

УДК 615.07:543.062

А. В. Глущенко, А. М. ШЕКЕЛЬ, І. А. ВИШНЕВСЬКИЙ, В. А. ГЕОРГІЯНЦ

*Національний фармацевтичний університет**ТОВ «ДКП» Фармацевтична фабрика», м. Житомир*

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДОПОМІЖНИХ РЕЧОВИН У ДИТЯЧОМУ СИРОПІ

Розроблено та валідовано аналітичну методику кількісного визначення метилпарагідроксибензоату та пропілпарагідроксибензоату у дитячій оральній суспензії триметоприму і сульфаметоксазолу в одній пробі методом рідинної хроматографії.

Ключові слова: метилпарагідроксибензоат, пропілпарагідроксибензоат, валідація, рідинна хроматографія.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

До складу дитячого антибактеріального сиропу «Бі-тол», як й до великої кількості інших препаратів, для забезпечення стабільності лікарської форми додають консерванти. Найбільш розповсюдженими консервантами, що використовуються у харчовій та косметичній промисловості, а також при виробництві фармацевтичних препаратів, є естери *n*-гідроксибензойної кислоти, зокрема, метиловий та пропіловий [5, 11]. Вони повністю адсорбуються крізь шкіру та шлунково-кишковий тракт, гідролізуються до *n*-гідроксибензойної кислоти та швидко екскретуються з сечею. Парабени практично не токсичні, не виявляють тератогенних та ембріотоксичних властивостей. Однак, як свідчать літературні джерела, при використанні ефірів *n*-гідроксибензойної кислоти має місце підвищення естрогенної активності, в окремих випадках спостерігаються незначні алергійні прояви, що є недопустимим для педіатричних препаратів [5, 7-9, 11]. Тому, ми вважаємо за необхідне, у дитячих лікарських формах обов'язково контролювати кількісний вміст цих сполук.

АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ ТА ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Для кількісного визначення парабенів у косметичних та пищевих зразках запропоновано декілька методів хроматографічних досліджень,

серед яких метод високоефективної тонкошарової хроматографії, міцелярної рідинної хроматографії, мікроемulsionної електрокінетичної хроматографії [2, 4, 12]. Для аналізу парабенів у рідких лікарських формах також використовують специфічну та чутливу газову хроматографію з попереднім екстрагуванням парабенів діетиловим етером [6]. Однак, для використання у промисловому виробництві, найбільш зручним та економічним є метод високоефективної рідинної хроматографії з УФ-детекцією [1, 10].

Метою роботи є розробка та валідація методики кількісного визначення консервантів – похідних *n*-гідроксибензойної кислоти у дитячому антибактеріальному сиропі, до складу якого входять триметоприм та сульфаметоксазол.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

В якості досліджуемого зразка використано дитячу оральну суспензію «Бі-тол», 200 мг/40 мг у 5 мл по 100 г у флаконі або банці з дозуючою скляночкою в пачці, виробництва ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика», м. Житомир, Україна.

Визначення проведено методом рідинної хроматографії відповідно до умов ДФУ [1].

Досліджуваний розчин. 5.60 г суспензії перенесено у мірну колбу ємністю 50 мл, додано близько 25 мл метанолу Р і перемішано до повного розчинення препарату. Об'єм розчину доведено до мітки тим самим розчинником і перемішано. Відфільтровано через мембранний фільтр

© Колектив авторів, 2013

0,45 мкм (Millipore HVLP, або аналогічний), перші порції фільтрату зливають.

У мірну колбу ємністю 25 мл перенесено 5,0 мл зібраного фільтрату і за допомогою рухомої фази доведено до мітки, після чого перемішано.

Розчин порівняння. 100,0 мг РСЗ метилпарагідрооксибензоату і 25,0 мг РСЗ пропілпарагідрооксибензоату розчинено в метанолі Р в мірній колбі ємністю 100 мл, перемішано до повного розчинення. Об'єм розчину доведено тим самим розчинником до мітки і перемішано.

У мірну колбу ємністю 25 мл перенесено 1,0 мл одержаного розчину, об'єм розчину доведено до мітки рухомою фазою та перемішано.

Дослідження проведено на рідинному хроматографі з УФ-детектором. Використано колонка: Zorbax SB-C18 розміром 4.6×150 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р, з розміром часток 5 мкм (або аналогічна). Рухома фаза: вода для хроматографії Р:ацетонітрил для хроматографії Р (1:1). Швидкість потоку рухомої фази: 1,0 мл/хв; детектування проведено за довжини хвилі 254 нм.

Попеременно хроматографовано по 20 мкл досліджуваного розчину і розчину порівняння, одержано 5 хроматограм для кожного з розчинів.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо відносне стандартне відхилення площ піку метилпарагідрооксибензоату (або пропілпарагідрооксибензоату) для п'яти повторних введень розчину порівняння не перевищує 2 %.

Вміст метилпарагідрооксибензоату (X_1) і пропілпарагідрооксибензоату (X_2) в 1 мл препарату, в міліграмах, розраховано за формулою:

$$X_{1,2} = \frac{S_1 \times m_0 \times 1 \times 50 \times 25 \times \rho \times P}{S_0 \times m_1 \times 100 \times 25 \times 5 \times 100} = \frac{S_1 \times m_0 \times \rho \times P}{S_0 \times m_1 \times 1000},$$

де: S_1 – середнє значення площі піку метилпарагідрооксибензоату (або пропілпарагідрооксибензоату) на хроматограмі досліджуваного розчину;

S_0 – середнє значення площі піку метилпарагідрооксибензоату (або пропілпарагідрооксибензоату) на хроматограмі розчину порівняння;

m_0 – маса наважки РСЗ метилпарагідрооксибензоату (або РСЗ пропілпарагідрооксибензоату), в мг;

m_1 – маса наважки препарату, в г;

ρ – відносна густина препарату, в г/см³;

P – вміст основної речовини в РСЗ метилпарагідрооксибензоату (або РСЗ пропілпарагідрооксибензоату), у відсотках.

Вміст метилпарагідрооксибензоату в 1 мл препарату має бути при випуску від 1,8 до 2,2 мг, на протязі терміну придатності від 1,6 до 2,4 мг.

Вміст пропілпарагідрооксибензоату в 1 мл препарату має бути при випуску від 0,45 до 0,55 мг, на протязі терміну придатності від 0,4 до 0,6 мг.

ПРОГНОЗ НЕВИЗНАЧЕНОСТІ РЕЗУЛЬТАТІВ АНАЛІЗУ

Критерій прийнятності для теоретичної невизначеності результатів розраховано виходячи із припустимих меж вмісту діючої речовини (10 %) і складає 3.2 %.

Прогноз невизначеності пробопідготовки розраховано на основі загальних вимог ДФУ до мірного посуду.

Розрахована невизначеність приготування досліджуваного розчину – 0.66 %, розчину порівняння метилпарагідрооксибензоату – 0.68 %, розчину порівняння пропілпарагідрооксибензоату – 0.99 %. З урахуванням максимально припустимого відхилення площ піків на хроматограмах не більше 2 % сумарна невизначеність аналізу для метилпарагідрооксибензоату становить 2.22 %, для пропілпарагідрооксибензоату – 2.33 %.

Максимально припустима похибка вимірювань при інтервалі 10 % становить 3.2 %. Отже, розрахована невизначеність пробопідготовки і аналізу в цілому забезпечують достатню точність вимірювань.

Специфічність методики підтверджено шляхом порівняння хроматограм стандартного, досліджуваного розчинів і досліджуваного розчину плацебо (рис. 1). Часи утримування метилпарагідрооксибензоату та пропілпарагідрооксибензоату на хроматограмах досліджуваного розчину відповідають часам утримування відповідних піків на хроматограмах розчину порівняння (близько 2,5 хв для метилпарагідрооксибензоату та близько 4,3 хв. для пропілпарагідрооксибензоату).

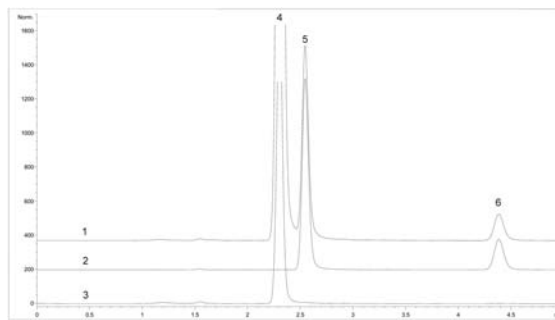


Рис. 1. Хроматограми препарату та його компонентів: де 1 – досліджуваний розчин, 2 – розчин порівняння, 3 – плацебо, 4 – триметоприм і сульфаметоксазол, 5 – метилпарагідрооксибензоат, 6 – пропілпарагідрооксибензоат.

На хроматограмі плацебо не виявлено піків, вищих за шум базової лінії, час утримування

яких збігався б з часом утримування аналізованих речовин.

Для дослідження *лінійності* було приготовлено дев'ять розчинів стандартних зразків консервантів з відомою концентрацією в діапазоні концентрацій від 80 до 120 % від номінального вмісту в препараті мкг/мл.

Розрахунки проведені в нормалізованих координатах. Отримані результати були проаналізовані методом лінійної регресії (табл. 1). Графік та рівняння лінійної регресії наведені на рис. 2.

Таблиця 1

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІНІЙНОСТІ

Критерій	Вимоги ДФУ, (%)	Метилпарабен, (%)	Пропілпарабен, (%)
Кут нахилу		0,997	0,997
Перетинання	< 5.1	0,228	0,346
Коефіцієнт кореляції	> 0,9923	0,9998	0,9999

Для перевірки правильності методики було приготовано три окремі суміші з точно відомим вмістом субстанції, які охоплювали діапазон застосування методики (з концентраціями 80, 100 та 120 % від номінальної).

Відповідно до ДФУ розраховано такі критерії: критерій статистичної незначущості δ % (для правильності) і однібічний довірчий інтервал Δ_z (для прецизійності) (табл. 2). Знайдені критерії відповідають вимогам ДФУ.

Робасність методики продемонстрована на стабільності досліджуваного розчину, розчину порівняння та стійкості методики до змін хроматографічної системи.

Стабільність розчину вивчалась на порівнянні концентрацій досліджуваного розчину з використанням одного і того ж стандартного розчину

протягом доби. Дослідження довели, що відхилення від вихідної концентрації лежить в межах інструментальної похибки. Термін зберігання в методиці не вказаний, розчини мають бути стабільними протягом проведення аналізу (табл. 3).

Таблиця 2

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРАВИЛЬНОСТІ ТА ПРЕЦИЗІЙНОСТІ

Критерій	Метилпарагідроксибензоат		Пропілпарагідроксибензоат	
	Знайдено, (%)	Вимоги ДФУ, (%)	Знайдено, (%)	Вимоги ДФУ, (%)
\bar{z}	100,14		100,15	
S	0,62		0,53	
Δ_z	1,15	< 3,2	0,98	< 3,2
δ , %	0,14	0,384	0,15	0,328

Таблиця 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ СТАБІЛЬНОСТІ

Час зберігання, годин	Концентрація в досліджуваному розчині		Концентрація в розчині порівняння	
	Зміна, %	Різниця, % від початкової	Зміна, %	Різниця, % від початкової
Метилпарагідроксибензоат				
0	100,0	–	100,0	–
2	100,8	0,8	99,6	0,4
12	100,3	0,3	100,1	0,1
24	99,2	0,8	99,6	0,4
Пропілпарагідроксибензоат				
0	100,0	–	100,0	0,0
2	100,8	0,8	100,4	0,4
12	99,1	0,9	100,9	0,9
24	100,6	0,6	98,9	1,1

Стійкість методики до змін хроматографічної системи перевірялась на досліджуваному розчині

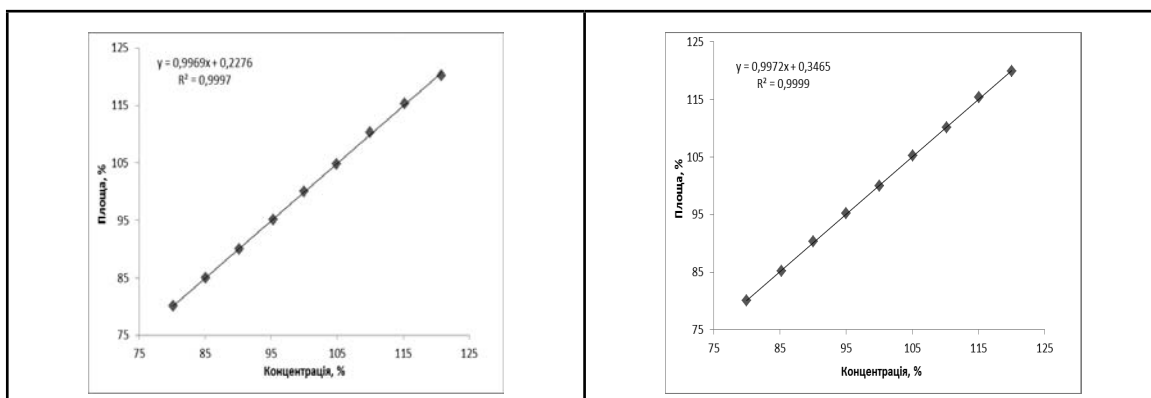


Рис. 2. Графік залежності площі піків від концентрації метилпарагідроксибензоату та пропілпарагідроксибензоату.

КРИТЕРІЇ ПРИДАТНОСТІ ХРОМАТОГРАФІЧНОЇ СИСТЕМИ

Параметр	Час утримання		Число теоретичних тарілок		Коефіцієнт асиметрії	
	М*	Р*	М	Р	М	Р
Умови методу	2.5	4.3	8190	11036	0.84	0.85
Швидкість потоку 0.9 мл/хв (-10%)	2.83	4.85	8729	11591	0.84	0.88
Швидкість потоку 1.1 мл/хв (+10%)	2.32	3.99	7499	10689	0.86	0.85
Температура колонки 18 °С	2.42	3.88	6186	11174	0.81	0.91
Температура колонки 22 °С	2.32	3.65	6163	12167	0.81	0.92
- 10% ацетонітрилу	2.64	2.92	4538	8728	0.92	0.86
+ 10% ацетонітрилу	2.25	3.43	7770	10301	0.82	0.89

Примечание: *М – метилпарагідроксibenзоат; *Р – пропілпарагідроксibenзоат

(табл. 4). Умови хроматографування змінювались в межах $\pm 10\%$ від вказаних в методиці, при цьому розглядалися такі параметри хроматограми як число теоретичних тарілок, коефіцієнт асиметрії піків. На основі даних таблиці встановлені критерії придатності хроматографічної системи.

ВИСНОВКИ

Здійснено розробку і валідацію методики кількісного визначення метилпарагідроксibenзоату і пропілпарагідроксibenзоату у оральної дитячої суспензії «Бі-тол», 200 мг/40мг у 5 мл по 100 г у флаконі або банці з дозуючою скляночкою в пачці, виробництва ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика», м. Житомир, Україна.

Встановлено, що розроблена методика відповідає вимогам ДФУ за специфічністю, правильністю, прецизійністю та робастністю в діапазоні від 80 до 120 % від номінального вмісту метилпарабену та пропілпарабену і є коректною.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., допов. 1. – Х.: РІПЕГ. – 2004. – 520 с.
2. Comparison of quantitative high performance thin layer chromatography and the high performance liquid chromatography of parabens / M. Thomassin, E. Cfvalli, Y. Guillaume [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 1997. – Vol. 15, Issue 6. – P. 831-838.
3. Ghulam Shabir Determination of paracetamol, methyl parahydroxybenzoate, ethyl parahydroxybenzoate, and propyl parahydroxybenzoate in medicinal suspension and tablets by RPLC/UV-DAD / Shabir Ghulam, Arain Shafique // Journal of liquid chromatography & Related Technologies. – 2011. – Vol. 34, № 9. – P. 719-729.
4. Memon Najma Determination of preservatives in cosmetics and food samples by micellar liquid chromatography / Najma Memon, M. Iqbal Bhangar, M.Y. Khuhawer // Journal of Separation Science. – Vol. 28, Issue 7. – P. 635-638.
5. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature / Soni M.G., Taylor S.L., Greenberg N.A [et al.] // Food Chem. Toxicol. – 2002. – Vol. 40 (10). – P. 1335-1373.
6. De Croo F. Gas chromatographic determination of parabens in various pharmaceutical dosage forms / F. De Croo, J. de Schutter, W. Van den Bossche, P. De Moerloose // Chromatographia. – 1984. – Vol. 18(5). – P. 260-264.
7. Hypersensitivity to preservatives. Sasseeville D. Dermatol. Ther. – 2004. – Vol. 17 (3). – P. 251-263.
8. Cashman A.L. Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties / A.L. Cashman, E.M. Warshaw // Dermatitis. – 2005. – Vol. 16(2). – P. 57-66.
9. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites / Boberg J., Taxvig C., Christiansen S. [et al.] // Reprod. Toxicol. – 2010. Vol. 30 (2). – P. 301-312.
10. Clark G. Quantitative determination of methyl and propyl p-hydroxybenzoates by high-performance liquid chromatography / G. Clark, I. A. Rashid // Analyst. – 1977. – Vol. 102. – P. 685-687.
11. Soni M. G. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) / M.G. Soni, I.G. Garabin, G.F. Burdok // Food and Chemical Toxicology. – 2005. – Vol. 43, Issue 7. – P. 985-1015.
12. Mahuzier P. E. Selective and quantitative analysis of 4-hydroxybenzoate preservatives by microemulsion electrokinetic chromatography / P. E. Mahuzier, K. D. Altria, B. J. Clark // Journal of chromatography A. – 2001. – Vol. 924 (1-2). – P. 465-470.

УДК 615.07:543.062

А. В. Глущенко, А. Н. Шекель, И. А. Вишнеvский, В. А. Георгиянц

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ДЕТСКОМ СИРОПЕ**

Разработана и валидирована аналитическая методика количественного определения метилпарагидроксибензоата и пропилпарагидроксибензоата в детской оральной суспензии триметоприма и сульфаметоксазола в одной пробе методом жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: метилпарагидроксибензоат, пропилпарагидроксибензоат, валидация, жидкостная хроматография.

UDC 615.07:543.062

A. V. Glushchenko, A. M. Shekel, I. A. Vishnevskiy, V. A. Georgiyants

**THE WORK OUT AND VALIDATION THE METHOD OF QUANTITATIVE
DETERMINATION OF THE SUBSIDIARY SUBSTANCES IN THE CHILD'S SIRYP**

The method of quantitative determination of methylparahydroxybenzoat and propylparahydroxybenzoat in the child's siryp of the trimethoprim and sulfamethoxazole in the same test by the liquid chromatography have been worked out and validated.

Key words: validation, liquid chromatography, methylparahydroxybenzoat, propylparahydroxybenzoat.

Адреса для листування:
61001, м. Харків, пл. Повстання, 17.
Інститут підвищення кваліфікації
спеціалістів фармації НФаУ
Тел. (057)732-81-03
E-mail: alla_glush@mail.ru

Надійшла до редакції:
10.04.2013