

## ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ

УДК 543.544.5.068.7;615.074

СИРОТЧУК О.А.<sup>1,2</sup>, ДІДУХ І.Р.<sup>1</sup>, МАРКІН Р.О.<sup>1</sup>, ЗАЙЦЕВ В.М.<sup>2</sup>

### **ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАЦЕТАМОЛУ, ФЕНІЛПРОПАНОЛАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ, КОФЕЇНУ, ХЛОРФЕНІРАМІНУ МАЛЕАТУ В ЛІКАРСЬКОМУ ЗАСОБІ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ АЛКІЛЬНОЇ НЕРУХОМОЇ ФАЗИ З ІНКОРПОРОВАНОЮ ПОЛЯРНОЮ ВСТАВКОЮ НА СИЛІКАГЕЛІ**

*Розроблено і валідовано методику кількісного визначення парацетамолу, кофеїну, фенілпропаноламіну гідрохлориду та хлорфеніраміну малеату з використанням колонки Supelcosil LC-ABZ, яка містить інкорпоровану полярну вставку в алкільному ланцюзі прищепленому до силікагелю. Використання такої нерухомої фази дозволило уникнути використання йон-парних реагентів в рухомій фазі, які змінюють властивості нерухомої фази. Відсутність градієнтного елюювання скоротило тривалість хроматографування вдвічі. Менша гідрофобність колонки і особливості пробопідготовки дозволили знизити використання органічного компоненту в 10-20 раз порівняно з методиками фармакопеї США. Методику валідовано за такими параметрами: правильність, збіжність, внутрішньо лабораторна збіжність, лінійність та діапазон застосування, специфічність і робастність. Методика може бути використана для кількісного визначення активних компонентів протизастудного засобу.*

**Ключові слова:** парацетамол, фенілпропаноламін, кофеїн, хлорфенірамін, валідація

*Разработано и валидировано методику количественного определения парацетамола, кофеина, фенилпропаноламина гидрохлорида и хлорфенирамина малеата с использованием колонки Supelcosil LC-ABZ, которая содержит полярную вставку в алкильной цепи, привитой к силикагелю. Использование такой неподвижной фазы позволило избежать применения ион-парных реагентов в подвижной фазе, которые меняют свойства колонки. Отсутствие градиентного элюирования сократило время хроматографирования в два раза. Более низкая гидрофобность колонки и особенности пробоподготовки позволили снизить использование органического растворителя в 10-20 раз в сравнении с методиками фармакопеи США. Методика валидирована по таким параметрам: правильность, сходимость, внутрिलाбораторная сходимость, линейность и диапазон, специфичность и робастность. Методика может быть использована для количественного определения активных компонентов противопростудного препарата.*

**Ключевые слова:** парацетамол, фенілпропаноламін, кофеїн, хлорфенірамін, валідація

*A novel method of paracetamol, caffeine, phenylpropanolamine hydrochloride and chlorpheniramine maleate determination in common cold medical preparation has been developed and validated. Using embedded polar column Supelcosil LC-ABZ allowed us to avoid ion-pair agent in the mobile phase. The method in non-gradient and because of this it need twice less time than gradient methods. Embedded polar column and sampling allowed us 10-20 times to decrease organic solvent usage if compared to US pharmacopoeia methods. The method was validated with respect to linearity, precision, accuracy, selectivity, and robustness. The method was found to be*

applicable for routine analyzes (assays and stability tests) of paracetamol, caffeine, phenylpropanolamine hydrochloride and chlorpheniramine maleate.

**Keywords:** paracetamol, phenylpropanolamine, caffeine, chlorpheniramine, validation

### Вступ

В аналізі фармацевтичних препаратів хроматографіст часто має справу з комбінованими препаратами, до складу яких входять різні за полярністю і кислотно-основною природою сполуки. До багатокomпонентних препаратів належать і протизастудні засоби на основі парацетамолу. Зазвичай до складу такого засобу, окрім парацетамолу, входять кофеїн, фенілпропаноламін та хлорфеніраміну maleат.

Найбільш популярною хроматографічною фазою для визначення компонентів протизастудних засобів є силікагель модифікований октадецильними групами (C18). Розділення на таких фазах досягається внаслідок ряду механізмів утримування, зокрема дисперсійного, йон-обмінного та утворення водневих зв'язків з залишковими силанолами, різниці в стеричних параметрах молекул [1]. Визначення полярних сполук із застосуванням фаз C18 є проблематичним внаслідок слабого утримування. Для забезпечення утримування полярних компонентів лікарських препаратів в ряді методик фармакопеї США застосовують йон-парні реагенти – див. табл. 1 [2, 3, 4, 5].

**Таблиця 1**

**Огляд методик кількісного визначення компонентів протизастудних лікарських засобів**

Сполуки	Форма випуску	Метод	Умови хроматографування	Посилання
Хлорфеніраміну maleат, фенілпропаноламіну гідрохлорид	Капсули	ВЕРХ	Колонка: фенольна Рухома фаза: суміш метанолу і води (60:40, об./об.), що містить 0.34 г калію дигідрофосфату, 0.05 г триетиламіну, 0.025 г натрію додецилсульфату і 0.1 мл фосфорної кислоти на кожні 100 мл розчину.	[2]
Фенілпропаноламіну гідрохлорид	Капсули	ВЕРХ	Колонка: октадецильна Рухома фаза: (1.9 г натрію 1-гексансульфонату в 700 мг води, 50 мл 1 М натрію дигідрофосфату, 20 мл 0.25 Н триетиламонію фосфату до 1.0 л водою) – метанол = 100 – 82.	[3]
Парацетамол, хлорфеніраміну maleат, декстрометорфану гідробромід	Таблетки	ВЕРХ	Колонка: фенольна Рухома фаза: суміш метанолу і води (60:40, об./об.), що містить 0.34 г калію дигідрофосфату, 0.3 г триетиламіну, 0.15 г натрію додецилсульфату і 0.1 мл фосфорної кислоти на кожні 100 мл розчину.	[4]

*Продовження таблиці 1*

Сполуки	Форма випуску	Метод	Умови хроматографування	Посилання
Парацетамол, хлорфеніраміну maleат, декстрометорфан, фенілпропаноламіну гідрохлорид	Таблетки	ВЕРХ	Хлорфеніраміну maleат, фенілпропаноламіну гідрохлорид: Колонка: фенільна суміш метанолу і води (60:40, об./об.), що містить 0.34 г калію дигідрофосфату, 0.15 г триетиламіну, 0.25 г натрію додецилсульфату і 0.1 мл фосфорної кислоти на кожні 100 мл розчину. Парацетамол Колонка: октадецильна Рухома фаза: метанол: вода: оцтова кислота (69:28:3, об./об.).	[5]
Парацетамол, фенілпропаноламіну гідрохлорид, фенілефрин, хлорфеніраміну maleат	Капсули, саше	ВЕРХ	Колонка: Symmetry Shield RP-8 250-4.6 (5 мкм) Рухома фаза А: фосфатний буфер 40 mM з рН 6.0 і рухома фаза Б: ацетонітрил. Від початку до 8 хв лінійний градієнт від 8 % рухомої фази Б до 25 %. З 8 хв до 30 % рухомої фази Б на 5 хв, після 15 хв повернення до початкового співвідношення протягом 1 хв. До 20 хв урівноважується.	[7]
Парацетамол, Фенілпропаноламіну гідрохлорид, гуафенезин, Псевдоефедрину гідрохлорид, кофеїн, Хлорфеніраміну maleат, декстрометорфану гідрохлорид	таблетки	ГХ	Колонка : СVP1-M25-025 (25 м · 0.22 мм; 0.25 мм). Температурна програма 150 °С – 5 хв, Нагрівання до 175 °С з швидкістю 3 °С /хв, нагрівання до 270 °С з швидкістю 10 °С /хв.	[8]
Парацетамол, Кофеїн, Гуайфенезин і консерванти	Сироп	Міцелярна хроматографія	Колонка: Kromasil C18 Рухома фаза: 1-бутанол:вода(1:99, об./об.), що містить 0.04 М натрію додецилсульфат і 0.1 % трифтороцтову кислоту	[9]

Використання йон-парних реагентів має погану репутацію, оскільки для врівноваження системи необхідно більше часу, а властивості колонки змінюються безповоротно [6]. Окрім того, є ризик осадження йон-парного реагенту в капілярах хроматографічної системи. Альтернативою для розділення багатокомпонентних сумішей, що містять сполуки різної полярності, є використання градієнтного елюювання. Марін і інші показали, що розділення компонентів протизастудного засобу можливе з використанням градієнтного елюювання [7]. Проте, градієнтне елюювання є менш робастним, ніж

ізократичне, залежить від міксеру приладу, що використовується, від мертвого об'єму системи, а також потребує більшого часу проведення аналізу.

Описана в статті [8] методика визначення за допомогою методу газової хроматографії дозволяє розділити компоненти комбінованого лікарського засобу, але потребує більше ніж півгодини для отримання однієї хроматограми. Також використання методу газової хроматографії пов'язане з проблемами випаровування в лайнері і проблемами з правильністю результату, особливо при використанні капілярних методик.

Автори дослідження [9] використовують міцелярну хроматографію для розділення багатокомпонентного лікарського засобу. Але застосування даного методу (як і йон-парної хроматографії) пов'язано з використанням довголанцюгових поверхнево-активних речовин, наприклад натрію додецилсульфату, але в значно більшій концентрації, що призводить до змін властивостей колонки і несе загрозу хроматографічному обладнанню в разі осадження додецилсульфату в капілярах. Тому даний підхід також не є ідеальним для розділення багатокомпонентного лікарського препарату. Огляд методик кількісного визначення компонентів протизастудних лікарських засобів подано в таблиці 1.

Сучасним підходом до розділення складних сумішей є використання хроматографічних фаз, що можуть вступати в додаткові взаємодії з аналітами.

За останні роки комерційно доступними стали хроматографічні колонки, що містять полярну вставку в алкільному ланцюзі близько до поверхні силікагелю. Цими полярними вставками можуть бути амідні, карбаматні, уринові, етерні групи. Дослідження авторів [10] показали, що полярна вставка в ланцюзі екранує взаємодію органічних основ з залишковими силанолами поверхні на прикладі однієї з перших таких фаз - Suplex pKb-100. Suplex pKb-100 приготовано шляхом модифікування амінопропільних груп, прищеплених до поверхні, тому окрім алкільного ланцюга з полярною вставкою, на поверхні присутні залишкові аміногрупи. З одного боку, це надає фазі ортогональної селективності, але з іншого боку, така фаза з часом значно змінює свої властивості за рахунок утворення основ Шиффа з компонентами проби. Щоб мінімізувати вплив залишкових груп було застосовано процедуру ацилювання (ендкепінг) і отримано нову фазу, прикладом якої є Supelcosil ABZ. Згодом було розроблено нову генерацію таких хроматографічних фаз з використанням одностадійного процесу модифікування поверхні. Полярною групою таких хроматографічних колонок є карбаматна (Symmetry Shield RP-8, Symmetry Shield RP-18, Xterra RP-18). Присутність залишкових амінопропільних груп дозволяє відрізнити отриману в дві стадії хроматографічну фазу від одностадійної [11]. Колонки з полярною вставкою є менш гідрофобними порівняно з C18 на силікагелі (тип B) [12].

Інші автори зазначають, що для колонок з полярною вставкою характерна альтернативна селективність за рахунок йонного-обміну чи диполь-дипольних взаємодій з полярною групою, що містить атом нітрогену, органічні кислоти можуть мати більше утримування, а органічні основи менше утримування порівняно з C18 [13].

Внаслідок особливостей хімічної природи хроматографічних фаз з полярною вставкою було вирішено перевірити можливість їх застосування на реальних об'єктах, а саме для визначення активних компонентів комбінованого протизастудного лікарського засобу.

Метою даної роботи є розробка і валідація методики визначення активних компонентів протизастудного лікарського засобу, яка б відзначалася рядом важливих характеристик: ізократичне елюювання (дозволяє використовувати простіше і дешевше хроматографічне обладнання), відсутність йон-парних реагентів (дозволяє використовувати хроматографічну колонку для більшої кількості аналізів), малий час для отримання хроматограми (дозволяє проводити більшу кількість аналізів), використання невеликої кількості органічного модифікатора (екологічна безпека та економічна доцільність).

## *Експериментальна частина*

### **Матеріали і обладнання.**

Для приготування модельних розчинів було використано парацетамол (стандартний зразок Європейської фармакопеї), кофеїн (чистота 99.9 %, вторинний стандарт, Sigma-Aldrich), фенілпропаноламін гідрохлорид (чистота 100.0 %, вторинний стандарт), хлорфеніраміну малеат (чистота 99.6 %, вторинний стандарт, Sigma-Aldrich). Для приготування рухомої фази та розчинів для хроматографування було використано деіонізовану воду (Simplicity, Milli-Q, Millipore), ацетонітрил (HPLC grade, Sigma-Aldrich) та натрію дигідроген фосфат моногідрат (analytical grade, Merck), фосфорна кислота 85 % (analytical grade, Merck), натрію гідроксид (analytical grade, Merck).

Дослідження проведено на хроматографі HP 1100 (Agilent Technologies, Germany), обладнаному діодно-матричним детектором, чотирьохканальним насосом, дегазатором, термостатованим автоматичним пробовідбірником і термостатом колонок. Колонки – Symmetry C18 150-4.6 (5 мкм), Supelcosil LC-ABZ 150-4.6 (5 мкм), Symmetry RP-18 250-4.6 (5 мкм). Вимірювання рН рухомої фази проводили за допомогою рН-метра Merthrom 713. Спектральний модуль діодно-матричного детектора був використаний для перевірки спектральної чистоти піків і вибору довжини хвилі детектування (215 нм для фенілпропаноламіну, 280 нм для парацетамолу і кофеїну, 225 нм для хлорфеніраміну).

### **Приготування розчинів стандартних речовин.**

Вихідний розчин фенілпропаноламіну гідрохлориду і кофеїну: точна наважка 25.0 мг фенілпропаноламіну гідрохлориду і 30.0 мг кофеїну в 50 мл 0.02 М HCl.

Вихідний розчин хлорфеніраміну малеату: точна наважка 40.0 мг хлорфеніраміну малеату в 100 мл 0.02 М HCl.

Розчин стандартних речовин для хроматографічного розділення: до точної наважки 50.0 мг парацетамолу, додали 5.0 мл вихідного розчину фенілпропаноламіну гідрохлориду і кофеїну, додали 0.5 мл вихідного розчину хлорфеніраміну малеату і довели до мітки 0.02 М HCl в мірній колбі на 50 мл.

Розчин парацетамолу, кофеїну, фенілпропаноламіну: 20 мг парацетамолу, 20 мг кофеїну, 20 мг фенілпропаноламіну гідрохлориду в 100 мл 0.02 М HCl.

### **Приготування розчину зразку**

До точної наважки 320.0 мг порошку розтертих таблеток препарату Колдфлю, Дженом, Індія в мірній колбі на 250 мл, додали 100 мл 0.02 М HCl, обробили ультразвуком протягом 10 хв, і довели до мітки тим самим розчинником.

### **Приготування штучно деградованих розчинів для перевірки специфічності.**

Стресований розчин 1: до наважки близько 320.0 мг порошку таблеток в мірній колбі на 250 мл додали 5 мл 1 М розчину HCl, і залишили при кімнатній температурі на 12 годин. Потім додали 5 мл 1 Н розчину NaOH для нейтралізації і доведено до мітки за допомогою 0.02 М розчину HCl.

Стресований розчин 2: до наважки близько 320.0 мг порошку таблеток в мірній колбі на 250 мл додали 5 мл 1 М розчину NaOH, і залишили при кімнатній температурі на 12 годин. Потім додали 5 мл 1 Н HCl розчину для нейтралізації і доведено до мітки за допомогою 0.02 М розчину HCl.

Стресований розчин 3: до наважки близько 320.0 мг порошку таблеток в мірній колбі на 250 мл додали 5 мл 10 % розчину H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, і залишили при кімнатній температурі на 12 годин. Потім прокип'ятили для видалення залишків H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, і довели до мітки за допомогою 0.02 М розчину HCl.

### **Приготування розчинів для перевірки лінійності методики і діапазону застосування.**

Для перевірки лінійності застосування використано розчини з концентраціями 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 % від концентрації речовин згідно методики (1.0 мг/мл для парацетамолу, 0.06 мг/мл для кофеїну, 0.05 мг/мл для фенілпропаноламіну гідрохлориду, 0.004 мг/мл для хлорфеніраміну малеату).

### **Приготування розчинів для перевірки правильності методики.**

Кофеїн та фенілпропаноламіну гідрохлорид: 251 мг препарату + 0; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0 мл вихідного стандартного розчину фенілпропаноламіну та кофеїну в 250 мл 0.02 М НСІ.

Парацетамол: 251 мг препарату + 0; 25.0; 49.9; 75.4; 100.4 мг парацетамолу в 250 мл 0.02 М НСІ.

Хлорфеніраміну maleat: 251 мг препарату + 0; 0.25; 0.5; 0.75; 1.0 мл вихідного стандартного розчину хлорфеніламіну maleату в 250 мл 0.02 М НСІ.

### ***Результати і обговорення***

В процесі розробки методики було висунуто такі критерії: відсутність йон-парних реагентів в рухомій фазі; ізократичне елюювання; експресність; екологічність.

#### **Використання йон-парних реагентів**

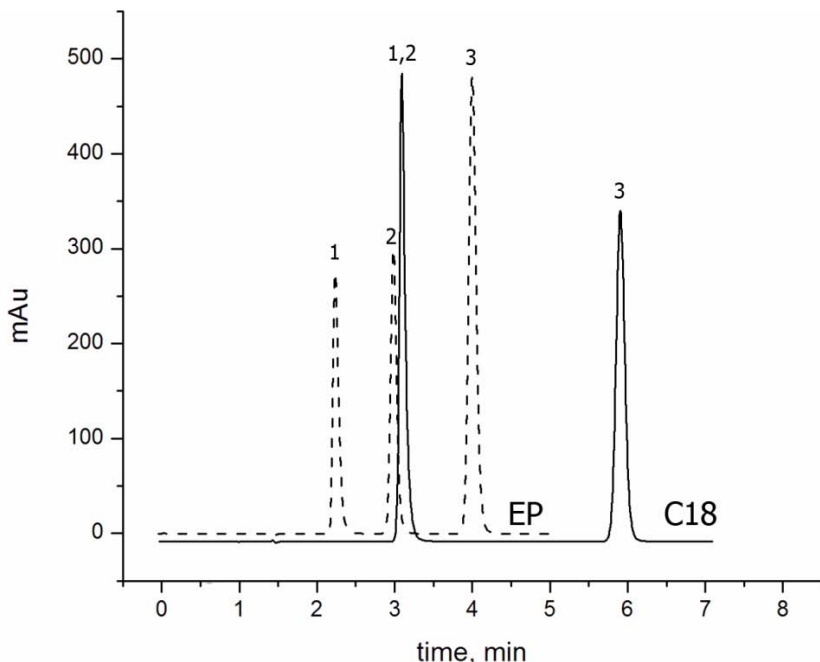
Властивості хроматографічної колонки залежать від властивостей не тільки прищепленої фази, а і від властивостей матеріалу, до якого фази прищеплено. Особливістю силікагелю є присутність залишкових силанолів на поверхні, які залежно від рН змінюють свій ступінь іонізації. Так, при рН близьких до 2 силаноли поверхні є неіонізованими. Це обумовлює можливість утримування за рахунок утворення водневих зв'язків. При рН близьких до 7 силаноли депротонуються і можуть вступати в йонну взаємодію з протилежно зарядженими аналітами. З одного боку, такі альтернативні взаємодії можуть бути корисними при розділенні сполук однакової гідрофобності, наприклад домішок, а з іншого боку – можуть зумовлювати неефективний та несиметричний пік для органічних основ. В останні роки технологію виготовлення силікагелю значно удосконалено, що дало змогу виробникам зробити підложку інертною. Це, в свою чергу, ускладнило розділення сполук однакової гідрофобності, адже вони розділялися за рахунок альтернативних взаємодій, а не власне дисперсійних з гідрофобним ланцюгом. Тому для розділення полярних сполук, які слабо утримуються на С18 і сполук однакової полярності, використовують йон-парні реагенти. Як альтернативу ми хочемо запропонувати використання хроматографічних фаз, які в привитій групі містять угруповання, що можуть вступати в альтернативні взаємодії. Такими хроматографічними фазами є фази, що містять алкільний ланцюг з інкорпорованою полярною групою. Так, колонка Supelcosil LC-ABZ містить амідну вставку -NH-CO-, що з'єднана пропільним спейсером з поверхнею кремнезему, а довжина алкільного залишку складає 14 ланок. Колонка Symmetry Shield RP-18 містить карбамідну вставку -O-CO-NH-, що з'єднана пропільним спейсером з поверхнею кремнезему, а довжина алкільного залишку складає 18 ланок [14].

Присутність полярної вставки в алкільному ланцюзі надає такій хроматографічній фазі ряд відмінностей від С18 нерухомої фази, а саме нижчу гідрофобність фази, альтернативні взаємодії з аналітами, покращення симетрії піку за рахунок екранування взаємодії з залишковими силанолами поверхні.

Перевірити можливості такої фази до розділення компонентів протизастудного препарату і порівняти з результатами, отриманими на С18, було вирішено на прикладі модельної суміші, що містить парацетамол, фенілпропаноламін та кофеїн (розчин парацетамолу, кофеїну, фенілпропаноламіну).

Для розділення компонентів модельної суміші використано водний сольовий компонент на основі натрію дигідроген фосфату (0,025 М розчин), рН = 4,5, а також органічний модифікатор – ацетонітрил при співвідношенні двох компонентів 90:10, швидкість потоку – 1,5 мл/хв, термостат при кімнатній температурі та довжина хвилі детектування 215 нм. Використання ацетонітрилу в якості модифікатору є зручним за рахунок невисокої, в порівнянні з метанолом або тетрагідрофураном, в'язкості водно-органічних сумішей, що дає можливість використовувати більшу швидкість потоку рухомої фази через колонку, а отже, зменшувати час хроматографування. Натрію дигідроген фосфат використано в якості модифікатору водного сольового компоненту для створення йонної

сили розчину. Особливість натрію гідроген фосфатних сольових розчинів в тому, що рН таких розчинів знаходиться посередині рекомендованого діапазону рН для нерухомих фаз на силікагелі (близько 4.5), що є більш “дружнім” для колонки. Крім того, цей розчин не потребує додаткових операцій з використанням рН-метра. Для хроматографування обрано дві популярні хроматографічні фази - Symmetry C18 та Supelcosil LC-ABZ (EP – embedded polar).



**Рис. 1.** Хроматограма модельної суміші, що містить 1 – фенілпропаноламін, 2 – парацетамол, 3 – кофеїн на колонках C18 (Symmetry C18) та EP (Supelcosil LC-ABZ). Рухома фаза – 0,025 М натрію дигідроген фосфат в воді : ацетонітрил = 90:10 (об./об.). 1 – фенілпропаноламін, 2 – парацетамол, 3 – кофеїн

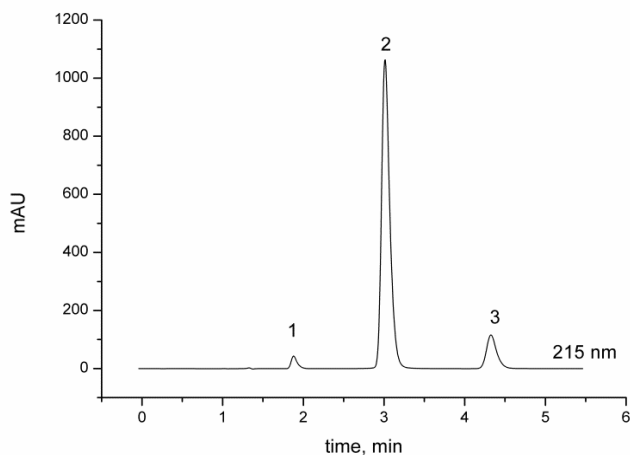
Як видно з рис. 1, елюювання піків парацетамолу та фенілпропаноламіну на колонці з нерухомою C18 відбувається одночасно. На колонці, що містить алкільні групи з полярною вставкою, компоненти розділяються, а для отримання хроматограми необхідно в півтора рази менше часу. Таким чином, колонка з полярною вставкою дає змогу відмовитися від використання йон-парних реагентів при розділенні компонентів протизастудного засобу, що містить парацетамол, кофеїн та фенілпропаноламіну гідрохлорид.

#### Ізократичне елюювання

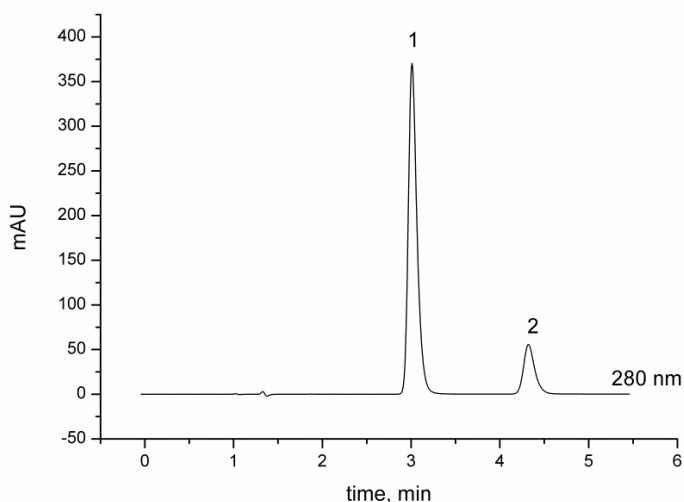
Хлорфенірамін є більш гідрофобним, тому хроматографістам доводиться використовувати градієнтне елюювання. Градієнтного елюювання можна уникнути шляхом використання двох хроматографічних систем з різним вмістом органічного компоненту, але однаковим водним буфером, що не призводить до ускладнення виконання аналізу при використанні двоканального насоса, який здатний змішувати компоненти в різних співвідношеннях.

Так, для парацетамолу, кофеїну та фенілпропаноламіну вміст органічного модифікатора 10 %, за якого компоненти добре відділені один від одного. Оскільки вміст цих компонентів значний, а саме 500 мг парацетамолу, 30 мг кофеїну та 25 мг фенілпропаноламіну гідрохлориду, то для того, щоб приготувати зразок в одне розведення і проводити його аналіз, було використано можливості автосамплера для вводу різних об’ємів проби. Для методики обрано інжекцію в кількості 5 мкл. Довжину хвилі детектування для кожної сполуки обрано з врахуванням можливостей діодно-матричного детектора. Для фенілпропаноламіну – 215 нм, з огляду на спектральні властивості речовини і рухомої фази,

для парацетамолу і кофеїну – 280 нм. Швидкість потоку – 1,5 мл/хв, а температура – 30 °С. Як видно з рис. 2 піки речовин відділені один від одного. При перевірці лінійності при 215 нм було виявлено, що вільний член калібровки для парацетамолу за значенням складає 10 % від площі піку парацетамолу на хроматограмі розчину стандартних речовин для хроматографування, а критерій прийнятності – не більше 2.0 % [17]. Тому для кількісного визначення парацетамолу і кофеїну було обрано детектування за довжини хвилі 280 нм.



**Рис. 2.** Хроматограма розчину стандартних речовин для хроматографування. Рухома фаза – 0,025 М натрію дигідроген фосфат в воді : ацетонітрил = 90:10 (об./об.). Детектування: 215 нм. 1 – фенілпропаноламіну гідрохлорид, 2 – парацетамол, 3 – кофеїн.

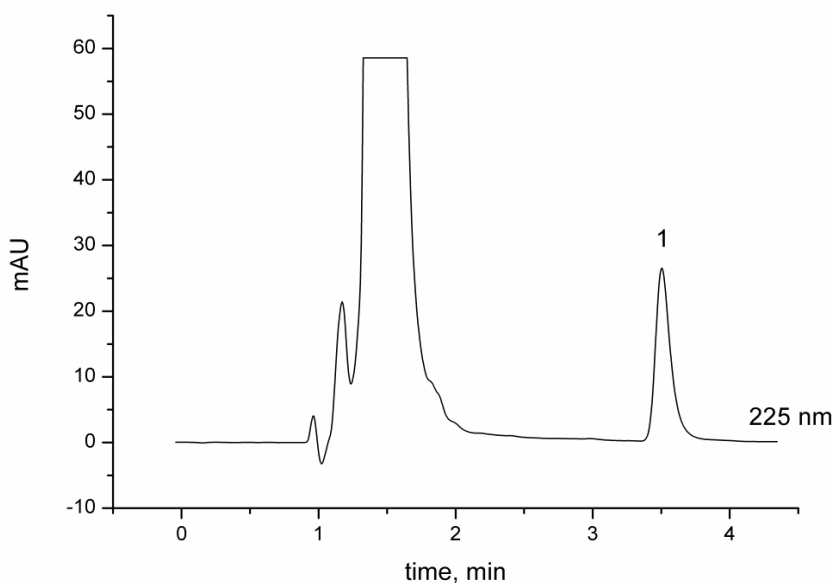


**Рис. 3.** Хроматограма розчину стандартних речовин для хроматографування. Рухома фаза – 0,025 М натрію дигідроген фосфат в воді : ацетонітрил = 90:10 (об./об.). Детектування: 280 нм. 1 – парацетамол, 2 – кофеїн.

Для хлорфеніраміну шляхом проб було обрано вміст ацетонітрилу в фазі у кількості 30 %. Цей компонент входить в препарат в меншій кількості, ніж інші компоненти, тому його інжектують в кількості 50 мкл. За допомогою діодно-матричного детектора обрано довжину хвилі детектування – 225 нм. Швидкість потоку і температура такі ж як і в методиці



для парацетамолу, кофеїну та фенілпропаноламіну гідрохлориду. Пік хлорфеніраміну чітко відділений від інших піків на хроматограмі рис. 4.



**Рис. 4.** Хроматограма розчину стандартних речовин для хроматографування. Рухома фаза – 0,025 М натрію дигідроген фосфат в воді : ацетонітрил = 70:30 (об./об.). Детектування: 225 нм. 1 – хлорфеніраміну малеат.

### **Експресність**

Для отримання хроматограми з піками парацетамолу, кофеїну, фенілпропаноламіну потрібно 5 хв, а для хлорфеніраміну – 4 хв, що в сумі дає 9 хв, тоді як при градієнтному елююванні [7] для отримання однієї хроматограми потрібно 20 хв. Таким чином, відмова від градієнтного елюювання дає змогу пришвидшити кількісне визначення вдвічі.

### **Екологічність**

Пробопідготовку було здійснено без використання органічного модифікатора. Всі компоненти екстраговані за допомогою 0.02 М HCl, що дозволило зменшити витрати органічних розчинників. Для підтвердження здійснимо деякі розрахунки. Якщо тривалість хроматографування 10 хв, швидкість потоку 1,5 мл/хв, а для проведення кількісного визначення однієї серії препарату необхідно отримати мінімально близько 9 хроматограм (по дві хроматограми двох паралельних розчинів стандартних розчинів і розчинів зразків приготованих, бланк), то на це використовується до 150 мл рухомої фази. Якщо підрахувати скільки витрачається розчинника на приготування розчинів зразків і стандартів у кількості двох паралельних, то на це піде більше 1 л розчинника, а це в 6 разів більше, ніж пішло власне на хроматографування. Тому, екологічність методики полягає не тільки в зменшенні частки органічного компоненту в рухомій фазі, а і в його відсутності в розчиннику для зразків. Тобто, для кількісного визначення однієї серії препарату за допомогою запропонованої методики необхідно витратити всього 30 мл ацетонітрилу (проведення пробопідготовки і хроматографування), в той час, як з цією ж метою, за однакових умов, потрібно витратити 700 мл метанолу за методикою фармакопеї США [2]. На нашу думку, все вищесказане підтверджує екологічність запропонованої методики.

### **Валідація методики**

Правильність, збіжність, внутрішньолабораторна збіжність, лінійність та діапазон застосування, специфічність і робасність перевірено в ході валідації.

Процедури і параметри, що використані для проведення валідації хроматографічної методики описано в фармакопеї США 37, розділ 1225 [15], у вказівках International Conference of Harmonization (ICH) [16] і в літературі [17-20].

### Специфічність

За відсутності домішок діючих речовин препарату зручним методом перевірки специфічності методики є дослідження штучно деградованих розчинів. Хроматографічні піки мають бути спектрально чисті з коефіцієнтом подібності більшим за 980. Хроматографічна чистота піку визначалася в оптичному діапазоні  $\pm 10$  нм від довжини хвилі детектування певної речовини. Всі піки виявлено спектрально чистими – див. табл. 2.

Таблиця 2

### Результати дослідження спектральної чистоти штучно деградованих розчинів

Діюча речовина препарату	1 Н HCl	1 Н NaOH	10 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Фенілпропаноламін	999.6	998.9	999.9
Парацетамол	999.3	999.5	999.1
Кофеїн	999.9	999.1	999.7
Хлорфенірамін	999.1	999.4	999.3

### Робасність

Для дослідження робасності методики перевіряли спектральну чистоту хроматографічних піків за умови зміни одного параметру хроматографічної системи. Критерії прийнятності використані ті, що і для дослідження специфічності. Розчин для хроматографування отримано шляхом змішування штучно деградованих розчинів у пропорції 1:1:1. Параметри хроматографічної системи, що змінювалися: процент органічного компоненту ( $\pm 2$  %); рН сольового компоненту рухомої фази ( $\pm 0.2$  одиниць); температура колонки ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ); швидкість потоку ( $\pm 10$  %); концентрація солі ( $\pm 10$  %).

Коефіцієнт подібності для хроматографічних піків всіх речовин отримано більшим за 990. Крім того, в пункті «Внутрішньолабораторна збіжність» показано, що методика робасна при зміні нерухомої фази отриманої двома стадіями модифікування (Supelcosil LC-ABZ) на одностадійну (Symmetry Shield RP-18).

### Лінійність і діапазон застосування

П'ять розчинів з концентраціями в діапазоні 80 – 120 % від концентрацій методики було введено в хроматографічну систему. В таблиці наведено результати статистичної обробки лінійної калібрувальної прямої  $y=a+bx$ . Для розрахунку межі виявлення використано формулу  $3.3*SD/b$ , а для розрахунку межі кількісного визначення використано формулу  $10*SD/b$ , де  $b$  – нахил калібрувального графіку, а  $SD$  – стандартне відхилення значень вільного члена калібрувального графіку. Результати – див. табл. 3.

### Збіжність

Збіжність було перевірено шляхом кількісного визначення кожного компоненту в шести пробах з концентрацією 100 % (1.0 мл/мл для парацетамолу (ПЦ), 0.06 мг/мл для кофеїну (КФ), 0.05 мг/мл для фенілпропаноламіну гідрохлориду (ФПА), 0.004 мг/мл для хлорфеніраміну малеату (ХФМ) та визначено відносно стандартне відхилення (RSD) з отриманих результатів.

Для перевірки придатності використано такі параметри хроматографічної системи: коефіцієнт симетрії  $As=w0.05/2d$ , де  $w0.05$  – ширина піка на одній двадцятій висоті піка, а  $d$  – відстань між перпендикуляром, опущеним з максимуму піка, і передньою межею піка на одній двадцятій висоті, ефективність, кількість теоретичних тарілок (т.т.)  $N = 5.54 tR^2/wh^2$ , де  $tR$  – час утримування,  $wh$  – ширина піку на половині висоти.

Таблиця 3

## Результати дослідження лінійності методики

Показник	Діюча речовина препарату				Критерій [17]
	фенілпропанол-амін	парацетамол	кофеїн	хлорфенір-амін	
Діапазон лінійності, мг/мл	39.5 – 59.3	812 – 1206	51.2 – 76.7	3.2 – 4.8	
Межа кількісного визначення, мкг/мл	9.6	67.5	6.6	0.5	
Межа виявлення, мкг/мл	3.2	22.3	2.2	0.2	
Вільний член(Y-intersept)	3.4	33.1	9.5	0.2	≤ 2*SD
Стандартне відхилення вільного члена(SD)	4.4	17.1	5.1	2.5	
Вільний член/площа St100 %, %	1.5	1.3	1.9	0.1	≤ 2.0 %
Δ a	27.0	106.1	31.7	15.8	
Нахил (b)	4534.4	2534.0	7758.5	48250.0	
Стандартне відхилення нахилу(SD(b))	87.5	16.9	79.2	629.2	
Коефіцієнт регресії	0.9989	0.9999	0.9997	0.9995	≥ 0.998

## Внутрішньолабораторна збіжність

Для кількісного визначення компонентів в 6 пробах двоє аналітиків використовували різне хроматографічне обладнання в різні дні та різні хроматографічні колонки – Supelcosil LC-ABZ та Symmetry Shield RP-18. Результати дослідження – див. табл. 4. Різниця між результатами кількісного визначення складала 0.3 % для парацетамолу, 1.8 % для фенілпропаноламіну гідрохлориду, 0.9 % для хлорфеніраміну малеату, 0.4 % для кофеїну.

Таблиця 4

## Придатність і прецизійність хроматографічної системи

Характеристика	Параметр	ФПА	ПЦ	КФ	ХФАМ	Критерій придатності [17]
Придатність системи						
	Коефіцієнт симетрії	1.22	1.22	1.15	1.45	0.8-2.0
	Ефективність	5924 т.т.	6458 т.т.	7851 т.т.	5234 т.т.	≥ 3000 т.т.
	RSD (площа) <sup>a</sup>	0.17	0.24	0.21	0.31	≤ 1.0 %
Збіжність						
Аналітик 1	RSD (площа) <sup>b</sup>	0.3	0.4	1.0	1.7	≤ 2.0 %
Аналітик 2	RSD (площа) <sup>b</sup>	0.7	0.5	0.7	0.9	≤ 2.0 %
Аналітик 1-2	RSD (площа) <sup>b</sup>	1.3	0.5	1.1	1.5	≤ 2.0 %

<sup>a</sup> n=5<sup>b</sup> n=6

### Правильність

Для доведення правильності за умови відсутності плацебо препарату було використано метод добавок. Результати наведено в табл. 5.

Таблиця 5

### Результати дослідження правильності методики

Діюча речовина препарату	Введено, мг	Знайдено, мг		Recovery, %
		з добавкою	без добавки	
ПЦ	0		192.9	
	25.0	217.7	192.7	99.8
	49.9	244.0	194.1	100.6
	75.4	269.0	193.6	100.4
	100.4	294.3	193.9	100.5
ФПА	0		9.70	
	1.35	11.17	9.82	101.2
	2.69	12.53	9.84	101.4
	4.04	13.83	9.79	100.9
	5.58	15.17	9.59	98.9
КФ	0		11.83	
	1.47	13.09	11.62	98.2
	2.95	14.60	11.65	98.5
	4.42	16.35	11.93	100.8
	5.89	17.63	11.74	99.2
ХФАМ	0		0.80	
	0.10	0.90	0.80	100.0
	0.21	1.01	0.80	100.0
	0.31	1.10	0.79	98.8
	0.41	1.22	0.81	102.3

### Стабільність розчинів

Розчин зразку і розчин стандартних речовин для хроматографічного розділення були інжектвані в хроматографічну систему одразу після приготування, через добу і через дві доби після приготування і зберіганні в холодильнику. Результати досліджень наведено в табл. 6.

Розчини виявилися стабільними протягом двох діб при зберіганні за 6 °С. Критерій прийнятності – зміна площі піків не більше  $\pm 2.0$  % [17].

### Кількісне визначення активних компонентів протизастудного лікарського засобу

Методика була використана для кількісного визначення активних компонентів лікарського засобу Колдфлю, Дженом, Індія. Отримано такі результати:  $100.4 \pm 0.4$  % парацетамолу,  $100.8 \pm 0.8$  % для фенілпропаноламіну,  $102.3 \pm 1.0$  % для кофеїну та  $101.4 \pm 0.9$  % для хлорфеніраміну maleату.

## Дослідження стабільності розчинів

Розчин стандартних речовин	Умови експерименту (температура, тривалість)		Розчин зразку	Умови експерименту (температура, тривалість)	
	6 °C, 24 год.	6 °C, 48 год.		6 °C, 24 год.	6 °C, 48 год.
ФПА	-0.4 %	-0.5 %	ФПА	-0.4 %	-0.4 %
ПЦ	-0.5 %	-0.4 %	ПЦ	-0.5 %	-0.6 %
КФ	-0.2 %	-0.1 %	КФ	-0.6 %	-0.6 %
ХФАМ	0.0 %	-0.2 %	ХФАМ	-0.1 %	-0.3 %

**Висновки**

Розроблено методику аналізу для кількісного визначення парацетамолу, фенілпропаноламіну, кофеїну та хлорфеніраміну малеату в протизастудному засобі, яка не передбачає використання йон-парних реагентів для розділення полярних сполук та отримання ефективного і симетричного піку. Для кількісного визначення всіх компонентів потрібно вдвічі менше часу, ніж у випадку застосування методики з використанням градієнтного елюювання. Кількість органічного компоненту, що використовується для проведення аналізу, зменшено в 10-20 разів у порівнянні з методиками фармакопеї США. Результати валідації показали специфічність, лінійність, правильність та прецизійність розробленої методики. Методика може бути використана для кількісного визначення активних компонентів протизастудного засобу.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. *Snyder L.R., Dolan J.W., Carr P.W.* The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity // *Journal of Chromatography*. – 2004. – V. 1060. – P. 77-116.
2. USP 37-NF 32. Chlorpheniramine Maleate and Phenylpropanolamine Hydrochloride Extended-Release Capsules.
3. USP 37-NF 32. Phenylpropanolamine hydrochloride Extended-Release Capsules.
4. USP 37-NF 32. Acetaminophen, Chlorpheniramine Maleate, and Dextromethorphan Hydrobromide Tablets.
5. USP 37-NF 32. Oral Solution Containing at Least Three of the Following-Acetaminophen and Salts of Chlorpheniramine, Dextromethorphan, and Phenylpropanolamine.
6. *Dolan J.W.* Ion Pairing - Blessing or Curse? // *LCGC*. – 2008. – V. 25. – Is. 2.
7. *Marin A., Garcia E., Garcia A., Barbas C.* Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2002 – V. 22. – P. 701-714.
8. *Harsono T., Yuwono M., Indrayanto G.* Simultaneous Determination of Some Active Ingredients in Cough and Cold Preparations by Gas Chromatography, and Method Validation // *Journal of AOAC international*. – 2005. – V. 88, № 4. – P. 1093-1098.
9. *Kulikov A., Verushkin A.* Simultaneous Determination of Paracetamol, Caffeine, Guaifenesin and Preservatives in Syrups by Micellar LC // *Chromatographia*. – 2008. – V.67. – P. 347-355.
10. *Ascah T., Feibush B.* Novel, highly deactivated reversed-phase for basic compounds // *Journal of Chromatography A*. – 1990. – V. 506. – P. 357-369.
11. *Euerby M., Petersson P.* Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing polar embedded

- groups/amino endcappings using principal component analysis // Journal of Chromatography A. – 2005. – V. 1088. – P. 1-15.
12. **Wilson N., Gilroy J., Dolan J., Snyder L.** Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography VI. Columns with embedded or end-capping polar groups // Journal of Chromatography A. – 2004. – V. 1026. – P. 91-100.
  13. **Layne J.** Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases // Journal of Chromatography A. – 2002. – V. 957 – P. 149-164.
  14. **Neue U., Cheng Y., Lu Z., Alden B., Iraneta R., Phoebe C., Van Tran K.** Properties of Reversed Phase Packings with an Embedded Polar Group // Chromatographia. – 2001. – V. 54. – P. 169-177.
  15. USP 36 General Information /1225. Validation of Compendial Procedures. – 5 c. USP 37–NF 32. Validation and verification of compendial procedures <1225> .
  16. ICH Harmonised tripartite guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). – Geneva, Switzerland, 2005. – 13 c.
  17. **Shabir G.A.** Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization // J. Chromatogr. A. – 2003. – V. 987. – P. 57-66.
  18. **Shabir G. A.** Systematic Strategies in High-Performance Liquid Chromatography Method Development and Validation Separation // Science and Technology. – 2010. – V. 45. – P. 670-680.
  19. **Vander Heyden Y., Nijhuis A., Smeyers-Verbeke J., Vandeginste B.G.M, Massart D.L.** Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2001. – V. 24. – P. 723-753.
  20. **Gonzalez A. G., Herrador M. A.** A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, Trends in Analytical Chemistry – 2007. – V. 26. – P. 227-238.

<sup>1</sup>Центральна лабораторія з аналізу якості лікарських засобів та медичної продукції, м. Київ

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ

Надійшло до редакції  
2.06.2014