УДК 615.451.35:582.99.15:543.544:547.262

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТАНОЛА В КОМБИНИРОВАННОМ СПРЕЕ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

[1]Сушинская О. А., [2]Феськова Е. В., [1]Голяк Н. С.

[1] Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь;
[2] Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. В статье представлены результаты разработки и валидации методики количественного определения этанола в комбинированном спрее, содержащем ибупрофен и жидкий экстракт полыни горькой, методом газожидкостной хроматографии. Оптимальные условия хроматографирования были подобраны для колонки DB-FFAP (60 м × 0,53 мм × 1,0 мкм) фирмы Agilent Technologies. Валидацию методики проводили в соответствии с фармакопейными требованиями и Руководством по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств Евразийского экономического союза. По результатам количественного определения среднее содержание этанола в комбинированном спрее 3 серий составило (49,9±0,1) %. Доказана специфичность и линейность методики. Предложенная методика является точной и прецизионной в пределах диапазона применения. Все исследуемые валидационные критерии соответствовали критериям приемлемости. Полученные результаты позволяют рассматривать предложенную методику для количественного определения этанола в комбинированном спрее наружного применения.

Ключевые слова: полынь горькая, жидкий экстракт, спрей, газовая хроматография, этанол, валидация.

Введение. В ходе фармацевтической разработки лекарственного препарата обязательным этапом является проведение его стандартизации. Для стандартизации жидких лекарственных форм наружного применения основными показателями качества являются описание, идентификация, количественное определение действующих веществ, pH, относительная плотность, а также

определение содержания органических растворителей при их использовании, например этанола (класс токсичности 3).

В соответствии с фармакопейными требованиями для определения этанола в жидких лекарственных препаратах рекомендован метод дистилляции и газовой хроматографии.

Наиболее точным, быстрым и чувствительным методом является газовая хроматография [1, 2].

Цель работы – разработка и валидация методики количественного определения этанола в комбинированном спрее методом газовой хроматографии.

Работа выполнена в рамках задания 2.2.3 «Получить и стандартизировать экстракционные лекарственные формы с повышенным содержанием биологически активных веществ» подпрограммы 2.2 «Синтез и направленное модифицирование регуляторов биопроцессов (Биорегуляторы)» государственной программы научных исследований 2 «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия» (№ ГР 20220401).

Материалы и методы. Объектом исследования являлся комбинированный спрей для наружного применения противовоспалительного действия, содержащий ибупрофен и жидкий экстракт полыни горькой 1 : 1. В качестве растворителя для субстанции ибупрофена использован этанол 96 % (ОАО «Бобруйский завод биотехнологий», марка «Экстра М», ТУ BY 700068910.014-2005). Жидкий экстракт полыни горькой получен с использованием 70%-ного этанола в качестве экстрагента. В качестве вспомогательных веществ в состав спрея также входили макрогол 400, поливинилпироллидон и вода очищенная. Для проведения анализа использовали бутанол-1 (АО «Экос-1», РФ), метанол (Carlo Erba, Франция) и пропанол-1 (PanReac Applichem, Германия). Основные условия хроматографирования приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Условия проведения хроматографирования

Параметр	Значение
Хроматограф	«Agilent 7820 A» (Agilent Technologies, США)
Колонка	Капиллярная колонка DB-FFAP размером 60 м × 0,53 мм с толщиной неподвижной фазы 1,0 мкм (полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталевой кислотой)
Детектор	Пламенно-ионизационный
Газ-носитель и его скорость	Гелий для хроматографии; 4,1 мл/мин
Сброс	20 : 1
Температура испарителя/температура детектора/температура термостата колонки	180 °С / 230 °С/ начальная 60 °С (выдержка 1 минута), подъем температуры со скоростью 4 °С/мин до 105 °С (выдержка 2 минуты)
Объем вводимой пробы	0,4 мкл
Время хроматографирования	14,25 минут; порядок выхода компонентов: метанол, этанол, пропанол-1

Приготовление растворов.

Для приготовления раствора внутреннего стандарта (ВС) 1,0 мл пропанола-1 помещали в колбу на 100,0 мл и доводили до метки *водой Р*. Для приготовления испытуемого раствора объем аликвоты спрея рассчитывали исходя из того, что необходимо взять такой объем образца, в котором содержалось бы около 1,0 г этанола.

Для спрея объем аликвоты составил 2,2 мл. Аликвоту в 2,2 мл помещали в колбу на 50,0 мл и доводили до метки *водой Р*, затем к 1,0 мл полученного раствора прибавляли 1,0 мл раствора ВС и доводили *водой Р* до объема 25,0 мл.

Приготовление растворов сравнения представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Приготовление растворов сравнения a-f

Раствор сравнения	Приготовление
a	1,0 мл этанола доводили *водой Р* до объема 50,0 мл
b	1,0 мл метанола доводили *водой Р* до объема 100,0 мл и к 1,0 мл полученного раствора добавляли *воду Р* до объема 25,0 мл
c	Смешивали 1,0 мл раствора ВС и 1,0 мл раствора сравнения *a*, 2,0 мл раствора сравнения *b* и доводили *водой Р* до объема 25,0 мл
d	1,0 мл бутанола доводили *водой Р* до объема 50,0 мл
e	Смешивали 1,0 мл раствора ВС, 1,0 мл раствора сравнения *d*, 2,0 мл раствора сравнения *b* и доводили *водой Р* до объема 25,0 мл
f	Смешивали равные объемы растворов сравнения *c* и *e*

Пригодность хроматографической системы рассчитывали по раствору сравнения *c*.

Система считалась пригодной, если эффективность хроматографической колонки составляла не менее 10 000 теоретических тарелок (рассчитанная по пику этанола и пропанола-1), а разрешение между пиками метанола и этанола было не менее 4,5.

Содержание этанола (в процентах (об/об)) рассчитывали по формуле:

$$\frac{A_1 \times l_2 \times p}{A_2 \times l_1 \times V_1}$$

где: A_1 — площадь пика этанола испытуемого раствора; A_2 — площадь пика этанола для раствора сравнения *c*; l_1 — площадь пика ВС испытуемого раствора; l_2 — площадь пика ВС для раствора сравнения *c*; V_1 — объем испытуемого образца в испытуемом растворе, мл; p — содержание % (об/об) этанола в *этаноле Р1*.

Валидационные испытания проводили в соответствии с требованиями Фармакопеи РБ и ЕАЭС, а также Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств ЕАЭС по основным валидационным критериям [3, 4]. Определение специфичности проводили путем хроматографирования испытуемого раствора, раствора плацебо (в котором этанол заменен на бутанол) и растворов сравнения *d–f*. Линейность подтверждалась на 5 уровнях концентраций этанола (от 70 до 130 % от теоретического содержания этанола).

Оценку правильности методики оценивали путем добавления к образцу спрея 96%-ного этанола в количестве 25, 50, и 75 % от исходного объема образца. Сходимость проверяли в 6 проворностях на одном образце спрея. Определение внутрилабораторной воспроизводимости проводилось на 3 параллельных образцах спрея в 3 проворностях в разные дни. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета анализа данных Microsoftt Excel 2016 и программного обеспечения Statistica 10.0 [5].

Результаты и их обсуждение. На рисунке 1 представлена хроматограмма разделения раствора сравнения с, полученная при использовании колонки DB-FFAP, при выбранных условиях хроматографирования.

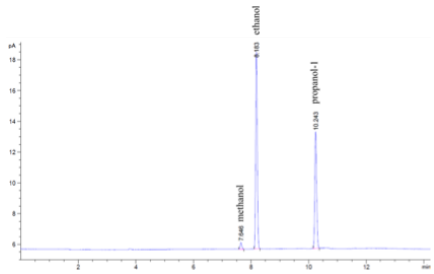

Рисунок 1 – Хроматограмма разделения раствора сравнения с, полученная при использовании колонки DB-FFAP (60 м × 0,53 мм × 1,0 мкм)

Результаты оценки специфичности методики представлены на рисунке 2. При сравнении полученных хроматограмм видно, что время удерживания пика этанола на хроматограмме испытуемого раствора соответствует времени удерживания пика этанола на хроматограмме раствора сравнения. На хроматограмме раствора плацебо пика этанола не обнаружено. Следовательно, аналитическая методика специфична и может быть использована для количественного определения этанола в комбинированном спрее. Результаты оценки линейности методики представлены на рисунке 3.

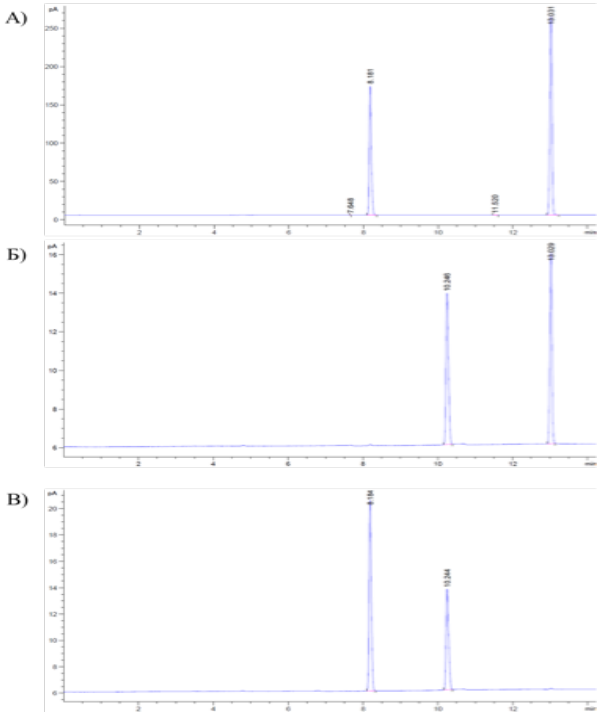

Рисунок 2 – Хроматограммы раствора сравнения (а), раствора

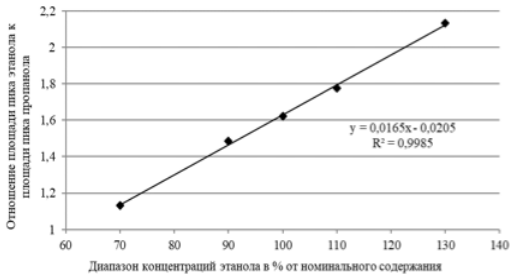

Рисунок 3 – График линейности аналитической методики определения этанола в комбинированном спрее

Значение коэффициента детерминации для отношения площади этанола к площади ВС составило 0,9985, значение коэффициента корреляции – 0,9992 соответственно.

Полученные данные удовлетворяют нормируемому критерию в 0,9950.

Диапазон применения методики количественного определения этанола в комбинированном спрее в области от 70 до 130 % удовлетворяет валидационным требованиям [3, 4].

Данные испытаний повторяемости методики представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты испытания повторяемости методики

№ испытания	1	2	3	4	5	6
Содержание % (об/об) этанола в спрее	49,4	49,5	49,5	49,3	49,3	49,3

Метрологические характеристики								
f	$\bar{x}$	S	S_r	S^2	P, %	t (P, f)	Δx	ε, %
5	49,4	0,10	0,002	0,01	95	2,570	0,11	0,22

Относительное стандартное отклонение (RSD) для 6 измерений составило 0,2 %, что составляет не более 2 % [3–5].

Результаты испытания промежуточной прецизионности методики представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты испытания промежуточной прецизионности методики

День 1 / Аналитик 1		День 2 / Аналитик 2	
1	49,0	1	48,1
2	48,8	2	48,1
3	48,8	3	48,2
4	48,6	4	48,2
5	48,5	5	48,1
6	48,5	6	48,0
7	49,3	7	49,6
8	49,4	8	49,7
9	49,3	9	49,7

Окончание табл. 4

Метрологические характеристики (день 1)								
f	$\bar{x}$	S	S_r	S^2	P, %	t (P, f)	Δx	ε, %
8	48,9	0,36	0,007	0,13	95	2,306	0,28	0,57
Метрологические характеристики (день 2)								
f	$\bar{x}$	S	S_r	S^2	P, %	t (P, f)	Δx	ε, %
8	48,6	0,78	0,016	0,61	95	2,306	0,60	1,23

Как видно из табличных значений, полученные данные относительного стандартного отклонения составили 0,7 и 1,6 % соответственно и не превышали 2 %.

Рассчитанное значение критерия Фишера составило 0,21 (при P=95 %), которое не превышало фармакопейное критическое значение критерия Фишера ($F_к$=3,44 при P=95 %) [1, 3–5].

Результаты испытания правильности методики для испытуемого раствора представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты испытания правильности методики

Содержание этанола в спрее, % (об/об)	Добавление этанола, %	Ожидаемое содержание % (об/об) этанола	Полученное содержание % (об/об) этанола	Абсолютная ошибка, %	Открываемость методики, %
49,4	+25 %				
	1	58,7	58,8	0,1	100,2
	2	58,7	58,8	0,1	100,2
	3	58,7	58,7	0,0	100,0
	+50 %				
	1	64,9	65,4	0,5	100,8
	2	64,9	65,3	0,4	100,6
	3	64,9	65,3	0,4	100,6
	+75 %				
	1	69,4	70,5	1,1	101,6
	2	69,4	70,9	1,5	102,2
	3	69,4	70,6	1,2	101,7

Метрологические характеристики								
f	$\bar{x}$	S	S_r	S^2	P, %	t (P, f)	Δx	ε %
8	100,9	0,77	0,008	0,60	95	2,306	0,59	0,58

В соответствии с критериями приемлемости открываемость методики должна находиться в пределах (100±3) %. По результатам оценки правильности методики открываемость составила от (100,0±0,8) %, что соответствует критерию [3–5].

По результатам оценки робастности методики изменение условий хроматографирования (скорости потока газа-носителя, начальной температуры термостата) в пределах ±10 % удовлетворяет критериям пригодности хроматографической системы. RSD, рассчитанное для содержания этанола в комбинированном спрее, полученное в различных хроматографических условиях в пределах ±10 %, не превышает 2 % и составляет 0,75 %; RSD, рассчитанное для отношений площади пика этанола к площади пика пропанола-1, не превышает 1 %; разрешение между пиками метанола и этанола было более 4,5.

Результаты валидации методики количественного определения этанола в комбинированном спрее представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты валидации методики количественного определения этанола в комбинированном спрее

Параметр	Результат	Критерий приемлемости
Специфичность	Соответствует	На хроматограмме испытуемого раствора время удерживания пика этанола должно соответствовать времени удерживания пика этанола на хроматограмме раствора сравнения
Линейность	0,9992	r≥0,9950
Правильность	(100,9±0,8) %	Процент открываемости (100±3) %
Повторяемость	RSD≤0,2 %	Коэффициент вариации RSD≤2 %
Воспроизводимость	RSD_1≤0,7 %, RSD_2≤1,6 % $F_э$=0,21 ($F_к$>$F_э$)	Коэффициент вариации RSD≤2% ($F_к$≥$F_э$)
Робастность	Соответствует	Число теоретических тарелок не менее 10 000. RSD? рассчитанное для отношений площади пика этанола к площади пика пропанола-1, не более 1 %. RSD среднего значения, рассчитанное для содержания этанола в спрее, не более 2 %. Разрешения между пиками метанола и этанола не менее 4,5

Результаты определения этанола в комбинированном спрее 3 серий по валидированной методике представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Определение этанола в 3 сериях комбинированного спрея

Серия	Содержание этанола в спрее, % (об/об)
1	49,9
2	49,9
3	49,8
Среднее (x±SD, %)	49,9±0,1

Заключение. Была предложена методика газохроматографического определения содержания этанола в комбинированном спрее, содержащем ибупрофен и жидкий экстракт полыни горькой, с использованием колонки кварцевой капиллярной колонки DB-FFAP размером 60 м × 0,53 мм, толщиной неподвижной фазы 1,0 мкм. По результатам валидации аналитической методики подтверждена ее специфичность, линейность и робастность, коэффициент корреляции составил 0,9992. Определена правильность методики, открываемость составила (100,9±0,8) %. Доказана прецизионность методики, RSD для результатов количественного определения при оценке повторяемости составило 0,2 %, при оценке промежуточной прецизионности не превышало 2 %.

По результатам количественного определения среднее содержание этанола в комбинированном спрее составило (49,9±0,1) %. Таким образом, проведенные испытания доказали, что предложенная аналитическая методика для количественного определения этанола в комбинированном спрее является специфичной, прецизионной и достоверной и может быть предложена для включения в проект спецификации на разрабатываемый препарат.

Список цитированных источников

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь : в 2 т. : введ. в действие с 1 янв. 2013 г. приказом М-ва здравоохранения Респ. Беларусь от 25.04.2012 г. № 453. М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении; [под общ. ред. А. А. Шерякова]. – Молодечно: Победа, 2012. – Т. 1: Общие методы контроля качества лекарственных средств. – 1220 с.

2. Фармакопея Евразийского экономического союза. – Москва : Евразийская эконом. комис. – 2020. – Т. 1, ч. 1. – 584 с.

3. Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств [Электронный ресурс] : решение Коллегии Евразийской эконом. комис., 17 июля 2018 г. № 113. – Режим доступа: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01421237/clcd_20072018_113. – Дата доступа: 30.05.2024.

4. Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний : ТПК 432-2012 (02041). Введ. 01.03.2013. – Минск : Департамент фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 2012. – 18 с.

5. Производство лекарственных средств. Применение статистических методов при валидации : ТКП 438-2012 (02041). Введ. 01.03.2013. – Минск : Департамент фармацевт. пром-сти М-ва здравоохранения Респ. Беларусь, 2012. – 32 с.

Quantitative determination of ethanol in a combined spray by gas chromatography

[1]Sushinskaya O. A., [2]Feskova E. V., [1]Golyak N. S.

[1]Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus;

[2]Educational Establishment "Belarusian State Technological University", Minsk, Republic of Belarus

The article presents the results of the development and validation of a method for the quantitative determination of ethanol in a combined spray containing ibuprofen and liquid extract of wormwood by gas-liquid chromatography. Optimal chromatography conditions were selected for the DB-FFAP column (60 m x 0.53 mm x 1.0 μm) by Agilent Technologies. The validation of the methodology was carried out in accordance with the pharmacopoeia requirements and the Guidelines for the Validation of analytical Methods for testing Medicines of the Eurasian Economic Union. According to the results of quantitative determination, the average ethanol content in the combined spray of 3 series was 49,9 ± 0,1 %. The specificity and linearity of the technique are proved. The proposed technique is accurate and precise within the range of application. All the validation criteria studied met the eligibility criteria. The results obtained allow us to consider the proposed methodology for the quantitative determination of ethanol in a combined spray for external use.

Keywords: wormwood, liquid extract, spray, gas chromatography, ethanol, validation.

Поступила 05.06.2024