

РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ КРЕМУ НА ОСНОВІ КЛОТРИМАЗОЛА ТА СЕЧОВИНИ

Ключові слова: крем, клотримазол, сечовина, розроблення методів, контроль якості

Сьогодні у світі найпоширенішими є грибові інфекції. Перше місце серед грибкових захворювань посідає мікоз стопи. Частота, з якою зустрічається мікоз стопи, в загальній популяції коливається від 5% до 20% і досягає 50% серед хворих з імунodefіцитом, ендокринними порушеннями, соматичними захворюваннями. Мікоз стопи є основним джерелом поширення інфекції серед населення [1, 2].

Перебіг мікозу стопи, як правило, хронічний, а в осіб літнього та старечого віку – монотонний, за «сухим» типом. Такі мікози найважче піддаються лікуванню, оскільки у багатьох хворих порушений клітинний імунітет, потовщений роговий шар епідермісу, що перешкоджає дії протигрибкових засобів. Тому перед використанням протигрибкових засобів часто здійснюють видалення лусочок і рогових нашарувань, використовуючи різні кератолітичні засоби. Це віддаляє початок адекватного лікування грибової інфекції [3, 4, 5].

Тому актуальним є розроблення лікарських засобів цілеспрямованої дії, враховуючи етіологію та перебіг ураження шкіри.

Співробітники кафедри фармацевтичної технології і біофармації НМАПО імені П. Л. Шупика здійснюють розроблення двокомпонентної м'якої лікарської форми (МЛФ) на основі клотримазола та сечовини для лікування грибкових уражень, що ускладнені кератозом.

Мета дослідження – розроблення методів контролю якості МЛФ на основі клотримазола та сечовини.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження була МЛФ – крем на емульсійній основі типу масло/вода (м/в) із вмістом клотримазола (1%) та сечовини (5%).

Контроль МЛФ здійснювали згідно з рекомендаціями та методиками Державної фармакопеї України (ДФУ) [6].

Результати дослідження та обговорення

Опис. Контролювали зовнішній вигляд і характерні органолептичні властивості зразків крему (колір, запах, консистенцію тощо). МЛФ досліджували на предмет наявності згірлого запаху, а також ознак фізичної нестабільності (агрегація частинок, розшарування).

Визначення однорідності виконували за методикою ДФУ [вид. 1, с. 511].

Визначення рН зразків крему здійснювали потенціометрично за методикою ДФУ [вид. 1, п. 2.2.3].

Ідентифікація клотримазола. Ідентифікацію клотримазола здійснювали методом ВЕРХ. Визначення робили згідно з методикою, наведеної для кількісного визначення, на хроматографі Agilent 1200 з діодно-матричним детектором (США) відповідно до умов ДФУ, 2.2.29, 2.2.46 [6].

На хроматограмі випробуваного розчину, одержаного так само, як у разі виконання методики «Кількісне визначення клотримазола», час утримування основного

піка стандартного зразка для клотримазола має співпадати з точністю $\pm 2\%$ з часом утримання піка досліджуваного зразка і становити 13,06 хв.

Ідентифікація сечовини. До 1 г крему додавали 10 мл води, нагрівали на водяній бані до повного розчинення крему та фільтрували. До фільтрату додавали розчин п-диметиламінобензальдегіду з концентрацією 20 г/л у розбавленій хлоридній кислоті. Спостерігається поява яскраво-жовтого забарвлення.

Методика кількісного визначення клотримазола. Кількісне визначення клотримазола здійснювали відповідно до Eur Ph методом ВЕРХ.

Розчин внутрішнього стандарту. 60 мг стандартного зразка (СЗ) пропілпарагідрооксибензоату вміщували до мірної колби ємністю 25 мл, розчиняли у 10 мл 96%-го етилового спирта та доводили об'єм розчину тим самим розчинником до мітки. 5 мл одержаного розчину вміщували до мірної колби ємністю 50 мл, доводили об'єм розчину 96%-м етиловим спиртом до мітки та перемішували.

Розчин порівняння. 30 мг (точна наважка) стандартного зразка (СЗ) клотримазола вміщували до мірної колби ємністю 50 мл і розчиняли у 10 мл 96%-го етилового спирта. В колбу додавали 5 мл розчину внутрішнього стандарту та доводили об'єм розчину 96%-м етиловим спиртом до мітки.

Випробовуваний розчин. 3 000 мг (точна наважка) препарату вміщували до колби Ерленмеєра ємністю 100 мл, додавали 5 мл розчину внутрішнього стандарту та 45 мл 96%-го етилового спирта. Після цього колбу розміщували на магнітній мішалці з підігрівом і нагрівали до 50 °С, перемішували до повного диспергування крему. Охолоджували колбу на льодяній бані до утворення стійкої суспензії. Одержаний розчин центрифугували протягом 10 хв зі швидкістю 6 000 об/хв, супернатант фільтрували через тefлоновий фільтр (0,45 мкм), відкидаючи перший мілілітр фільтрату.

По 10 мкл 96%-го етилового спирта та розчину порівняння хроматографували на рідинному хроматографі у градієнтних умовах з УФ-детектором, отримуючи не менше 5 хроматограм для кожного з розчинів у таких умовах:

- на хроматографі 96%-го етилового спирта не має спостерігатися системних піків з часом утримання піків пропілпарагідрооксибензоату та клотримазола;

- ефективність хроматографічної системи, розрахована за піками пропілпарагідрооксибензоату та клотримазола з хроматограм розчину порівняння, має бути не менше 2 000 теоретичних тарілок;

- коефіцієнт симетрії піків пропілпарагідрооксибензоату та клотримазола має бути у межах 0,8–1,5;

- колонка розміром 250 x 4,6 мм Luna C18(2) 100A (Phenomenex), з розміром частинок 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»;

- швидкість рухомої фази – 1 мл/хв;

- детектування при довжині хвилі – 254 нм;

- температура колонки – 30 °С.

Буферний розчин. 4,28 г калію дигідрофосфату безводного та 3,71 г натрію гідрофосфату безводного розчиняють водою високоочищеною і доводять вміст до 1 000 мл цим самим розчинником. Буферний розчин фільтрують через нейлоновий фільтр (0,45 мкм).

Рухома фаза. Змішують буферний розчин з ацетонітрилом у співвідношенні 40/60 (об/об) й дегазують підручним методом.

Вміст клотримазола (X_1) в 1 г крему, у %, розраховували за формулою (1):

$$X_1 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 5 \cdot P}{S_0 \cdot m_1 \cdot 5} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot m_1}, \quad (1)$$

де S_1 – середнє значення відношення площі піка клотримазола до площі піка внутрішнього стандарту, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення відношення площі піка клотримазола до площі піка внутрішнього стандарту, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_0 – маса наважки СЗ клотримазола, взята для приготування розчину порівняння, мг;

m_1 – маса наважки препарату, мг;

P – вміст клотримазолу у СЗ, взятого для приготування розчину порівняння, %.

Кількісне визначення сечовини проводили титрометричним методом. Для цього 2 000 мг (точна наважка) препарату, що еквівалентно 100 мг сечовини, вміщували до мірної колби ємністю 50 мл й додавали 20 мл води високоочищеної. Після цього колбу розміщували на магнітній мішалці з підігрівом і нагрівали до 80–85 °С, перемішуючи до повного диспергування крему (приблизно 20 хв). Охолоджували колбу до кімнатної температури, доводили об'єм водою високоочищеною до мітки й перемішували. Одержаний розчин фільтрували через фільтр «синя стрічка», відкидаючи перший мілілітр фільтрату. 2 мл фільтрату вміщували до колби для спалювання, додавали 4 г подрібненої суміші, що складається зі 100 г дикалію сульфату Р, 5 г міді (II) сульфату Р і 2,5 г селену Р, і три скляні кульки. Додавали 5 мл кислоти сірчаної Р таким чином, щоб вона змивала всі частинки, що прилипли до шийки колби, і стікала по стінках колби. Вміст колби перемішували коловими рухами. Щоб уникнути великих втрат сірчаної кислоти, шийку колби закривали нещільно (скляною грушоподібною пробкою з коротким запаяним відростком). Колбу нагрівали, поступово доводячи до кипіння з конденсацією пари сірчаної кислоти у шийці колби; при цьому слід стежити за тим, щоб верхня частина колби не перегрівалася. Нагрівання продовжували протягом 30 хв. Охолоджували, розчиняли твердий залишок, додаючи до суміші 25 мл води Р, знову охолоджували і приєднували до приладу для перегонки з водяною парою. Додавали 30 мл розчину натрію гідроксиду концентрованого Р і відразу починали перегонку, пропускаючи пару крізь суміш. Відгін збирали у приймач, що містив 15 мл розчину 40 г/л кислоти борної Р, до якого попередньо додавали 0,2 мл змішаного розчину метилового червоного Р і достатню кількість води Р для того, щоб кінець холодильника був занурений. Наприкінці перегонки приймач опускали таким чином, щоб кінець холодильника знаходився над поверхнею кислоти. Не слід допускати, щоб на зовнішній поверхні холодильника залишалася рідина із вмісту приймача. Відгін титрували 0,01 М розчином кислоти сірчаної.

1 мл 0,01 М розчину кислоти сірчаної відповідає 0,6006 мг $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$.

Розраховували вміст сечовини у препараті (X) у мг/г за формулою (2):

$$X = \frac{V \cdot 50 \cdot K \cdot 0,6006}{m \cdot 2}, \quad (2)$$

де V – об'єм 0,01 М розчину кислоти сірчаної, витрачений на титрування;

m – маса наважки препарату, г;

K – поправочний коефіцієнт 0,01 М розчину кислоти сірчаної.

Оцінку мікробіологічної чистоти зразків крему здійснювали методом глибинного висівання згідно з вимогами ДФУ I вид. [6, п. 2.6.12., 2.6.13.].

Зразок 1. У стерильну мірну ємність вміщували 10 г середньої проби крему, додавали 2 г стерильного полісорбата 80, емульгували. Додавали близько 60 мл буферного розчину з натрію хлоридом і пептоном (рН 7,0), що містив 3%-й розчин полісорбата 80, 0,3%-й розчин соєвого лецитину, 0,1%-й розчин гістидину гідрохлориду, підігрітого до 40 °С, перемішували до утворення гомогенної суспензії та доводили об'єм до 100 мл тим самим розчинником (розведення 1:10).

Зразок 2. У стерильну мірну ємність вміщували 20 мл зразка 1, доводили об'єм до 100 мл стерильним буферним розчином з натрію хлоридом і пептоном (рН 7,0), що містив 3%-й розчин полісорбата 80, 0,3%-й розчин соєвого лецитину, 0,1%-й роз-

чин гістидину гідрохлориду, підігрітого до 40 °С, перемішували (розведення 1:50).

Зразок 3. У стерильну мірну ємність вміщували 10 г середньої проби ЛЗ Карбо-кломет, додавали 2 г стерильного полісорбата 80, емульгували. Додавали близько 60 мл буферного розчину з натрію хлоридом і пептоном, рН 7,0, підігрітого до 40 °С, перемішували до утворення гомогенної суспензії та доводили об'єм до 100 мл тим самим розчинником (розведення 1:10).

Визначення загального числа аеробних мікроорганізмів (ТАМС). По 1 мл зразка 2 висівали глибинним методом у кожну з двох чашок Петрі та вносили 15–20 мл стерильного соєво-казеїнового агару, що містив 3%-й розчин полісорбата 80, 0,3%-й розчин соєвого лецитину, 0,1%-й розчин гістидину гідрохлориду, температурою не вище 45 °С, давали агару застигнути. Чашки інкубували за температури 30–35 °С протягом 5 діб.

Визначення загального числа дріжджових та плісневих грибів (ТУМС). По 1 мл зразка 1 висівали глибинним методом у кожну з двох чашок Петрі та вносили 15–20 мл стерильного Сабуро-декстрозного агару, що містив 3%-й розчин полісорбата 80, 0,3%-й розчин соєвого лецитину, 0,1%-й розчин гістидину гідрохлориду, температурою не вище 45 °С, давали агару застигнути. Чашки інкубували за температури 20–25 °С протягом 7 діб.

Випробування на наявність *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*. 10 мл зразка 3 вносили в 100 мл соєво-казеїнового бульйону. Зразки перемішували та інкубували за температури 30–35 °С від 18 до 24 год. У разі випробування на наявність *Staphylococcus aureus* контейнер струшували та здійснювали пересівання на поверхню манітно-сольового агару. У разі випробування на наявність *Pseudomonas aeruginosa* контейнер струшували та виконували пересівання на поверхню цетримідного агару. Зразки інкубували за температури 30–35 °С від 18 до 72 год.

Результати випробування опрацьованого крему на основі клотримазола і сечовини.

Оцінювання зовнішнього вигляду й органолептичних властивостей та однорідності експериментальних зразків крему довело, що це однорідна маса, задовільної консистенції, білого кольору, без запаху.

Одним із важливих показників для МЛФ є значення рН, від якого залежить у тому числі й стабільність препарату. Встановлено, що значення показника рН становить 6,6–6,7.

Методом ВЕРХ встановлено кількісний вміст клотримазола – $10,18 \pm 0,07$ мг/г (при нормі 9,5–10,5 мг/г) (рис. 1, 2).

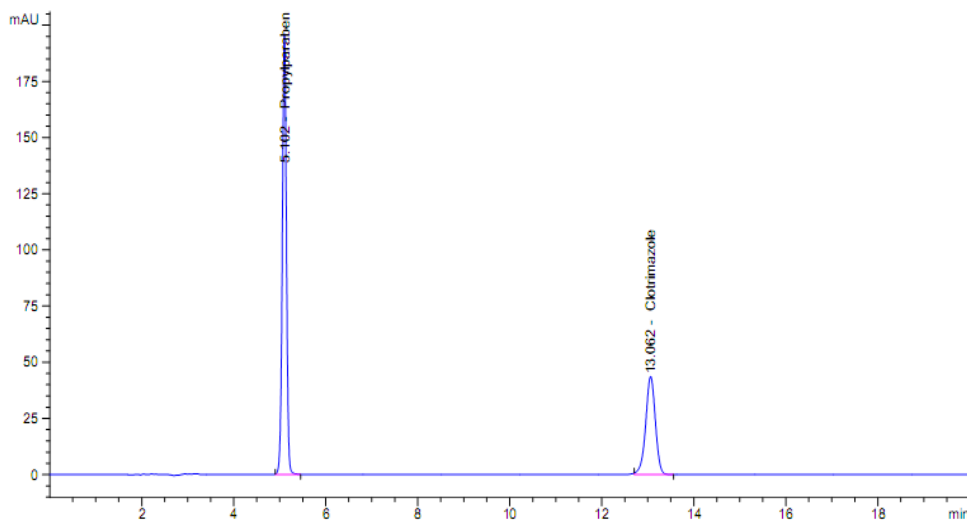


Рис. 1. Хроматограма розчину порівняння

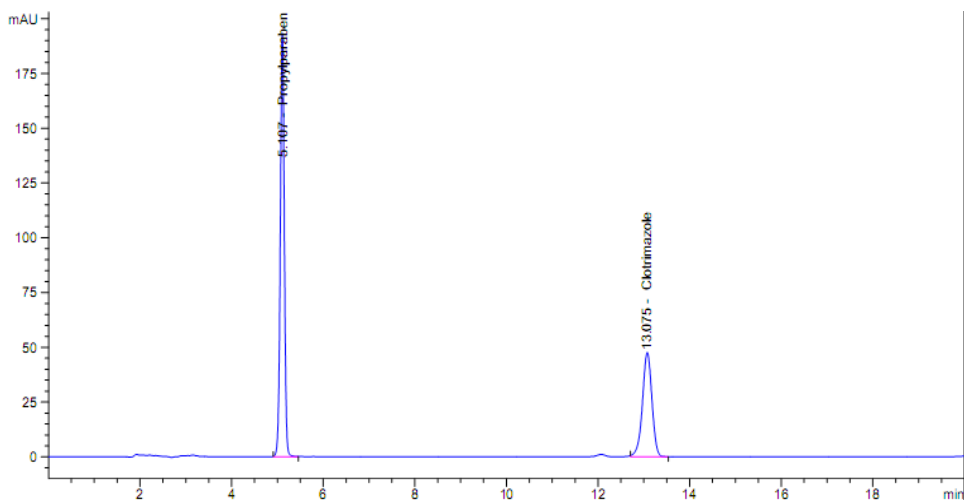


Рис. 2. Хроматограма досліджуваного розчину

Методом титриметрії встановлено кількісний вміст сечовини – $4,91 \pm 0,06$ мг/г (при нормі 4,75–5,25 мг/г).

Мікробіологічними дослідженнями показано, що загальне число аеробних мікроорганізмів (ТАМС) становить менше 50 КУО/г; загальне число дріжджових та плісневих грибів (ТУМС) – менше 10 КУО/г; не виявлено *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г, що відповідає вимогам ДФУ.

На підставі комплексу досліджень було встановлено специфікаційні характеристики для крему з клотримазолом та сечовиною (таблиця).

Т а б л и ц я

Специфікація на МЛЗ на основі клотримазола та сечовини

№ з/п	Показники якості ЛЗ	ЛЗ у нормі
1	Опис	Крем білого кольору, без запаху
2	pH	5,5–7,0
3	Однорідність	Однорідний
4	Ідентифікація	
	Клотримазол	Збіг часу утримання піків на хроматографах ВЕРХ стандарту і досліджуваного зразка
	Сечовина	У розчині з п-диметиламінобензальдегідом з концентрацією 20 г/л у розбавленій хлоридній кислоті спостерігається поява яскраво-жовтого забарвлення
5	Кількісний вміст	
	Клотримазол	95–105%
	Сечовина	95–105%
6	Мікробіологічна чистота	Бактерій і грибів не більше 10^2 ; <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Staphylococcus aureus</i> не допускається
7	Термін і умови зберігання	2 роки, за температури 2–25 °С

В и с н о в о к

Проведено дослідження щодо встановлення показників контролю якості розробленого крему з клотримазолом та сечовиною: опис, однорідність, pH, ідентифікація та кількісне визначення діючих речовин та мікробіологічна чистота. Встановлено відповідність специфікаційних характеристик до вимог ДФУ.

Перспективою дослідження є використання розроблених методик під час створення НТД на крем з клотримазолом та сечовиною.

ЛІТЕРАТУРА

1. Siddiqui A. R., Bernstein J. M., Polenakovic H. A fungus among us // *Skinmed.* – 2010. – N 8 (5). – P. 291–292.
2. Rotta I., Correr C. J. Efficacy of topical antifungal agents in the treatment of dermatophytosis - reply // *JAMA dermatology.* – 2013. – N 149 (10). – P. 1244.
3. Salmon N., Fuller C. Fungal skin infections: Current approaches to management // *Prescriber.* – 2013. – N 24 (8). – P. 31–37.
4. Rathod R., Rathod A., Gupta V. K. et al. Audit in dermatology for rational prescribing // *Res. J. Pharmac., Biol. and Chem. Sci.* – 2012. – N 3 (3). – P. 518–524.
5. Terrie Y. C. Fungal skin infections: Management, treatment, and prevention // *Pharmacy Times.* – 2014. – N 80 (1). – P. 41–45.
6. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: ПІРЕГ, 2001. – 556 с.

Надійшла до редакції 05. 02. 2015.

Арам Дуллах¹, И. А. Власенко¹, Г. П. Петюнин², Л. Л. Давтян¹, С. В. Бирюкова²

¹ Національна медичинська академія последипломного образования имени П. Л. Шупика, г. Киев

² Харьковская медицинская академия последипломного образования

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА КРЕМА НА ОСНОВЕ КЛОТРИМАЗОЛА И МОЧЕВИНЫ

Ключевые слова: крем, клотримазол, мочевины, разработка методов, контроль качества

АННОТАЦИЯ

Микоз стопы в общей популяции колеблется от 5% до 20% и достигает 50% среди больных с хроническими заболеваниями. Микозы, сопровождающиеся гиперкератозом, тяжелее всего поддаются лечению. Поэтому актуальной является разработка лекарственных средств целенаправленного действия, учитывающая этиологию и течение поражения кожи.

На кафедре фармацевтической технологии и биофармации НМАПО имени П. Л. Шупика проводится разработка мягкой лекарственной формы на основе клотримазола и мочевины для лечения грибковых поражений кожи, осложненных кератозом.

Цель работы – разработка методов контроля качества мягкой лекарственной формы на основе клотримазола и мочевины.

Объектом исследования было лекарственное средство – крем на эмульсионной основе типа масло/вода (м/в) с содержанием клотримазола (1%) и мочевины (5%). Контроль качества препарата (описание, однородность, pH) осуществляли согласно Государственной фармакопее Украины. Идентификацию и количественное содержание клотримазола проводили методом ВЕРХ, а мочевины – реакцией окрашивания и титриметрией соответственно. Оценивание внешнего вида, органолептических свойств и однородности образцов крема показало однородность, удовлетворительную консистенцию, крем белого цвета, без запаха. Значение показателя pH – 6,6–6,7.

Установлено, что количественное содержание действующих веществ в препарате входит в допустимые пределы.

Микробиологическими исследованиями показано, что общее число аэробных микроорганизмов (ТАМС) составляет менее 50 КУО/г; общее число дрожжевых и плесневых грибов (ТУМС) – менее 10 КУО/г; не выявлено *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г, что отвечает требованиям ДФУ.

На основании комплекса исследований были установлены спецификационные характеристики для крема на основе клотримазола и мочевины.

DEVELOPMENT OF QUALITY CONTROL METHODS FOR CREAM BASED ON CLOTRIMAZOLE AND UREA

Key words: cream, clotrimazole, urea, methods development, quality control

ABSTRACT

Foot mycosis is varied in the population between 5% up to 20% and in some causes could reach 50% within the patients with chronic disease. There are some difficulties with treatments of mycosis with conducting by hyperkeratosis. Hence, development of medicines with target action with consideration of etiology of skin disease is actual.

There is on going development of soft medicines base on clotrimazole and urea for fungous skin disease treatment which conducting by hyperkeratosis is taken place on pharmaceutical technology and biopharmacy department of Shupyk National Medical Academy of Post-graduate Education.

Development of quality control methods of soft medicine based on clotrimazole and urea is the main target of current work.

The object of study is cream base on oil/water emulsion type with consistent of clotrimazole (1%) an urea (5%). Quality control of medicine (description, homogeneity, pH) was conducted in compliance with State Pharmacopeia of Ukraine. Identification and quantity of clotrimazole was conducted by HELC (high-efficiency liquid chromatography); urea was detected by coloration and titration analysis accordingly. Estimation of general appearance, organoleptic qualities and homogeneity of cream samples was homogeneity, good consistence, white color, odorless. Value of pH is 6,6–6,7.

It was found that quantity of active pharmaceutical ingredients in the medicine is within normal ranges, particular concentrations.

Total number of aerobic microbial count (TAMC) is not more than 50 CFU/g; Total number of combined yeasts/moulds count (TYMC) is not more than 10 CFU/g; *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in 1g have not been found were found by microbiological study which is in compliance with State Pharmacopeia of Ukraine.

Specified characteristics for cream based on clotrimazole and urea was found by complex study.

Електронна адреса для листування з авторами: vlasenko_iryana@mail.ru