

О. Д. Диль<sup>1</sup>, О. Г. Мінченко<sup>2</sup>, д.б.н., К. Г. Виноградова<sup>3</sup>, к.б.н.

## РОЗРОБКА МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО КОНТРОЛЮ НИЗЬКОТОКСИЧНИХ КОНСЕРВАНТІВ ДЛЯ ПРЕПАРАТІВ З ДІЮЧИМИ РЕЧОВИНАМИ ГРУПИ ХІНОЛІНІВ

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка

<sup>2</sup>Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ

<sup>3</sup>Лабораторія з контролю якості лікарських засобів ТОВ  
"Міжнародна об'єднана лабораторна група", Київ

На сьогодні консерванти широко застосовуються як складові частини у різних лікарських формах: мазі, суспензії та супозиторії. Низько токсичні консерванти можуть бути використані у складі таких лікарських форм, як таблетки, капсули тощо. В першу чергу це пов'язано з тим, що основною причиною зниження якості лікарських засобів може бути забруднення їх мікроорганізмами під час виробництва або застосування. Препарати, до складу яких входять консерванти, можна умовно поділити на дві групи: 1-лікарські засоби для парентерального введення та для офтальмології, що випускаються стерильними в герметичних контейнерах (флаконах) для багаторазового застосування; 2-нестерильні засоби для перорального застосування (тверді та рідкі), для дерматології (мазі, розчини, суспензії) та проктології (супозиторії, мазі). Стерильність цих препаратів досягається різними методами, але застосування антимікробних добавок набуває особливого значення тоді, коли йдеться про багатодозові контейнери. Хоча лікарські засоби перорального використання виготовляють нестерильними, однак до них застосовують певні вимоги щодо мікробної зараженості. Ризик контамінації твердих лікарських засобів невеликий. Це пов'язано з тим, що залишкова вологість препарату недостатня для розвитку бактерій та спор. Однак серйозним джерелом забруд-

нення є допоміжні речовини, які використовуються при виготовленні лікарських форм (цукор, крохмаль, пектин та ін). Волога грануляція, яка все частіше використовується під час виробництва, не забезпечує загибель мікроорганізмів. Зберігання готової продукції за умов підвищеної вологості також може бути причиною контамінації. Саме з метою запобігання мікробної контамінації виникає необхідність вводити до складу лікарських засобів консерванти, таких як сорбітова або бензойна кислота та їх солі, ефіри п-оксибензойної кислоти. У багатьох країнах запроваджені норми консервантів у лікарських засобах. Так, для ін'єкційних лікарських форм допустимими нормами є 0,1-0,2 % від маси засобу, для офтальмологічних 0,01-0,1%, для пероральних засобів-0,1-1% [1-3].

У сучасні фармакопеї [1, 2] як антисептичні низькотоксичні консерванти включені такі хімічні речовини: хлорбутонол гідрат (0,05 — 0,5 %), фенол (0,25 — 0,3 %), хлороформ (0,5 %), мертіолат (0,01 %), ніпагін (0,1 %), ніпазол, кислота сорбітова (0,1 — 0,2 %), тощо. Із спиртів в якості консервантів використовують етанол, бензол, хлорбутанолу гідрат. У випадку з етанолом помітна інтоксикація у людини реєструється вже при вмісті його в крові 1,5 г/л, сильна — 3,5 г/л, а 5,5 г/л є летальною дозою. Більш токсичним спиртом є бензол (летальна доза 10 — 15 мг/л). Токсичною спо-

лукою є фенол: летальним є потрапляння в організм дорослої людини 1 — 10 г та 0,05 — 0,5 г для дитини. В дозах 0,25 — 5 % фенол використовується у препаратах інсуліну, вакцин і сироваток. Хлоркрезол у 10 — 13 разів активніший за фенол і менш токсичний; його використовують як низькотоксичний консервант для очних крапель (0,05 %), ін'єкційних розчинів (0,1 — 0,2 %). В якості консервантів використовують бензойну та сорбітову органічні кислоти для яких ЛД<sub>50</sub> дорівнює 3,3 г/кг маси тіла.

Для заміни саліцилової та бензойної кислот, які активні лише в сильно кислому середовищі, в останні роки запропоновано ефіри п-оксибензойної кислоти (парабени), як низькотоксичні консерванти. Парабени найбільш широко застосовуються для консервування фармацевтичних та косметичних препаратів, які ефективні як в слабо кислому, так і нейтральному середовищі. Токсичність парабенів з низькомолекулярними спиртами тим нижча, чим довший спиртовий залишок. Найбільш токсичними є метилпарабен (ніпагін) та пропілпарабен (ніпазол). За механізмом дії парабени схожі з фенолом, вони руйнують клітинні мембрани, денатурують внутрішньоклітинні білки та вступають в реакції з деякими коферментами. Парабени затримують засвоєння таких важливих поживних речовин, як глюкоза і пролін, та руйнують структуру клітинної мембрани мікроорганізмів [4, 5].

Останнім часом як лікарські засоби все більше використовуються похідні 8-оксихіноліну. Досить активною сполукою виявилась налідиксова кислота, а пізніше була отримана нова високоактивна речовина-оксолінієва кислота, яка за спектром дії близька до налідиксової кислоти але у 2-4 рази більш активна. Ці кислоти малотоксичні, їх рекомендують застосовувати, головним чином, при лікуванні інфекційних захворювань сечостатевої шляхів. Зараз синтезовано ряд похідних 4-хінолону, особливо активними виявились сполуки, які мали в положенні 7 хінолонового ядра не заміщений або заміщений цикл піперазину, а в положенні 6-атом фтору (фторхінолони). У порівнянні з налідиксовою та оксолінієвою кислотою сполуки цієї групи мають більш широкий спектр дії і ефек-

тивні не тільки при інфекціях сечостатевого шляху, а й при інших інфекційних захворюваннях. Нещодавно була встановлена ефективність лікування офлоксацином та ципрофлоксацином за мікобактеріозів в тому числі туберкульозі [6-10].

Метою цього дослідження було розробити аналітичний метод, який дозволяв би кількісно оцінити вміст низькотоксичних консервантів-ніпагіну та ніпазолу у лікарських препаратах, діючими речовинами яких є хіноліни.

Методів контролю низькотоксичних консервантів у даній групі речовин не існує.

Для контролю кількісного вмісту консервантів у препаратах з діючими речовинами групи хінолінів ми застосували метод високоефективної рідинної хроматографії. Його перевагою при такому аналізі є специфічність, висока чутливість і можливість визначення наднизьких концентрацій консервантів [11, 12].

Спочатку були досліджені спектри поглинання ніпагіну та ніпазолу.

Була виявлена можливість їх контролю за двох довжин хвиль-215 нм та 250 нм (максимуми поглинання). Речовини групи хінолінів, такі, як кислота піпемідієва, норфлоксацин, офлоксацин, ципрофлоксацин та ломефлоксацин, мають максимум поглинання за довжин хвиль 215, 280 та 325 нм (рис. 1, 2).

В лікарських засобах застосовують високі концентрації речовин групи хінолінів, а концентрація консервантів порівняно низька. За таких обставин досить важко контролювати їх наявність за однією довжиною хвилі поглинання з причини перекривання спектрів. Ми обрали довжину хвилі 250 нм, але і за цієї довжини хвилі вплив хінолінів досить помітний. Натомість, саме за цієї довжини хвилі повністю нівелюється будь-який вплив традиційних допоміжних речовин, які використовуються при виготовленні таблеток, супозиторіїв або мазей. Надалі ми будемо наводити дані тільки для ципрофлоксацину, як найбільш поширеної речовини серед хінолінів [9].

Для проведення аналізу сорбентом був обраний октилселільний селікагель з діаметром пор 5 мкм, який найбільше пристосований для кількісного контролю консервантів. За умов хроматографування з традиційним співвідношенням органічного компонента (ацетонітрилу) та води 50:50 не було досягнуто розділення переважаного піку ципрофлоксацину з піком ніпагіну, першим піком серед консервантів. Із зменшенням концентрації органічного компонента до 25% було досягнуто достатнє розділення між піком ципрофлоксацину та ніпагіном але пік другого консерванту ніпазолу мав дуже високий час утримування 30 хв. В табл. 1 представлено залежність показників розділення, часу утримування та ефективності піків досліджуваних речовин від співвідношення складу рухомої фази. Для зменшення часу аналізу було застосоване градієнтне елюювання. Пік ніпагіну має час утримування 8,5 хв і одразу після цього насос перемикається на режим подачі рухомої фази у співвідношенні вода ацетонітрил 25:75. Внаслідок цього час виходу піку ніпазолу скоротився до 11 хвилин. Загальний час хроматографування з переключеннями між режимами та

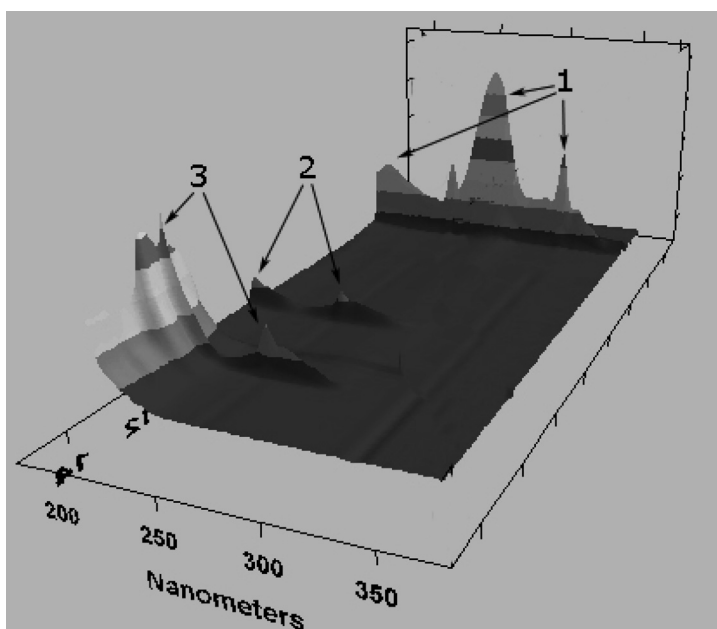


Рис. 1. Трьохвимірний спектр поглинання суміші ципрофлоксацину, ніпагіну, ніпазолу

Примітки: 1-ципрофлоксацин, 2-ніпагін, 3-ніпазол

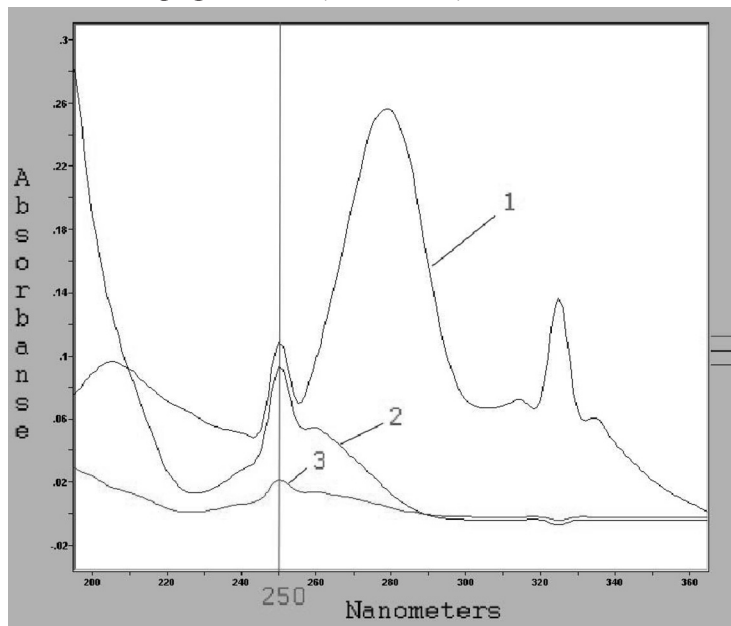


Рис. 2 Спектри поглинання у суміші метанол вода (70:30)

Примітки: 1-ципрофлоксацин, 2-ніпагін, 3-ніпазол

Залежність показників розділення, часу утримування піків та кількості теоретичних тарілок (КТТ) досліджуваних речовин від співвідношення складу рухомої фази

Співвідношення фаз		Розділення			Час утримування, хв			Ефективність піку, КТТ		
ацетонітрил	вода	а	б	в	а	б	в	а	б	в
50	50	–	0,2±0,01	1,5±0,07	2±0,05	2,5±0,02	4±0,05	5400±26	3500±32	3600±21
40	60	–	1,2±0,03	5,0±0,03	2±0,03	3,0±0,03	8±0,03	5600±20	3300±11	3200±30
30	70	–	4,0±0,02	19,0±0,2	2±0,04	4,2±0,04	18±0,05	6300±53	3600±26	2300±36
25	75	–	6,5±0,01	34,0±0,5	2±0,02	8,6±0,06	31±0,08	6500±65	4100±20	952±60
20	80	–	15,0±0,06	47,0±1,4	3±0,05	12,0±0,5	60±0,04	4300±30	2300±35	300±50
Градієнт		–	6,5±0,04	6,4±0,06	2±0,04	8,6±0,07	11±0,05	6560±20	4000±36	3500±35

Примітки: а-ципрофлоксацин, б-ніпагін, в-ніпазол

Таблиця 2

Схема елюентного хроматографування, яка ефективна для кількісного визначення вмісту консервантів

Час, хв	Вода, %	Ацетонітрил, %
0	75	25
8.5	75	25
11	25	75
14	75	25

врівноваженнями системи складав 14 хв. На рис. 3 наведено профіль елюції суміші ципрофлоксацину, ніпагіну та ніпазолу за кінцевих умов градієнтного елюювання (табл. 2). Для дотримання відтворюваності методу були розраховані умови придатності хроматографічної системи за показниками кількості теоретичних тарілок, співвідношенням сигнал/шум та фактором симетрії для

Таблиця 3  
Залежність параметрів піків досліджуваних речовин від їх концентрації

Концентрація		Характеристики піків		
		КТТ	сигнал/шум	фактор симетрії
Ніпагін	0,005 мг/мл	4500±55	50,50±0,02	1,2±0,02
Ніпазол		4050±30	32,50±0,03	1,3±0,02
Ніпагін	0,0005 мг/мл	3500±15	10,55±0,05	1,2±0,05
Ніпазол		3300±20	8,30±0,07	1,3±0,04
Ніпагін	0,0001 мг/мл	2050±25	1,30±0,03	1,4±0,02
Ніпазол		1025±23	1,10±0,04	1,7±0,06
Ніпагін	0,00005 мг/мл	540±11	0,20±0,01	1,5±0,04
Ніпазол		390±23	0,15±0,02	2,1±0,07

піків ніпагіну та ніпазолу, а також коефіцієнт розділення для кожного компонента (табл. 4).

Особливе значення при кількісному дослідженні вмісту консервантів у лікарському засобі, особливо в дуже низьких концентраціях, має встановлення умов приготування проби. Необхідно було підібрати такі умови, за яких консерванти повністю переходять у роз-

чин. Розчинники не повинні впливати на умови хроматографії та на хроматографічні характеристики. Для цього, насамперед, ми виходили з хімічних властивостей досліджуваних сполук. Згідно даних [1, 2], консерванти гарно розчинні у метанолі та погано у воді. Для переведення їх у розчин з таблетки застосовували суміш метанол вода у співвідношенні 70:30. Але для кращого вивільнення консервантів та відділення від допоміжних речовин, які використовуються для формування таблетки, спочатку порошок розтертих таблеток диспергували водою у кількості 30% від об'єму мірного посуду, в якому готується проба, а потім розчиняли консерванти в метанолі та доводили ним до мітки. Таким чином досягалась кінцева концентрація розчинника [13-15].

У випадку мазі або супозиторіїв необхідно відділити консерванти від основи лікарської форми, яка найчастіше являє собою гідрофобну сполуку. Для цього застосовується метод розчинення основи за допомогою температури та екстракції органічними розчинниками. Далі основа за низької температури осаджується, а відфільтрований розчин з необхідною

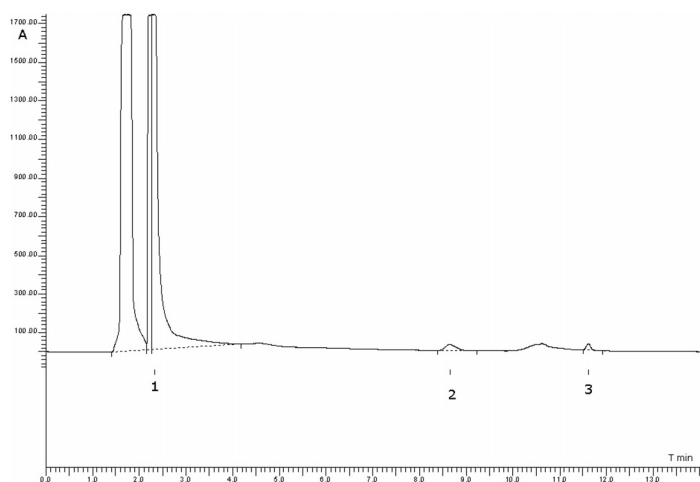


Рис. 3 Профіль елюції за умов градієнтного елюювання розчину, який містить стандартні зразки

Примітки: 1-ципрофлоксацин, 2-ніпагін, 3-ніпазол

Таблиця 4

**Показники для хроматографічних піків, при досягненні яких система вважається придатною для кількісного визначення консервантів**

Показник	Компонент	
	ніпагін	ніпазол
Кількість теоретичних тарілок	Не менше 3000	Не менше 3000
Розділення	Не менше 6	Не менше 5
Сигнал/Шум	Не менше 3	Не менше 3
Фактор симетрії	0,8-1,5	0,8-1,5

концентрацією використовується як випробуваний зразок [15, 16].

Виходячи з даних табл. 3, межа кількісного аналізу консерванту цим методом становить 0,0005 мг/мл. Дослідження параметрів

піків ніпагіну та ніпазолу вказують на різке зниження співвідношення сигнал/шум та кількості теоретичних тарілок (КТТ) для консервантів з концентрацією, нижче зазначеної. Розраховані показники придатності

хроматографічної системи для проведення кількісного визначення консервантів (табл. 4).

Таким чином, нами розроблені умови кількісного визначення вмісту низькотоксичних консервантів (ніпагін та ніпазол) методом високоефективної рідинної хроматографії для їх контролю у лікарських засобах з різними діючими речовинами групи хінолінів (піпемідієва кислота, норфлоксацин, офлоксацин, ципрофлоксацин та ломефлоксацин). Цей метод може бути внесений в аналітично нормативну документацію після проведення валідаційного процесу з відомим складом препарату за всіма фармакопейними вимогами.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". 1-е вид. Харків: РІПЕГ, 2001. — 556 с.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". 1-е вид. — Харків: РІПЕГ, 2001. — Доповнення 1 — 2004. — 520 с.
3. Технология и стандартизация лекарств. Сб. науч. трудов. -Харків: РІПЕГ, 1996. — 784 с.
4. Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of laws of the Member States relating to cosmetic products.//Official Journal L 262, 27/09/1976 — P.0169-0200.
5. Падейская Е. Н. Офлоксацин в терапии микобактериозов // Антибиотики и химиотерапия. — 1997. — №11. — С. 26-31.
6. Падейская Е. Н. Новое в проблеме фторхинолонов // Антибиотики и химиотерапия. — 1994. — №5.-С. 52-66.
7. Машковский М.Д. Лекарства двадцатого века — М.:Издательство Новая Волна", 1998. — 320 с.
8. Лопаткин И. А. Синюхин В. Н. Фармакокинетика пefлоксацина // Антибиотики и химиотерапия. — 1992. — №11.-С.40-42.
9. Яковлев В. П. Ципрофлоксацин высокоэффективный препарат из группы фторхинолов // Антибиотики и химиотерапия. — 1999. — №11-С. 69-71.
10. Легин Г. Я., Шехтман Н. М., Андреев В. М. Консервация косметических изделий и эффективные современные консерванты — М. : 1993. — Вып. 3. — С. 1-36.
11. Стискин Е.Л. Ицксон Л.Б. Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкосная хроматография — М.:Химия, 1986.- 205 с.
12. Хедтман Є., Кастер Т., Хроматография: практическое применение метода. — М.: Мир, 1986.-Ч.2.-335 с.
13. European Pharmacopoeia. Sixth Edition — Strasbourg : Council of Europe.-2008.- 3287 p.
14. The United States Pharmacopoeia. XXX Edition. — United States Pharmacopoeial Convention, Inc. — 2007.- 2249 p.
15. Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparation. Thirty second Report. (WHO technical report series, №823).- Geneva: World Health Organization. — 1992.- P. 14-79.
16. Van W., Kirkland J., Bly D. Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography. — N.Y.: J.Wiley. — 1979. — 476 p.
17. Драник Л. И. Мягкие лекарственные формы и вспомогательные для их производства // Фармация.- 1999.- №3 — С.45-47.

*А. Д. Дыль, А. Г. Минченко, К. Г. Виноградова*

### **РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО КОНТРОЛЯ НИЗКОТОКСИЧЕСКИХ КОНСЕРВАНТОВ ДЛЯ ПРЕПАРАТОВ С ДЕЙСТВУЮЩИМИ ВЕЩЕСТВАМИ ГРУППЫ ХИНОЛИНОВ**

Разработаны условия количественного определения содержания токсичных консервантов метилпарабена (нипагина) и пропилпарабена (нипазола) в лекарственных препаратах группы хинолинов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на примере ципрофлоксацина.

*O. D. Dyl, O. G. Minchenko, K. G. Vinogradova*

### **DEVELOPMENT OF THE QUANTITATIVE CONTROL METHOD FOR LOW TOXIC PRESERVATIVES IN DRUGS WITH THE REACTANTS OF QUINOLINE GROUP**

The conditions for quantitative determination of the toxic preservatives methylparaben (nipagin) and propylparaben (nipazol) in drugs of quinoline group by high performance liquid chromatography was developed.