

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ ВЭЖХ ДЛЯ АНАЛИЗА БЕНЗАЛКОНИЯ ХЛОРИДА В ГЛАЗНЫХ КАПЛЯХ С РАБОЧИМ НАЗВАНИЕМ «АКВАВИТ»

¹Жилякова Е.Т., ²Зинченко А.А., ¹Придачина Д.В., ¹Новиков О.О., ¹Новикова М.Ю.

¹ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»), Белгород, Россия (308015, г. Белгород, ул. Победы, 85), e-mail: Daria.Viktorovna@gmail.com

²ГП "Украинский научный Фармакопейный центр качества лекарственных средств" г. Харьков, Украина (61085, Харьков, ул. Астрономическая 33) Zinchenko@phukr.kharkov.ua

В статье представлены результаты разработанной методики анализа бензалкония хлорида методом ВЭЖХ. В рамках научно-исследовательской работы разработан многокомпонентный состав глазных капель для профилактики и лечения синдрома «сухого глаза» группы «искусственная слеза», с рабочим названием «АкваВит» с консервантом в составе. В качестве консерванта в глазные капли введен бензалкония хлорид в концентрации 0,01%. Разработанная методика качественного и количественного определения бензалкония хлорида в препарате, позволяет контролировать качество препарата. Проведена валидационная оценка методики количественного и качественного определения бензалкония хлорида, подтверждена линейность, прецизионность и правильность методики определения бензалкония хлорида методом ВЭЖХ в препарате в диапазоне применения от 80 % до 120 % от номинальных 100 % в препарате.

Ключевые слова: «искусственная слеза», синдром «сухого глаза», глазные капли, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), бензалкония хлорид

APPLICATION PROCEDURES FOR HPLC ANALYSIS BENZALCONIUM CHLORIDE IN EYE DROPS WITH THE WORKING TITLE «AquaVit»

¹Zhilyakova E.T., ²Zinchenko A.A., ¹Pridachina D.V., ¹Novikov O.O., ¹Novikova M.Y.

¹Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Professional Education "Belgorod State National Research University" ("BelSU"), Belgorod, Russia, (308015, Belgorod, street Pobedy 85), e-mail: Daria.Viktorovna@gmail.com

²State Enterprise "Ukrainian Scientific Center Pharmacopoeia Drug Quality", Kharkov, Ukraine (61085, Kharkov, ul.Astronomicheskaya 33) Zinchenko@phukr.kharkov.ua

The results of the developed method of analysis of benzalkonium chloride by HPLC. As part of the research work developed by a multi-component composition of eye drops for the prevention and treatment of the syndrome of "dry eye" of the "artificial tears", with the working title "Aquavit" with preservative. As a preservative in ophthalmic drops introduced benzalkonium chloride in a concentration of 0.01%. The developed method of qualitative and quantitative determination of benzalkonium chloride in the formulation allows the formulation to control the quality of the content in the preservative. Validation assessment procedures carried out quantitative and qualitative determination of benzalkonium chloride, confirmed linearity, precision and accuracy of methods of determination of benzalkonium chloride in the preparation of HPLC applications ranging from 80% to 120% of the nominal 100% in the preparation.

Keywords: «Artificial tears», sindrom «dry eye», eye drops, high performance liquid chromatography (HPLC), benzalkonium chloride

В рамках научно-исследовательской работы разработан многокомпонентный состав глазных капель для профилактики и лечения синдрома «сухого глаза» группы «искусственная слеза», с рабочим названием «АкваВит». На рисунке 1 представлены активные и вспомогательные вещества, входящие в состав глазных капель.

Капли глазные с рабочим названием «АкваВит»

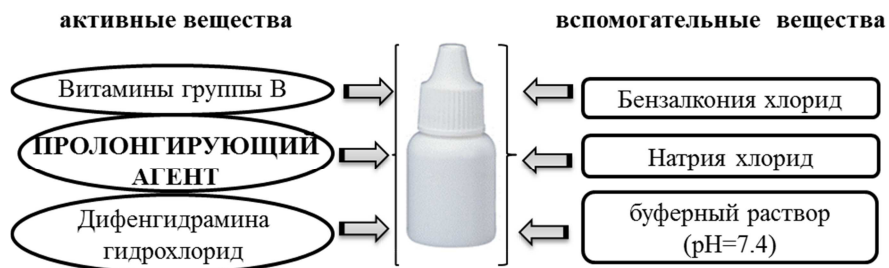


Рис.1. Состав глазных капель с рабочим названием «АкваВит»

Как показано на рисунке 1 в качестве активных веществ в состав разработанных глазных капель введены витамины группы В (пиридоксина гидрохлорида, цианокобаламин), дифенгидрамина гидрохлорид, раствор гидроксиэтилцеллюлозы выполняет роль пролонгирующего агента. В качестве вспомогательных веществ в состав глазных капель введены: натрия хлорид для достижения оптимального значения осмолярности (239 - 376 мОсм/л), глазные капли готовили на фосфатном буфером растворе (pH=7,4) [1,3].

Для глазных капель с рабочим названием «АкваВит» разработана технологическая схема производства с учетом современных тенденций развития фармацевтической промышленности, ориентированной на выпуск глазных капель в одноразовых тубик-капельницах по технологии «blow-fill-seal» («выдув-наполнение запайка»), которая позволяет исключить из состава консервант.

Разработана технологическая схема производства в «стеклянном» флаконе, с введением в качестве консерванта бензалкония хлорида в концентрации 0,01%.

Бензалкония хлорид является наиболее широко используемым консервантом в офтальмологических лекарственных препаратах, что связано с хорошей растворимостью в воде, широким спектром антимикробной активности[4]. Бензалкония хлорид является четвертичным аммониевым соединением [5]. Бензалкония хлорид является катионным поверхностно-активным веществом, способен снижать поверхностное натяжение раствора глазных капель, что является важным фактором при разработке офтальмологического препарата[2].

Целью данного исследования является разработка метода анализа консерванта в составе глазных капель.

Материалы и методы исследования

В основе разработанной методики идентификации и количественного определения бензалкония хлорида лежит использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Разработку анализа препарата проводили с использованием жидкостного хроматографа Shimadzu LC-20 Prominence, снабженного двумя насосами высокого давления LC-20AB, автосамплером SIL-20A, УФ-спектрофотометрическим детектором SPD-20AV, системным контролером CBM-20ALITE.

Для хроматографирования использовали аналитическую колонку стальную размером 150 мм x 4,6 мм, заполненную сорбентом «Discovery® C18», размер частиц 5 мкм (кат № 105962-01, Supelco).

Результаты исследования и их обсуждение

Объем вводимой пробы составил 20 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения бензалкония хлорида (Fluka, Дания), детекцию проводили спектрофотометрически при длине волны 220 нм. (скорость подвижной фазы – 0,8 мл/мин.; температура колонки - + 30оС).

Приготовление испытуемого раствора, растворов сравнения, подвижной фазы проводили согласно следующим методикам.

Приготовление испытуемого раствора 5,0 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

Полученный раствор фильтруют через фторопластовый фильтр с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 1,5 мл фильтрата. (10 мкг/мл)

Приготовление раствора сравнения бензалкония хлорида. Около 60 мг (точная навеска) бензалкония хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл воды, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают. 2,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводят объём раствора водой до метки и перемешивают.

Приготовление подвижной фазы. В мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, помещают 800 мл ацетонитрила, прибавляют 200 мл фосфатного буферного раствора рН 3,0 и перемешивают. Полученный раствор фильтруют под вакуумом через фторопластовый фильтр 0,45 мкм.

Количественное содержание бензалкония хлорида (X_{bc}), в миллиграммах в 1 мл, рассчитывают по формуле 1:

$$X_{bc} = \frac{(Sc_{12} + Sc_{14}) \times m_0 \times 2 \times 50 \times P}{(So_{c12} + So_{c14}) \times 5 \times 50 \times 200 \times 100} = \frac{(Sc_{12} + Sc_{14}) \times m_0 \times P}{(So_{c12} + So_{c14}) \times 50000} \quad (1)$$

где ($Sc_{12} + Sc_{14}$) – среднее значение суммы площадей пиков гомологов бензалкония C12 и C14 рассчитанное из хроматограмм испытуемого раствора; ($So_{c12} + So_{c14}$) - среднее значение суммы площадей пиков гомологов бензалкония C12 и C14 рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения бензалкония хлорида; m_0 – масса навески СО бензалкония

хлорида, в миллиграммах; Р – содержание бензалкония хлорида, в СО бензалкония хлорида, в процентах (90,54%).

Содержание бензалкония хлорида в 1 мл препарата должно быть от 0,085 мг до 0,115 мг.

Результаты считают достоверными, если выполняются следующие условия: эффективность хроматографической системы, рассчитанная по пику бензалкония хлорида гомолога С14, должна быть не менее 1000 теоретических тарелок, коэффициент разделения пиков бензалкония гомологов С12 и С14 должен быть не менее 3,0.

Количественное содержание бензалкония хлорида в испытуемом растворе препарата рассчитывают по величине суммы площадей пиков гомологов бензалкония С12 и С14 с учетом полученных хроматограмм стандартного образца исследуемого вещества (формула 1). Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты количественного определения бензалкония хлорида в испытуемых растворах препарата

№ испытуемого раствора	Суммы площадей пиков гомологов бензалкония С12 и С14 рассчитанное из хроматограмм испытуемого раствора препарата	Среднее значение суммы площадей пиков гомологов бензалкония С12 и С14 рассчитанное из хроматограмм испытуемого	Среднее значение суммы площадей пиков гомологов бензалкония С12 и С14 рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения бензалкония хлорида	Количественное содержание вещества в препарате (мг/мл)
1	279548	293802	328218	0,097
2	300928			
3	300931			

На рисунке 2 представлена хроматограмма раствора сравнения СО бензалкония хлорида, на рисунке 3 представлена хроматограмма испытуемого раствора препарата. Время удерживания пиков бензалкония хлорида (4,02 минуты и 6,25 минуты пики гомологов С12 и С14 соответственно) на хроматограммах испытуемого раствора препарата совпадает со временем удерживания пиков на хроматограммах раствора сравнения (4,06 минуты и 6,30 минуты пики гомологов С12 и С14 соответственно).

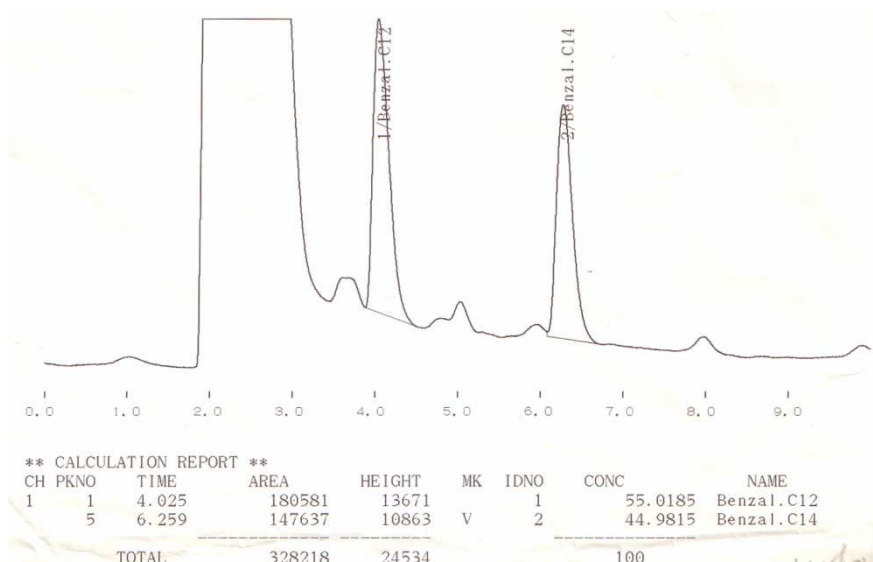


Рис. 2. Хроматограмма раствора сравнения СО бензалкония хлорида

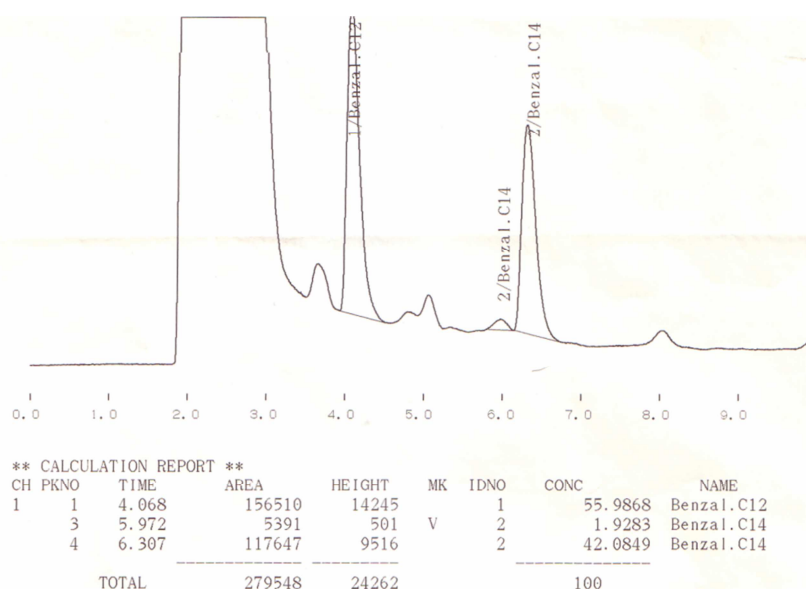


Рис. 3. Хроматограмма испытуемого раствора глазных капель

Выбранные условия хроматографирования позволяют отделить пики гомологов бензалкония хлорида (C12, C14) от системных пиков растворителя («бланка») и пиков вспомогательных веществ препарата и от пиков других действующих веществ. Полученные пики характеризуются достаточной интенсивностью и симметричностью, как показано на рисунке 2 и рисунке 3.

Заключение

Разработанная методика качественного и количественного определения бензалкония хлорида в препарате, позволяет контролировать качество препарата с содержанием в составе консерванта. Проведена валидационная оценка методики количественного и качественного определения бензалкония хлорида, подтверждена линейность, прецизионность и

правильность методики определения бензалкония хлорида методом ВЭЖХ в препарате в диапазоне применения от 80 % до 120 % от номинальных 100 % в препарате.

Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР. XI изд. Вып 1. М.: Медицина. 1987.
2. Технологии стандартизации лекарств [Текст]: сб. науч. тр.: в 2 т. / Гос. науч. центр лекарств. средств (ГНЦЛС) Госкоммедбиопротом ; ред.: В. П. Георгиевский, Ф. А. Конев. – Харьков: РИРЕГ, 1996-2000. – Т. 2. – Харьков, 2000. – 784 с.
3. United States Pharmacopeia 35th edition // United States Pharmacopeia Convention. Доступ по подписке. URL: <http://www.uspnf.com/uspnf/login>
4. De Saint Jean M., Brignole F., Bringuier A.F. et al. Effects of benzalkonium chloride on growth and survival of Chang conjunctival cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1999. – Vol. 40, № 3. – P. 619-630.
5. Patarca R., Fletcher M.A. Effects of benzalkonium salts on eukaryotic and microbial G-protein-mediated processes and surface membranes // Crit. Rev. Oncog. – 1995. – Vol. 6. – P. 327-356.

Рецензенты:

Дейнека В.И., д.х.н., профессор кафедры общей химии Национального исследовательского университета ГОУ ВПО «Белгородский государственный университет», г. Белгород.

Писарев Д.И., д.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии фармацевтического факультета медицинского института Национального исследовательского университета ГОУ ВПО «Белгородский государственный университет», г. Белгород.