

УДК 543.544.5.068.7:615.074

О.А.Сиротчук, І.Р.Дідух, В.М.Зайцев, С.Ф.Курас

ХРОМАТОГРАФІЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАБЕНІВ

Розроблено і валідовано нову методику визначення метил- та пропілпарабенів у сиропах медичного призначення різного складу з використанням методу оберненофазної хроматографії на ціано-пропілній нерухомій фазі. Хроматографічне розділення досягнуто із застосуванням суміші 0.1 %-ї ортофосфорної кислоти у воді і ацетонітрилу як рухомої фази, колонки Discovery Суано і спектрофотометричної детекції при довжини хвилі 254 нм. Методика дозволяє використовувати в 4—6 разів менше органічного розчинника у рухомій фазі та проводити розділення за 8 хв. При здійсненні валідації перевірено лінійність, збіжність, правильність, специфічність. Методику успішно використано для визначення парабенів у 8 медичних сиропах.

ВСТУП. Парабени — ефіри *n*-гідроксибензойної кислоти — знайшли широке застосування в фармацевтичній галузі як консерванти. Звичайно парабени використовують у продукції з підвищеним вмістом водної фази (сиropи, креми).

Визначення парабенів досить часто проводять за допомогою обернено-фазної високоефективної рідинної хроматографії з спектрофотометричним [1], електрохімічним [2] та флюориметричним [3] детекторами. В більшості методик застосовуються хроматографічні колонки з нерухоною фазою С18 або С8 [1—7]. За цих умов для аналізу беруть рухомі фази із високим вмістом органічного компонента (ацетонітрил, метиловий спирт чи їх суміші). Наприклад, для хроматографічного розділення парабенів на С18 знайшли застосування такі рухомі фази: 0.02 М фосфорна кислота—метанол (59:41) [2], метанол—фосфатний буфер, рН 2.5 (65:35) [3], метанол—ацетонітрил—вода (15:27:58) [5], вода—ацетонітрил (60:40), вода—метанол (40:60 або 50:50) [1, 6]. Як видно, всі вони містять від 40 до 65 % токсичного органічного розчинника. Спроба зменшення кількості органічного модифікатора значно збільшує тривалість аналізу [4] або вимагає градієнтного режиму [7]. Час хроматографування за цих умов варіюється від 10 до 30 хв. Відомі методики визначення метил- та пропілпарабенів у косметичній продукції із застосуванням хроматографічного розділення на ціанопропілній колонці [8, 9]. Наприклад, методика [8] передбачає використання градієнтного елюювання аналітів метанолом у діапазоні

від 40 до 80 %. Відомим є і метод ізократичного елюювання метилпарабену з ціанопропілною колонки [9], проте в цьому випадку потрібна рухома фаза на основі суміші ацетонітрилу та тетрагідрофурану з добавкою 0.1 % трифтороцтової кислоти [9].

Отже, відомі методики хроматографічного визначення парабенів не є екобезпечними та експресними. Метою даного дослідження є розробка безградієнтної методики одночасного визначення парабенів у сиропах різного складу методом рідинної хроматографії, яка б характеризувалася суттєвим зниженням використання токсичного органічного розчинника та одночасним підвищенням експресності розділення. З цієї метою досліджено можливість застосування хроматографічної колонки з ціанопропілсилільною нерухоною фазою.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА. Використовували високоефективну хроматографічну систему Hewlett Packard 1100, обладнану чотирьохканальним градієнтним насосом, автосамплером та термостатом автосамплера, термостатом колонок та діодно-матричним детектором. Хроматограми записано і оброблено за допомогою програмного пакету Chemstation (A.08.03).

Застосовували стандартні речовини метил- та пропілпарабенів виробництва SJZ Chem. Co.Ltd, Китай, ацетонітрил (HPLC grade) — Sigma-Aldrich, ортофосфорну кислоту 85 % (р.а.) — Merck, Німеччина. Деіонізовану воду доочищували за допомогою системи мембранної фільтрації Milli-Q (Millipore, США).

Умови хроматографування були наступни-

ми. Нерухома фаза — колонка Discovery Суано 250×4.6 з розміром часток 5 мкм (виробник Supelco), рухома фаза — суміш водного розчину фосфорної кислоти, концентрація якої змінювалася в діапазоні 0—0.1 %, та ацетонітрилу (співвідношення компонентів у ході розробки методики змінювали від 80:20 до 92:8). Швидкість потоку — 1.3 мл/хв, довжина хвилі детектування — 254 нм, об'єм інжекції — 10 мкл, термостатування колонки — за 30 °С.

Об'єктами хроматографічного розділення були медичні сиропи: кофанол (Наброс фарма, Індія); інстаріл (Аглоумед лтд, Індія); колдакт бронхо (Ранбаксі лабораторіз лімітед, Індія); цитал (Індокс ремедіз лімітед, Індія); флюколд сироп (Наброс фарма, Індія); алмагель (Балканфарма-троян АТ, Болгарія); хофітол (Лабораторія Роза-Фігофарма, Франція); кофекс (Дже-ном біотек, Індія).

Оскільки обидва парабени не є водорозчинними сполуками, для приготування стандартних розчинів їх спочатку було розчинено в невеликій кількості органічного розчинника, доведено до мітки водою, а далі розбавлено до потрібної концентрації водою. Такий підхід дозволяє зменшити використання органічного розчинника на стадії приготування розчинів для хроматографічного розділення.

Для приготування вихідного розчину парабенів зважили 80 мг метилпарабену і 20 мг пропілпарабену в мірній колбі об'ємом 50 мл. Додали для розчинення 10 мл ацетонітрилу і довели до мітки водою.

Стандартний розчин парабенів для хроматографічного розділення готували наступним чином: 2.0 мл вихідного розчину парабенів перенесли в мірну колбу 50 мл і довели до мітки водою. Концентрація метилпарабену — 64, пропілпарабену — 16 мкг/мл.

З метою дослідження лінійності приготували 7 вихідних розчинів парабенів так, як описано вище. Для кожного з розчинів здійснили відповідне розведення, щоб отримати калібрувальні розчини 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 % від концентрації 64 мкг/мл для метилпарабену та 16 мкг/мл для пропілпарабену.

Сиропи медичного призначення є глюкозно-цукровими водними розчинами, тому вони легко розчиняються у воді. Для приготування розчинів зразків сиропів відповідну наважку

кожного сиропу розчинили в воді, щоб концентрація метилпарабену в розчині була 64, а пропілпарабену — 16 мкг/мл. Якщо співвідношення парабенів у сиропі відрізнялося від їх співвідношення в стандартному розчині (4:1), то готували два незалежних зразка з концентраціями парабенів такими, як в стандартному розчині.

Етапи валідації визначали, виходячи з того, що для фармацевтичних препаратів основні валідаційні характеристики встановлені Державною фармакопеею України [10]. Їх застосування на практиці було статистично обґрунтовано та детально проілюстровано на конкретних прикладах у ряді наукових робіт [11—13]. Як видно із вищевказаних джерел, специфічність, придатність хроматографічної системи, лінійність та діапазон використання, збіжність, правильність є обов'язковими для перевірки в ході валідації методики. Саме ці параметри були перевірені при валідації хроматографічної методики. Також показано придатність хроматографічної системи у відповідності до вимог, які є в літературі [10, 15].

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ. Для розробки методики застосовували колонку з ціанопропільною фазою на силікагелі, з метильним ендкепінгом Discovery Суано 250×4.6 мм, 5 мкм (загрузка вуглецю 4.5 %). Ця фаза є менш гідрофобною у порівнянні з октадецилсилільною або октилсилільною фазою. Як правило, слабше утримування аналіту на ціанопропільній фазі вимагає більш слабкої рухомої фази (в даному випадку це фаза з меншою кількістю органічного компоненту). За рахунок зменшення кількості органічного компоненту в рухомій фазі та додаткових механізмів утримування (окрім гідрофобної взаємодії, відбуваються π - π - та полярна взаємодії) селективність є альтернативною щодо C8 та C18 [14]. В якості органічного компоненту рухомої фази використовувався ацетонітрил, а в якості модифікатора водного компоненту — ортофосфорна кислота. В ході розробки методики було перевірено вплив концентрації ортофосфорної кислоти в рухомій фазі на ефективність хроматографічного розділення. Концентрація фосфорної кислоти у рухомій фазі змінювалася від 0 до 0.1 %. Подальше збільшення концентрації фосфорної кислоти є небажаним внаслідок можливого руйнування нерухомої фази. Для піку метилпарабену виявлено такі значення ефективності хроматографічної

Т а б л и ц я 1

Залежність кількості теоретичних тарілок для піку метилпарабену при збільшенні концентрації ортофосфорної кислоти від 0 до 0.1 % у рухомій фазі (вміст ацетонітрилу у рухомій фазі — 10 %)

Концентрація H_3PO_4 , %	Кількість теоретичних тарілок
0	9621
0.0125	10243
0.0250	12792
0.05	14276
0.075	16531
0.10	17110

колонки (формула, за якою розрахована дана величина має вигляд: $N = 5.54(t_R/W_{1/2})^2$, де t_R — час утримування, а $W_{1/2}$ — половина ширини піку) в залежності від зміни концентрації фосфорної кислоти (табл. 1). При зміні концентрації ортофосфорної кислоти в даному діапазоні кількість теоретичних тарілок для піку метилпарабену збільшилася майже вдвічі. Для піку пропілпарабену спостерігається така ж закономірність, а значення близькі до аналогічних для метилпарабену.

Також було досліджено хроматографічне розділення парабенів з компонентами матриці на прикладі одного із сиропів, де розділення було критичним, в залежності від зміни співвідношення у рухомій фазі (0.1 %-й водний розчин фосфорної кислоти—ацетонітрил). На рис. 1, *a* показано зміни в якості хроматографічного розділення при використанні 20, 15 та 10 % органічного компоненту в рухомій фазі. Зокрема, на хроматограмі 1 та 2 можна побачити, що за цих умов повне розділення компонентів сиропу не відбувається, а на хроматограмі 3 всі піки відділені один від одного. Отже, зменшення кількості органічного компоненту до 10 % дозволило відділити обидва парабени від компонентів матриці. Щоб довести стійкість даного розділення до зміни у співвідношенні між компонентами рухомої фази, зразок було інжектровано ще у дві системи з вмістом органічного компоненту 8 та 12 %. Як видно з рис. 1, *б*, якість хроматографічного розділення є стійкою до такої зміни. Отже, при розробці методики оп-

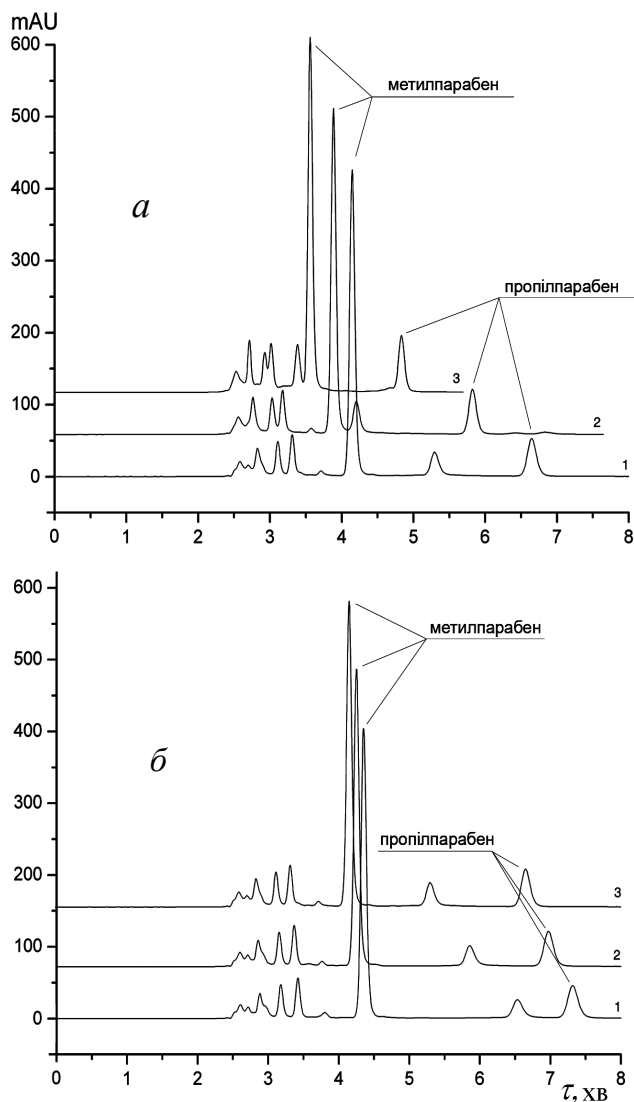


Рис. 1. Хроматограми: *a* — 0.1 % ортофосфорна кислота : ацетонітрил 90:10 (1), 85:15 (2), 80:20 (3); *б* — 92:8 (1), 90:10 (2), 88:12 (3).

тимальні результати хроматографічного розділення були отримані при використанні рухомої фази 0.1 %-ва фосфорна кислота—ацетонітрил у співвідношенні 90:10.

Перед початком процедури валідації треба впевнитися, що система і методика здатні давати прийнятні та відтворювані результати. Так, з боку відтворюваності площі піків система має забезпечувати значення RSD (відносне стандартне відхилення) не більше, ніж 1.0 % [15]. Симетрія піку має знаходитися в межах 0.8—1.5 [10],

а ефективність хроматографічної колонки повинна становити не менше 2000 теоретичних тарілок [15]. Відповідність хроматографічної системи вказаним вище критеріям визначалася шляхом шестикратного інjektування стандартного розчину з концентрацією від теоретичної 100 %. RSD площ піків метилпарабену шести інжекцій — 0.15 %, а для пропілпарабену — 0.24 %. Симетрія для піків метил- та пропілпарабенів — 1.33 та 1.21, а ефективність хроматографічної колонки — 17130 та 17000 відповідно.

Специфічність перевірялася шляхом інжекції в хроматографічну систему розчинів плацебо сиропів (плацебо були приготовані з тих речовин, які у кожному з сиропів можуть заважати визначенню внаслідок оптичного поглинання при довжині хвилі детекції, табл. 2). У плацебо відповідного сиропу входили речовини, напроти яких є позначка „+”, 4-гідроксибензойна кислота (продукт деградації парабенів) з концентрацією 60 мкг/мл, а також цукор в кількості, що дає 20 %-ву концентрацію в розчині, призначеному для хроматографічного розділення. Усього було приготовано сім плацебо різного складу, оскільки плацебо для сиропів 1 та 4 ма-

Т а б л и ц я 2

Наявність у сиропях речовин, які дають аналітичний сигнал в умовах визначення

Складник сиропу	Номер зразка сиропу *							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Бромгексин	-	+	-	-	-	-	-	-
Фенілефрін	-	+	+	-	-	-	-	-
Натрію бензоат	+	-	+	+	+	-	-	+
Хлорфеніраміну малеат	-	-	-	-	+	-	-	+
Гуайфенезин	-	-	+	-	-	-	-	-
Екстракт артишоку	-	-	-	-	-	-	+	-
Сальбутамол	-	+	-	-	-	-	-	-
Парацетамол	-	-	-	-	+	-	-	-
Аброксол	-	-	+	-	-	-	-	-
Кодеїн	-	-	-	-	-	-	-	+

* 1 – Кофанол, 2 – інстаріл, 3 – колдакт бронхо, 4 – цитал, 5 – флюколд сироп, 6 – алмагель, 7 – хофітол, 8 – кофекс; „+” — речовина використовувалася в приготуванні плацебо, „-” — не використовувалася.

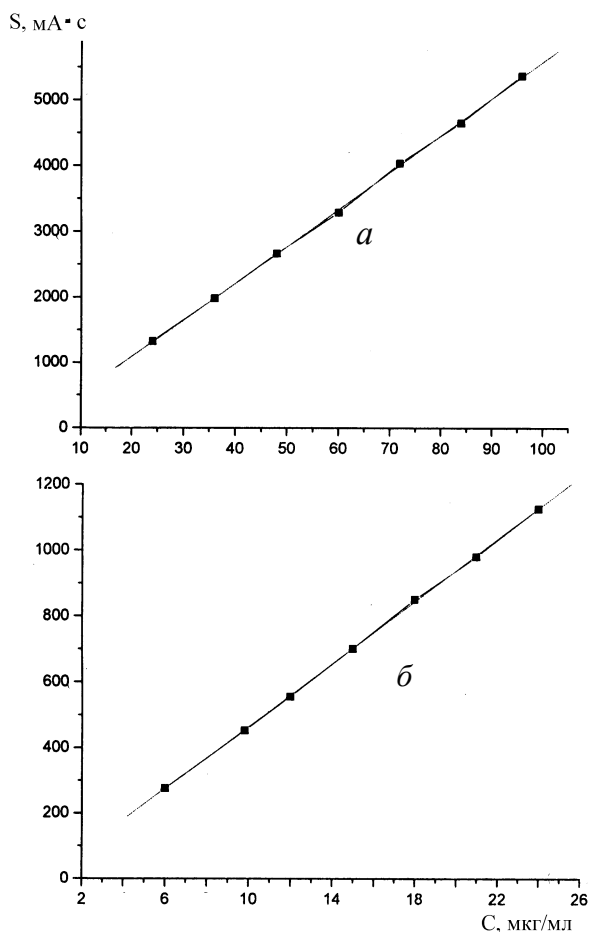


Рис. 2. Залежність площі піків метилпарабену (а) та пропілпарабену (б) від їх концентрації в розчині. Коefіцієнт лінійної кореляції R дорівнює 0.99985 (а) і 0.99992 (б).

ють однаковий склад. Перекривань піків плацебо і речовин, що визначалися, не виявлено. При використанні технічних можливостей діодноматричного детектора виявлено, що спектри в піках парабенів на хроматограмі розчину стандартних речовин ідентичні спектрам у піках, які відповідають парабенам на хроматограмах зразків сиропів.

Лінійність залежності площі піку для метилпарабену від його концентрації перевірялася в діапазоні 25.6–102.4, а для пропілпарабену — 6.4–25.6 мкг/мл. Для перевірки лінійності та діапазону застосування було приготовано 7 розчинів, що містили парабени в діапазоні концентрацій 40–160 % (з кроком 20 %), і для кожного розчину отримано по 3 хроматограми. За загальними

Т а б л и ц я 3
Результати аналізу досліджуваних сиропів

Сироп	Кількісний вміст, мг/5 мл	
	Метилпарабен	Пропілпарабен
Хофітол	5.1	2.6
Цитал	4.8	0.5
Флюколд сироп	6.3	0.4
Інстаріл	6.7	1.8
Кофанол	2.7	0.4
Кофекс	6.3	1.7
Колдакт	8.9	1.0
Алмагель	10.0	1.3

П р и м і т к а. Усі досліджувані сиропи відповідають специфікації виробника.

вимогами коефіцієнт лінійної кореляції R має бути більшим, ніж 0.999 [15]. Коефіцієнт лінійної кореляції для метилпарабену $R=0.99985$, а для пропілпарабену $R=0.99992$. Рівняння прямої, отримане для метилпарабену, має вигляд: $y = -24.8 + 55.8x$, а для пропілпарабену $y = -7.2 + 47.2x$. Межі кількісного визначення (QL) для метилпарабену та пропілпарабену, розраховані теоретично, становлять відповідно 4.9 та 0.9 мкг/мл, а межі детектування (DL) — 1.6 та 0.3 мкг/мл. Вказані межі розраховані згідно з формулами [15]:

$$QL = 10SD/S, \quad DL = 3.3SD/S,$$

де SD — стандартне відхилення значень y -інтерсепт; S — нахил калібрувальної кривої.

Графіки залежності значень площі аналітичного сигналу від концентрації в розчині відповідного аналіту наведені на рис. 2.

Збіжність виражає ступінь близькості (або розкиду) результатів для серії вимірів, виконаних за даною методикою на різних пробах одного і того ж самого однорідного зразка. Критерій прийнятності для повторюваності такий: RSD результатів кількісного визначення має бути меншим, ніж 2.0 % [15]. Для визначення придатності методу було проаналізовано 6 проб одного і того ж модельного зразка, що містив 100 % від теоретичного значення вмісту парабенів у діапазоні робочих концентрацій. Найбільше значення RSD для аналізованих сиропів — 1.4 %.

Правильність — це близькість отриманих ре-

зультатів до істинних. Критерій прийнятності значень правильності 100 ± 2 % [15]. Правильність перевірено на модельних зразках для трьох рівнів: 80, 100, 120 % від номінальної концентрації парабенів у стандартному розчині. Співвідношення введено/знайдено для досліджуваних сиропів знаходилося в діапазоні від 99.6 до 101.1 %.

Для дослідження стабільності розчинів приготувані розчини стандарту і зразку з теоретичною концентрацією 100 % інжектувалися в хроматографічну систему одразу після приготування та через кожні 6 год протягом однієї доби. RSD площ п'яти інжекцій не перевищило 0.3 % для обох речовин, що визначалися, а це означає, що розчини стандарту і зразку є стабільними протягом 24 год (RSD площ піків метилпарабену шести послідовних інжекцій — 0.15 %, а для пропілпарабену — 0.24 %).

За розробленою методикою було визначено кількісний вміст парабенів у досліджуваних сиропах. Результати представлені в табл. 3.

ВИСНОВКИ. Розроблена методика кількісного визначення парабенів у лікарських сиропах підтверджена тестами на специфічність, лінійність, правильність, збіжність. Методика дає змогу проводити визначення парабенів у присутності багатокомпонентної матриці і використовує в 4–6 раз менше органічного компонента в рухомій фазі та при пробопідготовці, що робить її екобезпечною. Процедура пробопідготовки не потребує екстракції, що дозволяє легко і зручно визначати обидва парабени і застосовувати методику для контролю вмісту зазначених консервантів у сиропах медичного призначення.

РЕЗЮМЕ. Разработана и валидирована новая методика определения метил- и пропилпарабенов в сиропах медицинского назначения разного состава методом обратно-фазовой хроматографии на циано-пропильной неподвижной фазе. Хроматографическое разделение достигнуто с применением смеси 0.1 %-й ортофосфорной кислоты в воде и ацетонитрила в качестве подвижной фазы, колонки Discovery Суано и спектрофотометрической детекции при длине волны 254 нм. Методика позволяет использовать в 4–6 раз меньше органического растворителя в подвижной фазе и проводить разделение за 8 мин. При проведении валидации проверены линейность, пригодность хроматографической системы, сходимость,

правильность, специфичность. Метод с успехом использован для определения парабенов в 8 сиропах медицинского назначения.

SUMMARY. A novel reversed-phase LC method using CN-propyl column has been developed and validated for the analysis of methylparaben and propylparaben in medical syrups of different composition. The chromatographic separation was achieved by HPLC using a mixture of 0.1 % orthophosphoric acid solution in water with acetonitrile as the mobile phase, a Discovery Cyano column and UV detection at 254 nm. The method was validated with respect to linearity, precision, accuracy, specificity. This method permits to use 4—6 times less of organic component in mobile phase and the separation has been carried out in 8 minutes. All the characteristics examined met the current recommendations for HPLC method validation. The method was successfully used for determining both compounds in 8 medical syrups of different composition.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Seong Ho Kang, Hasuck Kim* // J. Pharm. Biomed. Andl. -1997. -**15**, № 9–10. -P. 1359–1364.
2. *Qunlin Zhang, Mei Lian, Lijuan Liu, Hua Cui* // Anal. Chim. Acta. -2005. -**537**, № 1–2. -P. 31–39.

3. *Hajkova R., Solich P.* // Ibid. -2002. -**467**, № 1–2. -P. 91–96.
4. *Kreuz D.M., Howard A.L., Ip D.* // J. Pharm. Biomed. Andl. -1999. -**19**, № 5. -P. 725–735.
5. *Hajkova R., Solich P.* // Ibid. -2003. -**32**, № 4–5. -P. 921–927.
6. *Ali M.Sh., Chaudhary R.S., Takeddin M.A.* // Drug Development and Industrial Pharmacy. -1999. -**25**, № 10. -P. 1143–1147.
7. *Kokolets M.X., Kafkala S., Tsiaganis M.* // J. Pharm. Biomed. Andl. -2005. -**38**, № 4. -P. 763–767.
8. *Sottofattori E., Anzaldi M., Balbi A., Tonello G.* // Ibid. -1998. -**18**, № 1–2. -P. 213–217.
9. *Ma M., Lee T., Kwong E.* // J. Pharm. Sci. -2002. -**91**, № 7. -P. 1715–1723.
10. *Державна фармакопея України. Доп. 3.* -Харків, 2009. -С. 37.
11. *Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Подружников Ю.В.* // Фармаком. -2004. -№ 3. -С. 3–17.
12. *Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Доценко Т.Н., Загорий В.А.* // Там же. -2005. -№ 2–3. -С. 78–94.
13. *Гризодуб А.И.* // Там же. -2006. -№ 4. -С. 35–44.
14. *Marchand D.H., Croes K., Dolan J.W., Snyder L.R.* // J. Chromatogr. A. -2005. -**1062**. -P. 57–64.
15. *Shabir G.A.* // Ibid. -2003. -**987**. -P. 57–66.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
ДП Центральна лабораторія з аналізу якості
лікарських засобів і медичної продукції, Київ

Надійшла 03.09.2012