

УДК: 547.461.8:616.53-002:54.062:638.135:543.544

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ ЕКСПРЕСНОЇ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТИ АЗЕЛАЇНОВОЇ У ГЕЛІ З ФЕНОЛЬНИМ ГІДРОФОБНИМ ПРЕПАРАТОМ ПРОПОЛІСУ

Бобро С. Г., Тихонов О. І., Штичак О. С., Блажеєвський М. Є.

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

АНОТАЦІЯ

У роботі наведені дослідження з розробки, опрацювання та валідації експресної методики кількісного визначення кислоти азелаїнової у гелі під умовною назвою «Прополіс» у поєднанні з фенольним гідрофобним препаратом прополісу методом обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії.

Хроматографічний аналіз здійснювали за допомогою мікроколункового рідинного хроматографу «Newlwt Paskard 1050 Agilent Technolog» (Germany). Автоматичний відбір проб забезпечували запрограмованим автосамплером. Обробку експериментальних даних проводили з використанням табличного процесора Excel програмного пакету Microsoft Office Professional 2003.

За запропонованих умов була перевірена лінійність залежності відгуку детектора від концентрації кислоти азелаїнової та побудовано графік залежності площі піку (Y) від вмісту кислоти азелаїнової у мг/мл.

Для з'ясування валідаційного показника «точність» методики хроматографували розчин робочого стандартного зразка кислоти азелаїнової, а за отриманими даними розраховували величину середнього значення вмісту визначеної кислоти азелаїнової у відсотках. Для перевірки «правильності» результатів методики було використано метод стандартних добавок та перевірено *відтворюваність* даної методики, що підтвердило *стабільність* і її *відтворюваність* у часі. Також досліджено *робасність* методики у рамках зміни складу рухомої фази, величини значення водневого показника (рН) рухомої фази, температури колонки та швидкості рухомої фази згідно вимог статті 2.2.46 Державної фармакопеї України 1.2 і 2.0.

До розробленої методики уведено норми для тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи» з метою підтвердження її працездатності та отримання правильних результатів при відтворенні результатів.

За результатами проведених досліджень методом високоефективної рідинної хроматографії було розроблено та опрацьовано просту і достатньо вибірково методику кількісного визначення кислоти азелаїнової у гелі, до складу якого входить фенольний гідрофобний препарат прополісу. За валідаційними показниками *специфічність*, *лінійність*, *точність*, *правильність*, *відтворюваність*, *стабільність* та *робасність* розроблену методику можна вважати валідною, яка може бути використана у фармацевтичному аналізі досліджуваного гелю на вміст кислоти азелаїнової.

Ключові слова: кислота азелаїнова, фенольний гідрофобний препарат прополісу, гель, кількісне визначення, хроматографія, вугрова хвороба.

Вступ.

На сьогоднішній день вугрова хвороба (акне) займає особливе місце в дерматологічній і косметологічній практиці. Актуальність проблеми вугрової хвороби для сучасної наукової та практичної медицини зумовлена значною поширеністю цього захворювання серед осіб молодого і середнього віку, хронічним перебігом, резистентністю до загальноприйнятої терапії, порушенням у пацієнтів психоемоційного статусу і соціальної адаптації. Більшість вітчизняних

і закордонних авторів вважають вугрову хворобу (ВХ) серйозною проблемою і розглядають її як порушення функціонування усього організму.

Для лікування акне досить часто застосовуються антибактеріальні засоби, тобто речовини, які пригнічують ріст бактерій на шкірі і в сальній залозі. Якщо звернути увагу на склад засобів від вугрової хвороби, то до більшості з них входить кислота азелаїнова (КА). Ця речовина проявляє комедонолітичну дію, тобто сприяє розрідженню шкірного сала, відлущує верхній шар епідермісу, проявляє протизапальну, антиоксидантну дію, нормалізує ліпідний бар'єр шкіри тощо. КА виконує важливі функції в обміні речовин організму людини, є незамінною при лікуванні таких захворювань шкіри лица, як акне та розацеа.

Кислота азелаїнова (КА) (код АТС D10AX03) представляє собою насичену двохосновну кислоту (1,7-гептандикарбонову кислоту, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$) і як активний фармацевтичний інгредієнт, що використовується у засобах для лікування вугрової хвороби. Вона утворюється в ході ліпідного обміну і міститься в організмі людини. Є не токсичною, не тератогенною та не мутагенною. КА «*in vivo*» та «*in vitro*» гальмує проліферацію кератиноцитів та нормалізує порушення процесів термінального диференціювання епідермісу під час виникнення акне (вугрової хвороби), прискорює комедолізис комедонів (вугрів). КА проявляє протизапальну дію шляхом інгібування клітинної оксиредуктази та пригнічення метаболізму у непрофільних гранулоцитах та генерування вільних радикалів, котрі є важливими факторами підтримування активності запального процесу. Частина КА виводиться нирками у незмінному вигляді, а частина – у вигляді дикарбонових C_5 та C_7 кислот, утворених з КА в результаті β -окиснення.

КА не є офіційною лікарською субстанцією, і тому існує відносно мало методик її визначення, описаних в літературних джерелах. Так, вміст основної речовини у субстанції можна визначати потенціометрично методом неводного титрування, наприклад, тетрабутил-амоній гідроксидом в середовищі піридину чи 2-пропанолу, або їх суміші з бензином [1], або втрет-бутанолі, ацетоні чи N,N-диметилформаміді [2].

Запропонована проста валідна методика кількісного визначення КА в лікарських препаратах методом неводного титрування натрій метоксидом у присутності тимолового синього [3]. У науковій літературі описані високочутливі екстракційно-фотометричні методики визначення КА в різноманітних об'єктах, в тому числі й у лікарських препаратах, наприклад, з метиленовим синім або метиленовим фіолетовим [4].

Для кількісного визначення КА в біологічних рідинах або багатокомпонентних лікарських та косметичних препаратах рекомендують застосовувати вибірковий метод рідинної хроматографії часто в поєднанні з передколонковою дериватизацією [5, 6, 7], газової хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням [8, 9, 10], або в поєднанні з твердофазовою екстракцією добутих дериватів та полуменево-іонізаційним детектуванням [11, 12]. Дериватизаційні методики є більш чутливими і дозволяють кількісно визначати малі концентрації КА. Оскільки терапевтичні препарати зазвичай містять КА порівняно у високих концентраціях (зазвичай 15-20 %) висока чутливість методу ВЕРХ не має практичного значення. Однак він дозволяє легко знаходити вміст КА у багатокомпонентних лікарських препаратах з достатньою точністю без додаткового застосування перед колонковою дериватизацією, як було продемонстровано у деяких працях [13].

Метою дослідження була розробка, опрацювання та валідація експресної методики кількісного визначення КА у лікарському засобі – гелі «Прополіс» в поєднанні з фенольним гідрофобним препаратом прополісу (ФГПП) [14] методом обернено-фазової ВЕРХ.

Експериментальна частина.

Усі розчини виготовляли об'ємно-ваговим методом з використанням аналітичних терезів АДВ-200 та посуду 2-го класу.

Випробовуваний розчин: близько 1,0 г (точна наважка) препарату поміщають у мірну колбу ємністю 50 мл, додають 20 мл рухомої фази, ретельно перемішують до отримання однорідної суміші, доводять об'єм розчину рухомою фазою до позначки, ретельно перемішують та центрифугують при швидкості обертання 7000 об/хв протягом 10 хв. При необхідності додатково фільтрують отриманий надосадковий розчин крізь тефлоновий мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Розчин порівняння: близько 0,08 г (точна наважка) робочого стандартного зразку КА поміщають у мірну колбу ємністю 50 мл, розчиняють у 20 мл рухомої фази (можливо застосування ультразвуку), доводять об'єм розчину рухомою фазою до позначки та перемішують. Фільтрують отриманий розчин через тефлоновий мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Рухома фаза: близько 1,0 г амонію ацетату поміщають у стакан місткістю 1000 мл, розчиняють у 500 мл води, додають 380 мл метанолу та доводять рН отриманого розчину до значення $4,5 \pm 0,1$ кислотою оцтовою льодяною потенціометрично. Розчин переносять у мірну колбу місткістю 1000 мл, доводять об'єм розчину до позначки водою та перемішують.

По 40 мкл розчину порівняння та випробовуваного розчину хроматографують на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором, отримуючи не менше 3 хроматограм у наступних умовах:

Колонка Spherisorb ODS2, розміром 250 мм × 4,6 мм, заповнена сорбентом з розміром часток 5 мкм або аналогічна;

Предколонка: Symmetry C18 60 мм × 4,6 мм, заповнена сорбентом з розміром часток 5 мкм або аналогічна;

Рухома фаза, дегазована зручним способом;

Температура термостату колонки 40,0 °С;

Швидкість рухомої фази 1,0 мл/хв;

Детектування за довжини хвилі 230 нм.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються наступні умови:

розрахована за піком КА ефективність хроматографічної системи має бути не менша 1000 тт;

фактор симетрії піку КА має бути не більшим 2,0;

відносне стандартне відхилення площ піків КА має відповідати вимогам п. 2.2.46 (ДФУ 1.2 та ДФУ 2.0).

Вміст КА у грамах в 1,0 г препарату розраховують за формулою:

$$Y = \frac{S \cdot m_0 \cdot 50 \cdot P}{S_0 \cdot 50 \cdot m \cdot 100} = \frac{S \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot m \cdot 100}$$

де: S – середнє значення площ піків КА розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків КА розраховане з хроматограм розчину порівняння;

m_0 – маса наважки СЗ КА, г;

P – вміст основної речовини у СЗ КА, %;

m – маса наважки препарату, у грамах.

Вміст КА в 1 г гелю має бути від 0,076 до 0,084 г.

Валідація методики визначення кислоти азелаїнової

Визначення *вмісту КА* у препараті пропонується здійснювати методом обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) за таких умов:

- колонка SpherisorbODS2, розміром 250 мм x 4,6 мм, заповнена сорбентом з розміром часток 5 мкм або інша аналогічна;
- передколонка: SymmetryC18 60 мм x 4,6 мм, заповнена сорбентом з розміром часток 5 мкм або інша аналогічна;
- рухома фаза, дегазована зручним способом;
- температура термостату колонки 40,0 °С;
- швидкість рухомої фази 1,0мл/хв;
- детектування СФМ за довжини хвилі 230 нм.

За таких умов пік КА достатньо уособлений від допоміжних компонентів гелю.

Специфічність методики підтверджена хроматографіями плацебо та КА (хроматограми наведено на рис. 1-3).

Показано, що на хроматограмі розчину плацебо відсутні піки з часом утримування, який співпадає з часом утримування КА.

Хроматографічний аналіз здійснювали на мікроколонковому рідинному хроматографі «Хроматограф Hewlett Packard 1050 Agilent Technolog» (Germany).

Автоматичний відбір проб забезпечували запрограмованим автосамплером.

Значення величини рН розчинів вимірювали методом прямої потенціометрії на лабораторному іонімірі И-130 (НПО «Аналітприбор») за допомогою скляного електроду типу ЭСЛ 43-07; як електрод порівняння використовували насичений калій хлоридом хлоридосрібний.

Обробку експериментальних даних проводили з використанням табличного процесора Excel програмного пакету Microsoft Office Professional 2013.

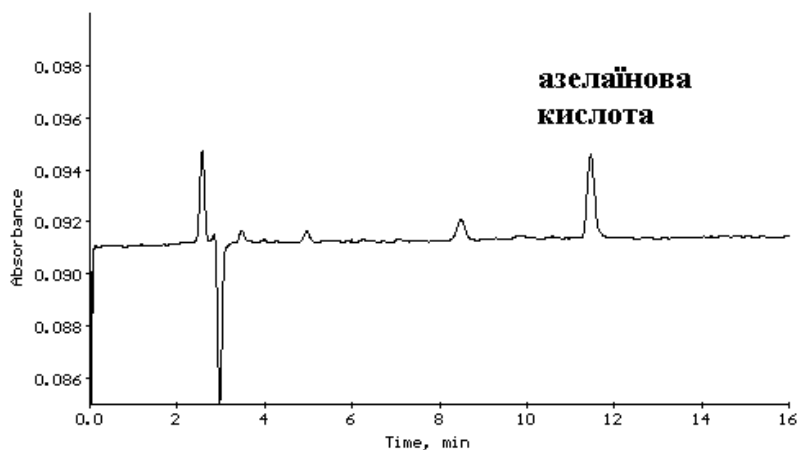


Рис. 1. Хроматограма розчину РСЗ КА

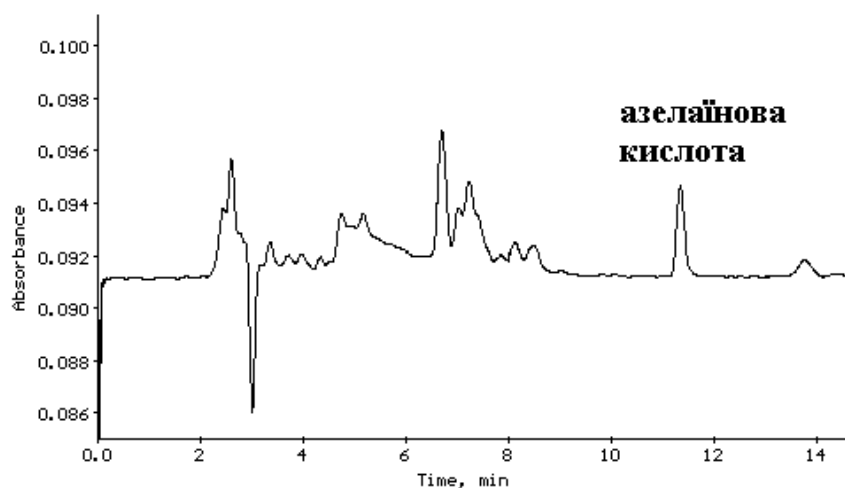


Рис. 2. Хроматограма випробовуваного розчину (препарату)

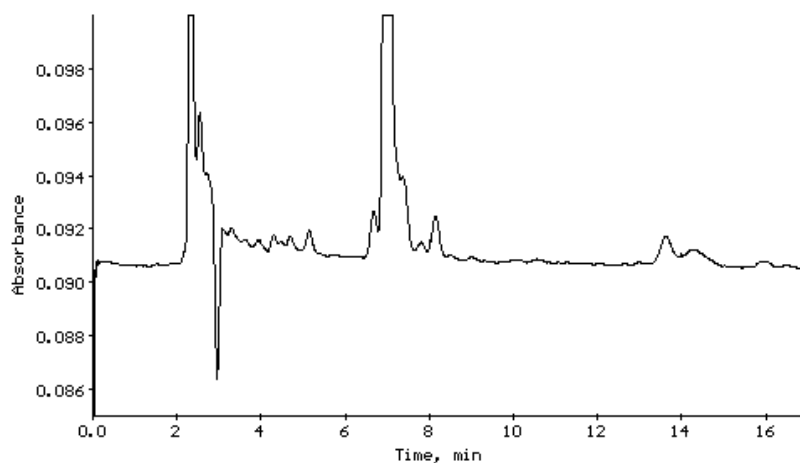


Рис. 3. Хроматограма розчину плацебо

За запропонованих умов була перевірена лінійність залежності відгуку детектора від концентрації КА. Для отримання даних пролінійної залежності готувались розчини КА, що містили у своєму складі 80 %, 90 %, 100 %, 110 % та 120 % від номінального складу.

Розчини хроматографували тричі. За отриманими даними був побудований графік залежності площі піку (Y) від вмісту КА у мг/мл (рис. 4).

Характеристики отриманої лінійної залежності ($Y=a+bX$) наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Характеристики лінійної залежності $Y=a+bX$

A	$-7 \cdot 10^3$
S_a	$1 \cdot 10^3$
B	$71.1 \cdot 10^2$
S_b	$0.7 \cdot 10^2$
R	0.9989
Межа детектування (МВ)	0.04 мг/мл
Межа кількісного визначення (МКВ)	0.12 мг/мл

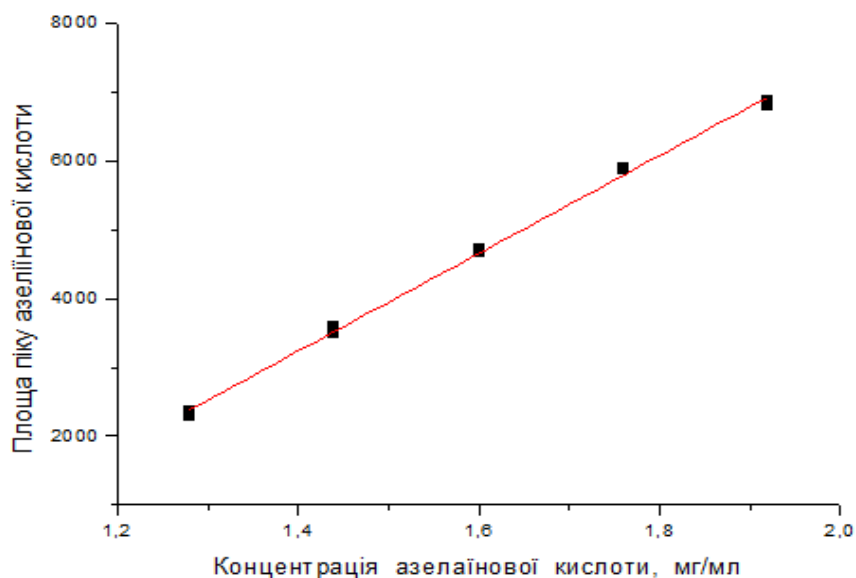


Рис. 4. Залежність відгуку детектора (площа піку) від концентрації КА

Для з'ясування валідаційного показника «точність» методики хроматографували розчин робочого стандартного зразка КА, а відтак за отриманими даними розраховували величину середнього значення вмісту визначеної КА у відсотках (табл. 2).

Таблиця 2.

Результати кількісного визначення кислоти азелаїнової у модельних розчинах РСЗ

Концентрація кислоти азелаїнової у розчині РСЗ, мг/мл	Знайдено кислоти азелаїнової, мкг/мл	Знайдено, %
1,200	1,205	100.42
1,350	1,353	100.23
1,500	1,499	99.94
1,650	1,647	99.83
1,800	1,796	99.77
Середнє значення		100.04
RDS, %		0.34

Для перевірки «правильності» результатів методики був використаний метод стандартних добавок. Отримані результати при здійсненні валідації методики за цим показником, наведені у табл. 3.

Таблиця 3.

Результати кількісного визначення КА у модельних розчинах без та з добавками КА

Добавка кислоти азелаїнової, мг	Знайдено кислоти азелаїнової, мг		Знайдено, %
	З добавкою	Без добавки	
–	–	1,65	–
0,40	2,00	1,60	97.2
0,80	2,53	1,73	104.6
1,20	2,90	1,70	102.8
1,60	3,24	1,64	99.1
Середнє значення			100,9

Також було перевірено відтворюваність методики. Кількісне визначення вмісту КА у випробуваному гелі було здійснене у різні дні. Отримані результати наведені у табл. 4.

Таблиця 4.

Результати кількісного визначення КА у модельних розчинах РСЗ КА у різні робочі дні

% від номінального вмісту	Збіжність середнє, % \pm RSD, %	Прецизійність (відтворюваність)		
		Середнє, % \pm RSD, %		
		День 1	День 2	День 3
80	100,2 \pm 0,1	100,05 \pm 0,09	100,3 \pm 0,2	100,11 \pm 0,06
100	100,03 \pm 0,08	99,98 \pm 0,05	100,2 \pm 0,3	99,9 \pm 0,1
120	100,2 \pm 0,2	100,0 \pm 0,3	99,95 \pm 0,05	100,1 \pm 0,1

Отримані дані показують, що методика є *стабільною* та *відтворюється* у часі.

Робасність методики було досліджено у рамках зміни складу рухомої фази, величини значення водневого показника (рН) рухомої фази, температури колонки та швидкості рухомої фази згідно вимог Державної фармакопеї України 1.2, стаття 2.2.46. Отримані результати для ефективності хроматографічної системи, асиметрії хроматографічного піку та значень RSD, котрі були розраховані для КА, свідчать, що незначні зміни у вищезазначених параметрах не чинять значимого впливу на хроматографічні характеристики методики. Методику можна вважати *робасною*.

До розробленої методики уведено норми для тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи» з метою підтвердження працездатності методики та отримання правильних результатів при відтворюванні методики.

Отже, нами опрацьована проста да достатньо вибіркова методика кількісного визначення КА в гелі, до складу якого входить ФГПП, методом високоефективної рідинної хроматографії. За валідаційними показниками *специфічність, лінійність, точність, правильність, відтворюваність, стабільність та робасність*; її можна вважати валідною, а відтак вона може бути використана у фармацевтичному аналізі гелю на вміст КА.

Висновки

1. Запропоновані умови, розроблена та опрацьована методика кількісного визначення КА у гелі з ФГПП методом обернено-фазової рідинної хроматографії (ВЕРХ) зі спектрофотометричним детектором.
2. Здійснена процедура валідації методики за показниками *специфічність, лінійність, точність, правильність, відтворюваність, стабільність та робасність*. Визначені *МВ та МКВ* КА у розробленому гелі «Прополіс».

Література

1. Turgut Gündüz Titrationsinnon-aqueousmedia. Part XII. Potentiometric titrations of symmetrical aliphatic dicarboxylic acids and some of their binary mixtures in different media/ Turgut Gündüz, Esma Kılıç, Güleren Özkan // *Analyst.* – 1988. – V. 113. – P. 1017-1021.
2. Aslan A. Potentiometric titration of some dicarboxylic acids in non - equeous media / A. Aslan, Y. Erdogan, A. Demirbas, S. Karslioglu // *Pharmazie.* – 1997. – V. 52, № 4. – P. 309 – 310.
3. Khazaeli P. Non-aqueoustitration for the determination of Azelaic Acid: Introduction and method validation/ P. Khazaeli, M. Keramati // *J. Kerman Univer. Med. Sci.* – 2004. – V. 11, № 3. – P. 5-8.
4. Kishore Medikundu. Spectrophotometric Determination of Azelaic Acid In Pharmaceutical Formulations / Medikundu Kishore, M. Jayaprakash, Reddy T. Vijayabhaskara // *J. Pharm. Res.* – 2010. – Vol. 3, № 12. – P. 3090-3092.
5. Ferioli V. Determination of azelaic acid in pharmaceuticals and cosmetics by RP-HPLC Cafterpre-column derivatization / V. Ferioli, C. Rustichelli, F. Vezzalini, G. Gamberini // *Il Farmaco.* – 1994. – V. 49, № 6. – P. 421-425.
6. Scalia S. Assay of underivatized azelaic acid in pharmaceutical and cosmetic products by HPLC / S. Scalia, A. Bianchi, S. Villani, M. Guarneri // *Pharmazie.* – 1997. – V. 52, №12. – P. 929-931.

7. Gatti R. Analysis of aliphatic dicarboxylic acids in pharmaceuticals and cosmetics by liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection / R. Gatti, V. Andrisano, A.M. Di Pietra, V. Cavrini // J. Pharm. Biomed. Analysis. – 1995. – V. 13, № 4–5. – P. 589–595.
8. Garelnabi M. Evaluation of agas chromatography method for azelaic acid determination in selected biological samples / M. Garelnabi, D. Litvinov, S. Parthasarathy // N. Amer. J. Med. Sci. – 2010. – V. 2, № 9. – P. 397-402.
9. Ma Y. Allelopathic potential of *Jatropha curcas* / Y. Ma, J. Chun, S. Wang, F. Chen // Afric J. Biotechnol. – 2011. – V.10, № 10. – P. 11932-11942.
10. Št'ávoová J. Limits of detections for the determination of mono- and dicarboxylic acids using gas-liquid chromatographic methods coupled with mass-spectrometry J. Št'ávoová, J. Beránek, E. P. Nelson, B. A. Diep, A. Kubátová // J. Chromatogr. B, Anal. Technol. Biomed. Life Sci. – 2010. V. 879, № 17-18. – P. 1429-1438.
11. Panavaitė D. A novel SPME fibre for fatty acid determination / D. A. Panavaitė, E. Adomavičiūtė, V. A. Vičkaškaitė // Chemija. – 2006. – V. 17, № 4. – P. 61-66.
12. Urbánek M. Determination of azelaic and sorbic acid in pharmaceuticals by capillary electrophoresis / M. Urbánek, M. Pospíšilová, M. Polášek, J. Šícha // Chromatogr. – 2002. – V. 55, № 5-6. – P. 333-337.
13. Mansour A. M. Simultaneous determination of azelaic and benzoic acids in topical preparations by liquid chromatography / A. M. Mansour, M. M. Ibrahim // Chromatographia. – 2002. – V. 55, № 7-8. – P. 435-437.
14. Бобро С.Г. Розробка складу і технології гелю на основі прополісу та кислоти азелаїнової для лікування вугрової хвороби : автореф. дис. на здобуття наук. ступ. канд. фарм. наук // С. Г. Бобро. – Х., 2017. – 26 с.

УДК: 547.461.8:616.53-002:54.062:638.135:543.544

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ЭКСПРЕССНОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИСЛОТЫ АЗЕЛАИНОВОЙ В ГЕЛЕ С ФЕНОЛЬНЫМ ГИДРОФОБНЫМ ПРЕПАРАТОМ ПРОПОЛИСА

Бобро С. Г., Тихонов А. И., Шпичак О. С., Блажеевский Н. Е.

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

АННОТАЦИЯ

В работе представлены исследования по разработке, обработке и валидации экспрессной методики количественного определения кислоты азелаиновой в геле под условным названием «Прополис» в сочетании с фенольным гидрофобным препаратом прополиса методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Хроматографический анализ осуществляли с помощью микроколоночного жидкостного хроматографа «Hewlett Packard 1050 Agilent Technology» (Germany). Автоматический отбор проб обеспечивали с помощью запрограммированного Автосамплера. Обработку экспериментальных данных проводили с использованием табличного процессора Excel программного пакета Microsoft Office Professional 2003.

По предложенным условиям была проверена линейность зависимости отклика детектора от концентрации кислоты азелаиновой и построен график зависимости площади пика (Y) от содержания кислоты азелаиновой в мг/мл.

Для подтверждения валидационного показателя «точность» методики хроматографировали раствор рабочего стандартного образца кислоты азелаиновой, а по полученным данным рассчитывали величину среднего значения содержания определенной кислоты азелаиновой в процентах. Для проверки «правильности» результатов методики был использован метод стандартных добавок и проведена воспроизводимость данной методики, что подтвердило ее стабильность и воспроизводимость во времени. Также исследована робастность методики в рамках изменения состава подвижной фазы, величины значения водородного показателя (pH)