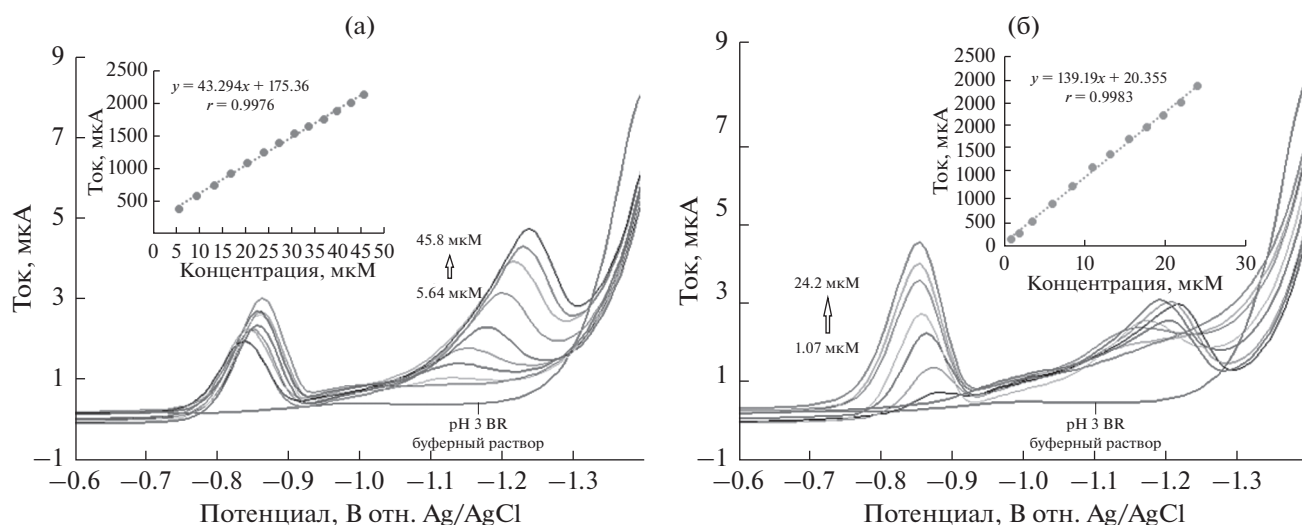


Рис. 4. (а) Квадратно-волновые вольтамперограммы 5.64, 9.53, 13.3, 17.24, 30.7, 37, 42.9, 45.8 мкМ DDA в присутствии 16.1 мкМ ТС. (б) Квадратно-волновые вольтамперограммы 1.07, 2.12, 6.22, 11.1, 15.7, 20.0, 24.2 мкМ THIO в присутствии 16.1 мкМ DDA. На вставках показаны калибровочные кривые. Начальный потенциал: -0.6 , частота: 50 Гц, шаг потенциала: 8 мВ, амплитуда импульса: 60 мВ.

ется пропорционально диапазону концентраций 5.64–45.8 мкМ ($r = 0.9976$). На рис. 4б показаны вольтамперограммы для различных концентраций ТС с 16.1 мкМ DDA. Пиковый ток увеличивается пропорционально диапазону концентрации 1.07–24.2 мкМ ($r = 0.9983$). Следует отметить, что эта линейность подходит для одновременного определения ТС и DDA в гелевых препаратах для местного применения, которые содержат эти соединения в комбинированной дозе 11.6 мг DDA и 2.5 мг ТС. Аналитические параметры, полученные для одновременного определения ТС и DDA, приведены в табл. 1.

Валидационное исследование

Валидация метода одновременного определения ТС и DDA была изучена путем оценки стабильности, диапазона линейности, LOD, LOQ, точности, надежности, воспроизводимости и специфичности [47].

Стабильность. Стандартные исходные растворы ТС и DDA хранили в двух различных условиях, например при 4°C в течение 60 дней для долгосрочной стабильности и при температуре окружающей среды в течение 24 ч для кратковременной стабильности. В конце этого периода растворы анализировали методом SWV, и изменений пиковых потенциалов и пиковых токов лекарств не наблюдалось. Это показывает, что ТС и DDA весьма стабильны в течение этого периода.

Калибровочная кривая и диапазон линейности. LOD определяли путем оценки наименьшего количества анализируемых веществ, которое можно обнаружить, но не обязательно количественно определять как точные значения. LOQ определяли путем определения наименьшего количества анализируемых веществ, которое можно количественно определить с подходящей точностью и достоверностью [47]. Как видно из табл. 1, значения LOD и LOQ указывают на то, что предлагаемые методы можно считать достаточно чувстви-

Таблица 1. Данные калибровочных кривых ТС и DDA, полученные по предлагаемому методу SWV ($n = 6$)

	ТС	DDA
Уравнение регрессии	$y = 139.19x + 20.355$	$y = 43.294x + 175.36$
Стандартная ошибка наклона	0.0023	0.0340
Стандартная ошибка точки пересечения с осью	0.0114	0.2104
Коэффициент корреляции (r)	0.9983	0.9976
Диапазон линейности, мкМ	1.07–24.2	5.64–45.8
Предел обнаружения (LOD), мкМ	0.54	3.25
Предел количественного определения (LOQ), мкМ	1.07	5.64

Таблица 2. Точность и надежность предлагаемого метода SWV для определения ТС и DDA ($n = 6$)

Добавлено, мкМ	ТС			Добавлено, мкМ	DDA	
		внутри-суточный	межсуточный		внутри-суточный	межсуточный
6.23	Найдено	6.21 ± 0.02	6.17 ± 0.01	9.53	9.50 ± 0.02	9.56 ± 0.01
	Отклонение, %	0.32	0.89		0.28	0.29
	RSD, %	1.21	0.91		1.32	0.71
11.10	Найдено	11.12 ± 0.03	11.09 ± 0.02	17.00	16.89 ± 0.03	16.97 ± 0.02
	Отклонение, %	0.22	0.10		0.65	0.17
	RSD, %	1.06	0.82		1.26	0.65
17.90	Найдено	17.87 ± 0.02	17.83 ± 0.03	27.40	27.18 ± 0.04	27.26 ± 0.04
	Отклонение, %	0.19	0.38		0.80	0.50
	RSD, %	0.51	0.63		1.11	0.99

Примечание. Найдено: среднее значение \pm стандартная ошибка. Отклонение: $[(\text{найденно} - \text{добавлено})/\text{добавлено}] \times 100$. RSD: (стандартное отклонение/среднее значение) $\times 100$.

тельными для определения ТС и DDA в фармацевтических препаратах.

Точность и надежность. Точность определяется как близость результатов испытаний, полученных аналитическим методом, к истинному значению. Это определяется путем расчета процентной относительной ошибки (% смещения) между измеренными средними концентрациями и добавленными концентрациями.

Надежность определяется как близость соответствия между независимыми результатами испытаний, полученными в оптимальных условиях, и обычно выражается в процентах относительного стандартного отклонения (RSD%). Точность и надежность метода была исследована с помощью внутрисуточного и межсуточного анализа. Три различные концентрации ТС (6.23, 11.10 и 17.90 мкМ) и DDA (9.53, 17.00 и 27.40 мкМ) были выбраны в линейном диапазоне. Для внутрисуточных исследований были приготовлены и проанализированы шесть различных серий стандартных растворов в один и тот же день при трех разных уровнях концентрации. Для межсуточных исследований стандартные растворы готовили и анализировали в течение 6 сут подряд при трех разных уровнях концентрации. Результаты в табл. 2 показали, что точность и надежность предложенного метода были удовлетворительными.

Селективность. Селективность предлагаемого способа была исследована путем сравнения вольтамперограмм геля для местного применения и стандартных растворов ТС и DDA при одинаковых концентрациях. Вольтамперограммы были идентичны, и другого пика не наблюдалось (рис. 5). Это означает, что воздействие вспомога-

тельных веществ было незначительным для предлагаемого способа. Разработанный метод оказался весьма селективным. Чтобы оценить воздействие присутствия вспомогательных веществ на предлагаемые методы, был также применен стандартный метод добавок. Для этого к вспомогательному электролиту добавляли соответствующий объем раствора образца. После регистрации вольтамперограммы добавляли три увеличивающиеся концентрации стандартных растворов ТС и после каждого добавления регистрировали

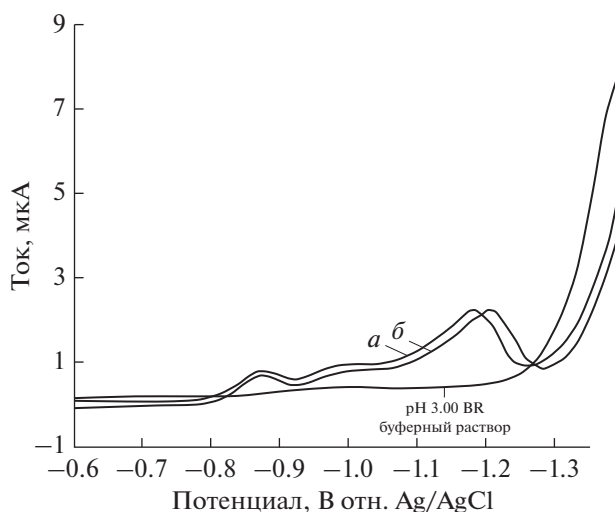


Рис. 5. Квадратно-волновая вольтамперограмма геля (a) Muscoflex Duo Квадратно-волновая вольтамперограмма смеси (б) 3.82 мкМ ТК и 27.2 мкМ DDA в буферном растворе BR при pH 3.00. Начальный потенциал: -0.6 , частота: 50 Гц, шаг потенциала: 8 мВ, амплитуда импульса: 60 мВ.

Таблица 3. Результаты, полученные методом SWV для геля Muscoflex Duo ($n = 6$)

Показатели	Экспериментальное значение, мг	
	ТС	DDA
Найдено	2.50 ± 0.01	11.61 ± 0.05
Стандартное отклонение	0.03	0.13
RSD, %	1.01	1.14

вольтамперограммы. Измеренные пиковые токи были нанесены на график в зависимости от добавленных концентраций ТС. Концентрация образца рассчитывалась по экстраполяции линии в отрицательной зоне абсциссы. Та же процедура была повторена для DDA. Наклоны уравнения регрессии стандартного метода сложения (138.80 для ТС и 44.33 для DDA) были близки к наклону метода калибровочной кривой, который также показал, что не было значительного воздействия вспомогательных веществ, присутствующих в гелевых композициях. Таким образом, разработанный метод позволил одновременно определять ТС и DDA в присутствии вспомогательных веществ, и его можно считать селективным.

Определение лекарственных средств в гелевых композициях для местного применения

Чтобы проверить применимость предлагаемого способа, товарные гелевые композиции для местного применения, содержащие (2.5 мг ТС и 11.6 мг DDA), анализировали при оптимальных условиях (табл. 3). Содержание лекарственного средства в образцах рассчитывали в соответствии с уравнениями регрессии для методов SWV.

ВЫВОДЫ

Даже несмотря на то, что бинарная смесь ТС и DDA коммерчески доступна в виде таблеток и геля для местного применения, не существует какой-либо литературы об одновременном определении ТС и DDA любым методом. Считается, что в этом вопросе есть недостаток. Чтобы преодолеть эту проблему, был разработан и утвержден простой, быстрый, селективный, надежный и точный метод SWV для одновременного определения ТС и DDA в гелевой композиции для местного применения, который ранее не публиковался. Разработанный метод является более простым, быстрым и требует менее дорогостоящего оборудования, чем хроматографические методы. Типичный эксперимент, требующий трехминутных нормальных или дифференциальных импульсных методов, может быть выполнен SWV за считанные секунды. Исследователи использова-

ли преимущества SWV для быстрого сканирования широкого потенциального диапазона. Общее время анализа по этому методу довольно короткое (менее 1 мин). Этот метод также быстрее, чем хроматографические и другие вольтамперометрические (полярография, DPV), благодаря использованию техники SWV. Предложенный метод является достаточно точным, и его успешно применяют для одновременного определения ТС и DDA в гелевой композиции для местного применения. Анализ проводился без вмешательства со стороны наполнителей, присутствующих в образцах. Это быстрая одностадийная процедура, которая не требует обработки пробы или токсичных органических растворителей. Так что это недорогая и быстрая процедура, которая не требует трудоемких этапов разделения и экстракции. Здесь следует еще раз упомянуть, что нет работ, сообщающих о вольтамперометрической процедуре одновременного определения ТС и DDA в гелевых составах для местного применения. Можно сделать вывод, что разработанный метод SWV может быть успешно и надежно применен для быстрого рутинного анализа в лабораториях контроля качества для одновременного анализа ТС и DDA в гелевой композиции для местного применения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны АО “Али Раиф Илач Сан” за предоставление ТС и АО “Абди Ибрагим Илач Санайи ве Тикарет” за предоставление стандартов DDA.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rafiee-Tehrani, M., and Mehramizi, A., In-vitro Release Studies of Piroxicam from Oil-in-Water Creams and Hydroalcoholic Gel Topical Formulation, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2000, vol. 26, p. 409.
2. Payne, R., Factors Influencing Quality of Life in Cancer Patients: The Role of Transdermal Fentanyl in the Management of Pain, *Semin. Oncol.*, 1998, p. 47.
3. Knutson, K., Krill, S., Lambert, W., and Higuchi, W., Physicochemical Aspects of Transdermal Permeation, *J. Contr. Rel.*, 1987, vol. 6, p. 59.
4. Bucher, U., and Sanger, A., Diclofenac Emulgel in the Treatment of Localized Rheumatic Disorders, XVIth Int. Congr. Rheumatol. (IL: AR) Sydney, Australia, 1985, p. 19.
5. Janbroers, J., Review of the toxicology, pharmacodynamics and pharmacokinetics of thiocolchicoside, a GABA-agonist muscle relaxant with anti-inflammatory and analgesic action, *Acta Ther.*, 1987, 13, p. 221.

6. John, V., The Pharmacokinetics and Metabolism of Diclofenac Sodium in Animals and Man, *Rheumatol.Rehabil.*, 1979, p. 22.
7. Sengar, M., Gandhi, S., Patil, U., and Rajmane, V., Simultaneous determination of diclofenac sodium and thiocholchicoside in fixed dose combination by spectrophotometry, *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, 2010, vol. 3, p. 89.
8. El-Ragehy, N., Ellaithy, M., and El-Ghobashy, M., Determination of thiocholchicoside in its binary mixtures (thiocholchicoside- glafenine and thiocholchicoside-floctafenine) by TLCdensitometry, *Il Farmaco*, 2003, vol. 58, p. 463.
9. Rele, R.V.S., and Swapnil A., Simultaneous determination of aceclofenac and thiocholchicoside by reverse phase high performance liquid chromatography form bulk drug and pharmaceutical dosage form, *Der Pharm Sin.*, 2016, vol. 7, p. 6.
10. Suganthi, T.K.R.A., Application of stability – indicating RP-HPLC method for the simultaneous estimation of thiocholchicoside and aceclofenac in pharmaceutical dosage form, *Am. J. PharmTech Res.*, 2013, vol. 3, p. 327.
11. Rele, R.V., and Mali, R., Advance simultaneous determination of paracetamol, thiocholchicoside and aceclofenac in tablets by reverse phase high performance liquid chromatography, *Der Pharm Sin.*, 2014, vol. 5, p. 34.
12. Sandouk, P., Chappay, O., d'Yvoire, M.B., and Scherrmann, J.-M., Pharmacokinetics of thiocholchicoside in humans using a specific radioimmunoassay, *Ther. Drug Monit.*, 1995, vol. 17, p. 544.
13. Agatonović-Kuštrin, S., Živanović, L., Zečević, M., and Radulović, D., Spectrometric study of diclofenac-Fe(III) complex, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, vol. 16, p. 147.
14. Matin, A., Farajzadeh, M., Jouyban, A., A simple spectrophotometric method for determination of sodium diclofenac in pharmaceutical formulations, *Il Farmaco*, 2005, vol. 60, p. 855.
15. Rathnam, M., and Singh, R., Simultaneous rp-hplc determination of camylofin dihydrochloride and diclofenac potassium in pharmaceutical preparations, *Pharm. Anal. Acta.*, 2010, vol. 1, p. 1.
16. Hafsa, D., Chanda, S., and Prabhu, P. J., Simultaneous HPLC determination of methocarbamol, paracetamol and diclofenac sodium, *J. Chem.*, 2011, vol. 8, p. 1620.
17. Hussein, R.F.H., and Muhammad M., Fully validated diclofenac HPLC assay, *Anal Chem Indian J.*, 2009, vol. 8, p. 124.
18. Gangwal, S., and Trivedi, P., Liquid chromatographic determination of diclofenac sodium and chlorzoxazone from tablets, *Eastern Pharmacist.*, 2000, vol. 43, p. 139.
19. Devi, K., and Paranjothy, K., Pharmacokinetic profile of a new matrix-type transdermal delivery system: diclofenac diethyl ammonium patch, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 1999, vol. 25, p. 695.
20. Lopes de Macedo, I.Y., Alecrim, M.F., Garcia, L.F., Ribeiro de Souza, A., Pio dos Santos, W.T., de Souza Gil, E., Cubillana-Aguilera, L.M., and Palacios-Santander, J.M., Differential Pulse Voltammetric Determination of Piroxicam on Lanthanide Ferric Oxide Nanoparticles-Carbon Paste Modified Electrode, *Curr. Pharm. Anal.*, 2018, vol. 14, p. 271.
21. Goyal, R.N., Gupta, V.K., Oyama, M., and Bachheti, N., Differential pulse voltammetric determination of paracetamol at nanogold modified indium tin oxide electrode, *Electrochem. Commun.*, 2005, vol. 7, p. 803.
22. Valezi, C.F., Duarte, E.H., Mansano, G.R., Dall'Antonia, L.H., Tarley, C.R.T., and Sartori, E.R., An improved method for simultaneous SWV determination of amlodipine and enalapril at multi-walled carbon nanotubes paste electrode based on effect of cationic surfactant, *Sens. Actuat. B: Chemical.*, 2014, vol. 205, p. 234.
23. Duarte, E.H., dos Santos, W.P., Hudari, F.F., Neto, J.L.B., Sartori, E.R., Dall, L.H., Pereira, A.C., and Tarley, C.R.T., A highly improved method for sensitive determination of amitriptyline in pharmaceutical formulations using an unmodified carbon nanotube electrode in the presence of sulfuric acid, *Talanta*, 2014, vol. 127, p. 26.
24. Gupta, V.K., Jain, R., Radhapyari, K., Jadon, N., and Agarwal, S., Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals a review, *Anal. Biochem.*, 2011, vol. 408, p. 179.
25. Uslu, B., and Ozkan, S.A., Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: a review of recent trends and developments, *Anal. Lett.*, 2011, vol. 44, p. 2644.
26. Scholz, F., *Electroanalytical methods—Guide to Experiments and Applications*, Springer, 1, 2010.
27. Dogan-Topal, B., Ozkan S.A., and Uslu, B., The Analytical Applications of Square Wave Voltammetry on Pharmaceutical Analysis, *Open Chem. and Biomed. Methods J.* 2010, vol. 3, p. 56.
28. Mirceski, V., Komorsky-Lovric, S., and Lovric, M., *Square Wave Voltammetry Theory and Application*; Scholz, F., Ed.; Springer-Verlag Pub.: Berlin, 2007.
29. O'Dea, J., Osteryoung, J.G., and Osteryoung, R.A., Theory of square wave voltammetry for kinetic systems, *Anal. Chem.*, 1981, vol. 53, p. 695.
30. Montenegro, M.I., Queiras, M.A., and Daschbach, J.L., *Microelectrodes: Theory and Applications*; Kuwer Academic Pub., Netherland, 1990.
31. Kalousek, M., A study of reversibility of processes at the dropping mercury electrode by changing discontinuously the polarizing voltage. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1948, vol. 13, p. 105.
32. Osteryoung, J.G., and Osteryoung, R.A., Square wave voltammetry, *Anal. Chem.*, 1985, vol. 57, p. 101A.
33. Aleksić, M.M., and Kapetanović, V., Voltammetric behavior and square-wave voltammetric determination of cefotaxime in urine, *J. Electroanal. Chem.*, 2006, vol. 593, p. 258.
34. Bard, A.J., and Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2001, vol. 2, p. 482.
35. Li, C., Electrochemical determination of dipyrindamole at a carbon paste electrode using cetyltrimethyl ammonium bromide as enhancing element, *Colloids Surf B Biointerfaces.*, 2007, vol. 55(1), p. 77.
36. Kanoute, P.B.G., and Guemet, M., Electrochemical reduction of phenylpropionic acid derivatives having

- anti-inflammatory activity, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1984, p. 49.
37. Xu, M., Chen, L., and Song, J., Polarographic behaviors of diclofenac sodium in the presence of dissolved oxygen and its analytical application, *Anal. Biochem.*, 2004, vol. 329, p. 21.
 38. Prasada, B., SubbaNaidua, N.V., and Saraswathib, K., Polarographic determination of Cr(VI) in Environmental samples using Catalytic hydrogen currents, *IOSR J. Engineering (IOSRJEN)* 2012, ISSN: 2250-3021 2(7), p. 19.
 39. Mirčeski, V., Skrzypek, S., Ciesielski, W., and Sokołowski A., Theoretical and experimental study of the catalytic hydrogen evolution reaction in the presence of an adsorbed catalyst by means of square-wave voltammetry, *J. Electroanal. Chem.*, 2005, vol. 585, p. 97.
 40. Skrzypek, S., Mirčeski, V., Ciesielski, W., Sokołowski, A., and Zakrzewski, R., Direct determination of metformin in urine by adsorptive catalytic square-wave voltammetry, *J. Pharmaceut. and Biomed. Analysis*, 2007, vol 45, p. 275.
 41. Erdogan, D. A., Tasdemir, İ. H., Erk, N., and Kilic, E., Electrochemical behavior of moclobemide at mercury and glassy carbon electrodes and voltammetric methods for its determination, *Coll. Czechosl. Chem Comm.s* (2011), vol. 76, p. 423.
 42. Alarfaj, N.A., Square-wave adsorptive stripping voltammetric determination of antihypertensive agent telmisartan in tablets and its application to human plasma, *J. Analyt. Chem.* 2013, vol. 68, p. 335.
 43. Mairanovskii, S., The theory of catalytic hydrogen waves in organic polarography, *J. Electroanal. Chem.*, 1963, 6(2), p. 77.
 44. Walter Holak, W.M.P., Differential pulse polarographic determination of colchicine, *J. Pharm. Sci.*, 1980, vol. 69, p. 1436.
 45. Bodoki, E., Vlase, L., and Săndulescu, R., Mechanistic study of colchicine's reduction behavior, *Electrochem. Commun.*, 2015, vol. 56, p. 51.
 46. Bond, A.M., *Modern polarographic methods in analytical chemistry*, vol. 4, CRC Press, 1980.
 47. I.H.T. *Guideline, Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1)*, 2005.