

Опрацювання методик ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин лікувально-профілактичних засобів «Прополіс–Дерма»

Фролова О.Є.*, Тихонов О.І., Шпичак О.С.

*Державний Заклад «Луганський державний медичний університет»

МОЗ України, м. Рубіжне, Україна

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

shpychak.oleg@gmail.com

Вступ: В процесі розробки лікарських засобів, однією з важливих характеристик, що визначає контроль якості та впливає на їх стабільність є розробка та опрацювання методик ідентифікації і кількісного визначення діючих речовин. Враховуючи те, що найбільш раціональним методом визначення якісного складу та кількісного вмісту багатокomпонентних лікарських засобів є метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та завдяки можливості ідентифікувати і кількісно визначати в одній пробі речовини різного ступеня леткості, із застосуванням «ВЕРХ-аналізатора» на основі хроматографа «Міліхром А-02» нами було розроблено методику визначення кількісного вмісту діючих речовин фармацевтичних композицій «Прополіс-Дерма» («Прополіс–ПНГ», «Прополіс–ПСХ» та «Прополіс–ПХД») з протигрибковою, протимікробною і кератолітичною активністю, створених для лікування дерматомікозів, різнобарвного лишая, а також захворювань, спричинених дріжджеподібними грибами роду *Candida* [1-4].

Матеріали та методи: Об'єктами дослідження були такі зразки активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) лікувально-профілактичних засобів «Прополіс-Дерма»: *прополісу настойка* (Реєстраційне посвідчення № UA/5422/01/01, Наказ МОЗ України від 26.10.2011 р. № 700, ФС 42У-34-19-95, серія 10115) виробництва ПАТ «Вітаміни» (м. Умань, Україна); *нафтифіну гідрохлорид* ($C_{21}H_{21}N \cdot HCl$, USP-39, р. 4978-4979, серія B252564) виробництва «Сандоз Синтек Ілак Хаммаделер» (Турція) $w=99,92$ %; *хлорхінальдол* ($C_{10}H_7Cl_2NO$, Реєстраційне посвідчення № UA/12467/01/01, Наказ МОЗ України від 23.08.2012 р. № 658, серія 14/1143/F) виробництва фірми «All'chem S.A.S.» (Франція), заявник АТ «Лекхім-Харків» (м. Харків, Україна) $w=99,1$ %; *саліцилова кислота* ($C_7H_6O_3$, ДФУ 2.0, с. 581-582, серія S5670131), виробництва «Merck KGaA» (Німеччина) $w=99,6$ %; *хлоргексидину диглюконат 20 % розчин* ($C_{34}H_{54}Cl_2N_{10}O_{14}$, ЕРн 7.0., р. 1660-1662, серія А-150034, $w=100,0\%$) виробництва фірми «MEDICHEM, S.A.», Іспанія.

Із вищезазначених субстанцій нами було приготовлено експериментальні зразки лікувально-профілактичних засобів «Прополіс-Дерма» наступного складу: «Прополіс–ПНГ» (нафтифіну гідрохлорид – 0,1; прополісу настойки – 99,9); «Прополіс–ПСХ» (хлорхінальдолу – 0,5; прополісу настойки – 77,2; кислота саліцилової – 0,3; етанолу 96% – 22,0); «Прополіс–ПХД» (Хлоргексидину диглюконат розчин 20 % – 3,0; прополісу настойки – 72,0; етанолу 96% – 20,0; води очищеної – 5,0) [1, 3].

Готові розчини вводили в лікарські маркери за відпрацьованою технологією [4] та піддавали подальшим випробуванням.

Визначення виконували методом обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням мікроколоночного рідинного хроматографу «МІЛІХРОМ А-02» виробництва ЗАО «ЕкоНова», м. Новосибірськ. Розчини, що використовували для випробувань, готували масо-об'ємним методом із застосуванням аналітичних терез 2-го класу точності марки «RADWAG» виробництва компанії «RADWAG Wagi Elektroniczne» (м. Радом, Польща). Для виготовлення зразків розчинів фармацевтичних композицій «Прополіс–Дерма» як розчинники було використано прополісу настойку та етанол 96%. Ідентифікацію АФІ на хроматограмах досліджуваних засобів здійснювали методом зовнішнього стандарту. Як стандарти використовували робочі стандартні зразки субстанцій АФІ. У ході аналізу готували стандартні розчини субстанцій АФІ та проводили випробування аналогічно як із розчинами досліджуваних зразків препаратів. Для аналізу відбирали зразки по 2 мкл стандартних розчинів діючих речовин, розчинів фармацевтичних композицій «Прополіс–ПНГ», «Прополіс–ПСХ», «Прополіс–ПХД» та прополісу настойки і хроматографували на рідинному хроматографі з УФ-детектором, отримуючи не менше п'яти хроматограм.

За результатами випробувань придатності хроматографічної системи для виконання аналізу методом ВЕРХ встановлено, що система відповідає вимогам п. 2.2.46 «Методи хроматографічного розділення» (ДФУ 2.0, Том 1, с. 126-135) [5]. Далі проводили пробопідготовку для кожного лікувально-профілактичного засобу «Прополіс-Дерма». Отримані розчини фільтрували та аналізували.

З метою здійснення ідентифікації та кількісного визначення вмісту АФІ у складі фармацевтичних композицій «Прополіс–Дерма», перед проведенням випробувань, попередньо були зняті УФ-спектри діючих речовин на хроматографі «Міліхром А-02» в діапазоні інтервалу початок/кінець – від 190 до 362 нм, крок становив 2 нм.

Результати та їх обговорення: Для кількісного визначення вмісту нафтифіну гідрохлориду у препараті «Прополіс–ПНГ» за аналітичну обрано довжину хвилі 260 нм (максимум поглинання нафтифіну гідрохлориду в розчині РСЗ). Для кількісного визначення вмісту саліцилової кислоти у препараті «Прополіс–ПСХ» за аналітичну обрано довжину хвилі 240 нм (максимум поглинання саліцилової кислоти у розчині РСЗ). Для визначення кількісного вмісту хлорхінальдолу у препараті «Прополіс–ПСХ» було обрано довжину хвилі 250 нм (максимум на спектрі хлорхінальдолу). Для кількісного визначення вмісту хлоргексидину диглюконату у препараті «Прополіс–ПХД» за аналітичну обрано довжину хвилі, що відповідала максимуму поглинання хлоргексидину диглюконату в стандартному розчині 260 нм. Для перевірки правильності результатів кількісного визначення прополісу настойки, нафтифіну гідрохлориду, хлорхінальдолу, саліцилової кислоти та хлоргексидину диглюконату у фармацевтичних композиціях «Прополіс–Дерма» 75,0 мг РСЗ нафтифіну гідрохлориду розчиняли у 25,00 мл досліджуваного препарату «Прополіс–ПНГ» з наперед відомим вмістом нафтифіну гідрохлориду. Отриманий розчин розбавляли у 10 разів етанолом 80 %, хроматографували та розраховували концентрацію нафтифіну гідрохлориду.

При перевірці достовірності результатів кількісного визначення саліцилової кислоти і хлорхінальдолу у препараті «Прополіс–ПСХ» у 25,00 мл досліджуваного препарату розчиняли 60 мг (точна наважка) саліцилової кислоти і 65 мг (точна наважка) хлорхінальдолу. Отриманий розчин з концентрацією саліцилової кислоти 5,2 мг/мл і хлорхінальдолу 7,46 мг/мл розбавляли у 2 рази етанолом 96%, хроматографували та визначали концентрацію саліцилової кислоти і хлорхінальдолу у препараті з добавкою. При аналогічних випробуваннях для підтвердження правильності результатів кількісного визначення вмісту хлоргексидину диглюконату у препараті «Прополіс–ПХД» проводили наступним чином: у 25,00 мл досліджуваного препарату розчиняли 1,2 мл 20% розчину хлоргексидину диглюконату. Отриманий розчин з концентрацією 1,5% розбавляли у 10 разів етанолом 96%, хроматографували та визначали концентрацію хлоргексидину диглюконату у препараті з добавкою.

За результатами проведених експериментальних досліджень шляхом порівняння часів утримування та спектральних відношень отриманих піків була підтверджена присутність: у складі лікувально-профілактичного засобу «Прополіс–ПНГ» – нафтифіну гідрохлориду та прополісу настойки; у складі лікувально-профілактичного засобу «Прополіс–ПСХ» – хлорхінальдолу, саліцилової кислоти та прополісу настойки; у складі лікувально-профілактичного засобу «Прополіс–ПХД» – хлоргексидину диглюконату та прополісу настойки.

Проведені випробування дозволяють дійти висновку, що для ідентифікації діючих речовин у лікувально-профілактичних засобах «Прополіс–Дерма» («Прополіс–ПНГ», «Прополіс–ПСХ» та «Прополіс–ПХД») можливе використання однієї методики, оскільки, хоча час утримування АФІ – нафтифіну гідрохлориду, хлоргексидину диглюконату і хлорхінальдолу є приблизно однаковим, однак суттєво відрізняються за величинами їх спектральних відношень: максимум поглинання для нафтифіну гідрохлориду і хлоргексидину диглюконату становить 260 нм, для хлорхінальдолу – 250 нм, а саліцилова кислота надійно ідентифікується за часом утримування.

Результати експерименту свідчили про те, що за спектром нафтифіну гідрохлориду спостерігались характерні смуги з максимумами поглинання на рівні 224 нм, 254 нм; за спектром хлоргексидину диглюконату – на рівні 205 нм, 232 нм, 258 нм; за спектром саліцилової кислоти – на рівні 205 нм, 238 нм, 330 нм та за спектром хлорхінальдолу – на рівні 205 нм, 252 нм, 320 нм. Це є підтвердженням того, що враховуючи одержані спектри лікувально-профілактичних засобів препаратів «Прополіс–ПНГ», «Прополіс–ПСХ» та «Прополіс–ПХД», з метою створення єдиної методики необхідно вибирати такі наступні довжини хвиль: 240 нм, 250 нм, 260 нм, 270 нм, 280 нм, 300 нм. В результаті проведених випробувань нами було проведено кількісне визначення АФІ у складі розроблених нами фармацевтичних композицій «Прополіс–Дерма».

Отримані результати проведених досліджень дозволяють дійти висновку про придатність опрацьованих нами хроматографічних методик для здійснення

ідентифікації та кількісного визначення діючих речовин у досліджуваних препаратах «Прополіс–Дерма».

Експериментальні дані щодо відсоткового вмісту біологічно активних речовин фармацевтичних композицій «Прополіс – ПНГ», «Прополіс – ПСХ» та «Прополіс – ПХД» добре корелюються зі складом розроблених лікувально-профілактичних засобів та літературними даними відносно хімічної структури і складу вихідних субстанцій, а запропонована методика дає можливість незалежно від способу одержання та походження виробника діючих субстанцій провести стандартизацію складу досліджуваних препаратів «Прополіс-Дерма».

Проведений комплекс експериментальних досліджень дозволяє здійснювати стандартизацію складу розроблених нами лікувально-профілактичних засобів «Прополіс–ПНГ», «Прополіс–ПСХ» та «Прополіс–ПХД».

Висновки:

1. Запропоновані умови та показана можливість здійснення ідентифікації активних фармацевтичних інгредієнтів у фармацевтичних композиціях «Прополіс–Дерма» за даними хроматографічних (ВЕРХ) та спектральних параметрів.
2. Запропоновані умови, розроблена методика та показана можливість кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів у лікувально-профілактичних засобах «Прополіс–ПНГ», «Прополіс–ПСХ» та «Прополіс–ПХД» методом обернено-фазової ВЕРХ.
3. Методом добавок доведена достовірність (правильність) результатів кількісного визначення.

Література

1. Tikhonov O.I., Frolova O.E., Shpychak O.S. Creation of pharmaceutical compositions with the antifungal, antimicrobial and keratolytic activity // *Clinical Pharmacy*. – 2016. – Vol. 20, № 3. – P. 54-59.
2. Фролова О.Є., Гудзенко О.П., Тихонов О.І., Шпичак О.С. Дослідження протигрибкової, протимікробної і кератолітичної дії фармацевтичних композицій «Прополіс-Дерма» // *Український журнал клінічної та лабораторної медицини*. – 2016. – Том 11, № 3. – С. 77-80.
3. Пат. корисну модель № 122333 Україна, МПК⁵¹ А61К 31/14 (2006.01), А61К 35/644 (2015.01), А61Р 17/12 (2006.01), А61Р 31/10 (2006.01). Склад лікарського препарату протигрибкової, протимікробної та кератолітичної дії / Тихонов О. І., Шпичак О. С., Фролова О. Є.; заявник і патентовласник Тихонов О. І. – № u 201711173; заявл. 15.11.2017; опубл. 26.12.2017. – Бюл. № 24. – 5 с.
4. Frolova O.Ye., Tikhonov O.I., Shpychak O.S., Novikov S.M., Lenchin V.M. Development of the technology of vials-pencils for storage and application of medicated products on the skin and its appendages // *The Pharma Innovation Journal*. – 2016. – № 5(10). – P. 43-48.
5. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Х. : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.