

Determination of Phthalates in Pharmaceutical Products

M.V. Bakun[†], I.B. Zakharkiv[†], M.F. Zui^{*†}

[†]Chemistry Department, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Lva Tolstogo St., 12, Kyiv, Ukraine, 01033;

*e-mail: marynazui3@gmail.com

Received: July 24, 2016; Accepted: October 27, 2016

DOI: 10.17721/moca.2016.94-98

A gas chromatographic method with flame ionization detector was applied to the determination of phthalates in pharmaceutical products prepared in aqueous media, using preconcentration via dispersive microextraction. According to the analysis of pharmaceuticals, the following values of phthalates content were obtained: dibutyl phthalate 76–1200 ng/ml, diisobutyl phthalate 60–540 ng/ml and diethylhexyl phthalate 58–240 ng/ml. A significant effect of other components on the extraction recovery of phthalates has been shown. The values of matrix effect were calculated and regularity has been established: increase of matrix effect led to decrease in extraction recovery of phthalates.

Standard additions method was used to reduce the impact of matrix effect on the determination of phthalates. The data obtained are characterized by relevant accuracy and reproducibility, and the relative standard deviation does not exceed 12.6%.

Keywords: phthalates, gas chromatography, preconcentration, dispersive liquid – phase microextraction, pharmaceutical analysis

Определение фталатов в лекарственных средствах

М.В. Бакун[†], И.Б. Захаркив[†], М.Ф. Зуй^{*†}

[†]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Льва Толстого, 12, Киев, 01033;

*e-mail: marynazui3@gmail.com

Поступила: 24 июля 2016 г; Принята: 27 октября 2016 г

DOI: 10.17721/moca.2016. 94-98

Газохроматографическим методом с пламенно-ионизационным детектором проведено определение фталатов в ряде лекарственных средств, приготовленных в водной среде, с применением предварительного концентрирования методом дисперсионной микроэкстракции. По результатам анализа фармацевтических препаратов получены следующие значения содержания фталатов: дибутилфталата (76–1200 нг/мл), диизобутилфталата (60–540 нг/мл) и диэтилгексилфталата (58–240 нг/мл). Показано существенное влияние других компонентов на степень извлечения фталатов. Рассчитаны величины матричного эффекта и установлена закономерность: с увеличением матричного эффекта степени извлечения фталатов уменьшаются.

Ключевые слова: фталаты, газовая хроматография, концентрирование, дисперсионная жидкостная микроэкстракция, анализ лекарственных средств

Фталаты, диэфиры 1,2-бензолдикарбоновой кислоты, – группа синтетических химических соединений, которые имеют широкий спектр применения. Фталаты являются пластификаторами при производстве полимерных материалов промышленного, бытового, пищевого и медицинского назначения, преимущественно на основе поливинилхлорида и полистирола, а также синтетических и натуральных каучуков.

Известно [1], что фталаты оказывают токсичное действие на эндокринную и репродуктивную системы, поэтому важно оценить, какие количества фталатов могут поступать в организм с различными продуктами. На сегодняшний день актуальной проблемой стало исследование, связанное с поступлением фталатов в живой организм при

использовании фармацевтических средств. Так, низкомолекулярные диэтил- и дибутилфталат как связующие вещества входят в состав покрытий таблеток, капсул, гранул [2]. Благодаря своим свойствам пластификаторов, фталаты включены в 100 рецептур производства мягких желатиновых капсул, их применяют для регулирования вязкости жидких лекарственных растворов. Также фталаты могут поступать в жидкие лекарственные препараты из полимерной упаковки, так как они не образуют химических связей с полимером и способны мигрировать в растворы. Вследствие высокой термо- и фотостабильности, устойчивости к гидролизу в нейтральных средах эти соединения могут накапливаться в жировых тканях живых организмов и при воздействии в течение

длительного времени проявляют мутагенное, канцерогенное и тератогенное действие [3]. Европейским Агенством по лекарственным препаратам (European Medicines Agency) установлены максимальные количества ежедневного поступления фталатов в организм. Для ДБФ, ДЭФ и поливинилацетатфталата допустимая суточная доза (Permitted daily exposure, PDE) составляет 0.01; 4.0 и 2.41 мг/кг соответственно [4].

В Украине фталаты в лекарственных средствах не контролируют, стандартные методики по определению фталатов в Украине отсутствуют [5], поэтому нет норм допуска фталатов в готовых лекарственных формах и полимерных упаковках.

Согласно Европейской Фармакопее [6] контролируется возможная миграция дибутилфталата (ДБФ) и диэтилгексилфталата (ДЭГФ) из полимерных упаковок в жидкие лекарственные средства методами инфракрасной спектроскопии и тонкослойной хроматографии. Согласно Американской Фармакопее [7], в препаратах норгестимате и этинилэстрадиоле контролируется содержание ДБФ методом ВЭЖХ-ДМД, однако данными методами невозможно определять фталаты при концентрации меньше 1000 мкг/л без предварительного концентрирования.

Известны нормативно утвержденные методики извлечения фталатов из питьевой воды жидкостной и твердофазной экстракцией с последующим их хромато-масс-спектрометрическим определением [8]. Однако известные методики достаточно дорогие, как при приобретении приборов, так и в их обслуживании. Нами предложена простая, экспрессная и чувствительная методика определения фталатов в водных растворах лекарственных средств методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором после концентрирования дисперсионной микроэкстракцией [9].

Методика эксперимента

В работе использовали диизобутилфталат (ДиБФ), дибутилфталат (ДБФ) и диэтилгексилфталат (ДЭГФ) производства Sigma-Aldrich. Органические растворители: ацетонитрил в качестве дисперсионного (квалификации «для ВЭЖХ»), хлороформ в качестве экстракционного (квалификации «х.ч.»).

Определение содержания фталатов проводили на газовом хроматографе Agilent Technologies 6890N в следующих условиях: колонка HP-5, 30 м x 0.32 мм x 0.25 мкм; газ-носитель гелий при 3.1 мл/мин; температурная программа печи 120–300 °C (20 °C/мин.), 300 °C (3 мин.); температура испарителя 300 °C; режим без деления потока, детектор пламенно-ионизационный, 350 °C; объем инъекции 1 мкл. Для отделения экстракционной фазы от воды использовали центрифугу РУ 180L (Россия).

Перед проведением концентрирования методом дисперсионной микроэкстракции 0.5 мл аликвотной части образца разбавляли бидистиллированной водой до объема 8.0 мл. Далее пробоподготовку и определение фталатов осуществляли по методике, предложенной ранее [10], которая заключается в следующем: к 8.0 мл полученной водной пробы фталатов добавляли хлорид натрия (конечная концентрация 10%), затем смесь ацетонитрила (250 мкл) и хлороформа (50 мкл), перемешивали раствор в течении 3 мин., после чего образовавшуюся эмульсию центрифугировали в течение 5 мин при скорости 4000 об/мин. Из капли экстракта фталатов, образовавшегося в результате центрифугирования, отбирали 1 мкл пробы и инжестировали в хроматограф.

Для определения матричного эффекта (МЭ), степени извлечения (R) была применена методика, описанная авторами [8], которая состоит в следующем. Готовили 3 серии проб, из которых отбирали по 1 мкл и вводили в хроматограф. Первая серия включала стандартные растворы фталатов в хлороформе, содержащие одинаковую добавку фталатов (величина А). Вторая серия проб заключалась во вводе стандартной добавки хлороформного раствора фталатов непосредственно в хлороформный экстракт после извлечения фталатов из водного раствора методом ДРМЕ (величина В). В третьей серии добавки стандартных растворов фталатов вводили в водные растворы лекарственных препаратов перед извлечением методом ДРМЕ (величина С). Величины МЭ и R в процентах рассчитывали по формулам:

$$МЭ = B/A \times 100,$$

$$R = C/B \times 100,$$

где А – площадь хроматографического пика стандартного раствора; В – площадь хроматографического пика экстракта со стандартной добавкой в экстракт; С – площадь хроматографического пика экстракта со стандартной добавкой в исходный образец.

Значение матричного эффекта, близкое к 100%, указывает на отсутствие матричного эффекта, чем больше отклонение от 100 в одну или другую сторону, тем больше матричный эффект.

Результаты и обсуждение

Лекарственные препараты содержат в своем составе как основные вещества, так и дополнительные в достаточно высоких концентрациях. Например, капли для носа «нафтизин» содержат раствор действующего вещества 1 мг/мл, и вспомогательное вещество борную кислоту в концентрации 20 мг/мл, капли для глаз «тауфон» содержат 40 мг/мл действующего вещества и консервант метилпарабен в количестве

до 1 мг/мл (метилгидроксibenзоат, Е 218) [5]. Поэтому возможен матричный эффект, то есть влияние других химических веществ на результаты определения фталатов в данном случае.

Результаты анализа, представленные в таблице 1, указывают на присутствие фталатов, в первую очередь, ДБФ, ДиБФ и ДЭГФ в количествах от 60 до 1200 мкг/л. В частности, по результатам анализа 11 лекарственных препаратов в 10 из них были определены фталаты: содержание ДиБФ составляло 60–540 нг/мл, ДБФ 76–1200 нг/мл, ДЭГФ 58–240 нг/мл. Особенно высокими являются содержания ДБФ и ДЭГФ, которые признаны самыми токсичными среди фталатов, ПДК для

питьевой воды для ДЭГФ составляет 6 мкг/л, и 100 мкг/л для ДБФ по стандартам Министерства по охране окружающей среды США [7]. Для нивелирования влияния матричного эффекта на определение содержания фталатов применяли метод стандартных добавок. Полученные данные характеризуются достаточной точностью и воспроизводимостью, при этом относительное стандартное отклонение не превышает 12.6%.

Величины матричного эффекта и степени извлечения при анализе различных лекарственных средств представлены в виде диаграмм для ДиБФ, ДБФ и ДЭГФ на рисунках 1, 2 и 3.

Таблица 1. Результаты ГХ-ПИД анализа лекарственных средств на содержание фталатов методом добавок после ДРМЕ (n=3; P=0.95).

Препарат	ДиБФ		ДБФ		ДЭГФ	
	Найдено, нг/мл	S _p , %	Найдено, нг/мл	S _p , %	Найдено, нг/мл	S _p , %
Капли для носа 1	270±70	10.1	550±60	4.2	240±60	10.5
Капли для носа 2	-	-	630±80	5.2	150±30	7.9
Капли для носа 3	70±7	4	210±40	8.5	60±7	4.7
Капли для носа 4	-	-	76±6	3.3	58±8	5.3
Р-р для дезинфекции ран	60±3	2.2	1200±200	6.5	-	-
Капли для глаз 1	-	-	390±80	8.7	120±20	7.9
Капли для глаз 2	540±70	5.2	380±90	9.7	110±30	12.6
Капли для глаз 3	-	-	980±70	2.9	185±6	1.3
Капли для глаз 4	-	-	440±40	3.4	130±20	4.9
Капли для глаз 5	-	-	-	-	69±6	3.3

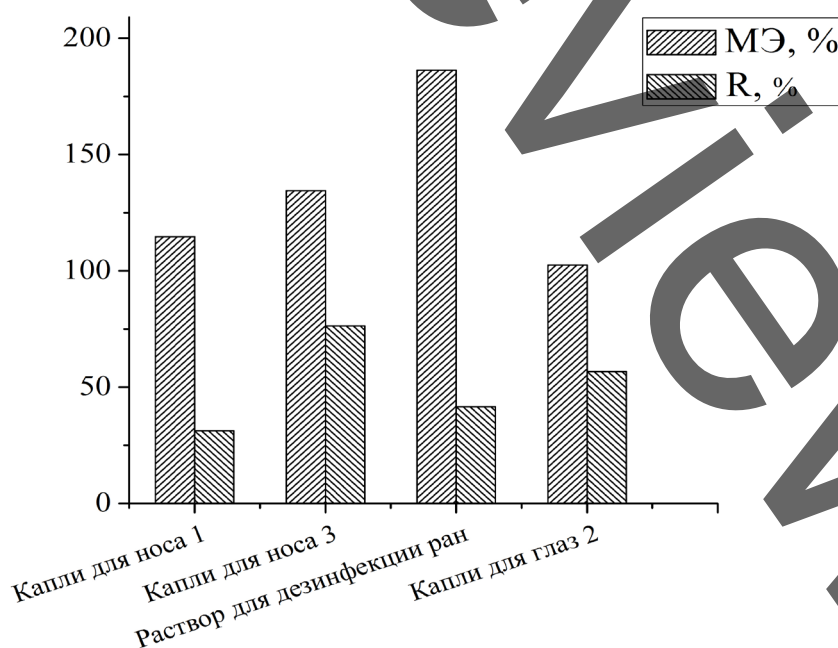


Рис. 1. Влияние матричного эффекта на степень извлечения ДиБФ.

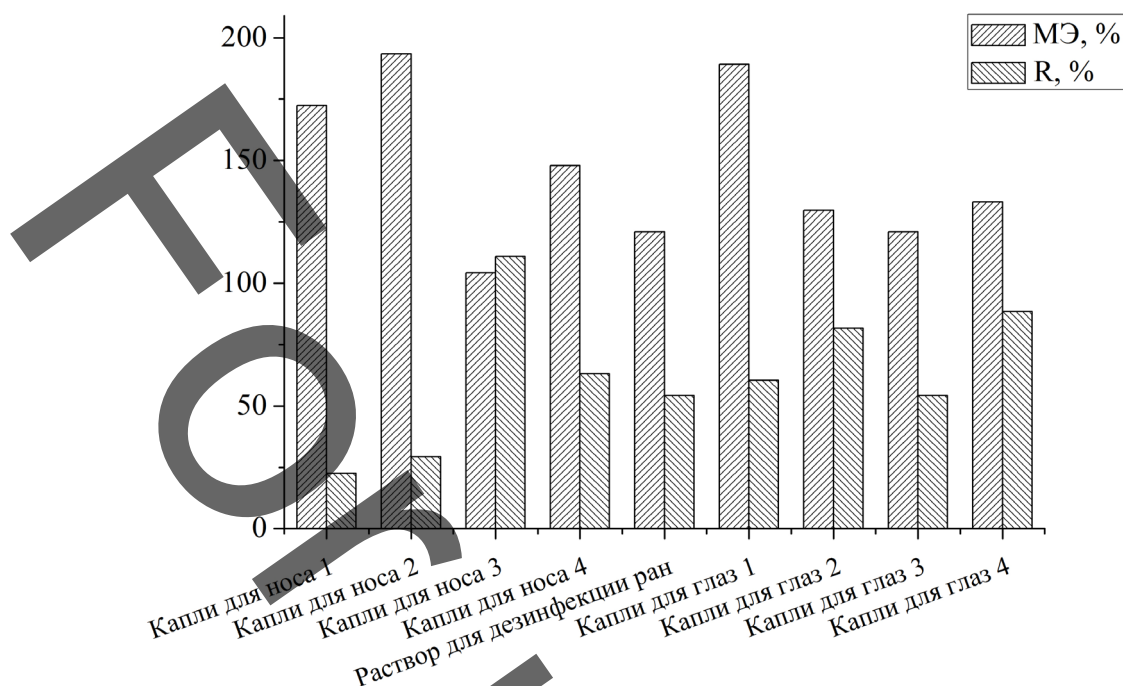


Рис. 2. Влияние матричного эффекта на степень извлечения ДБФ.

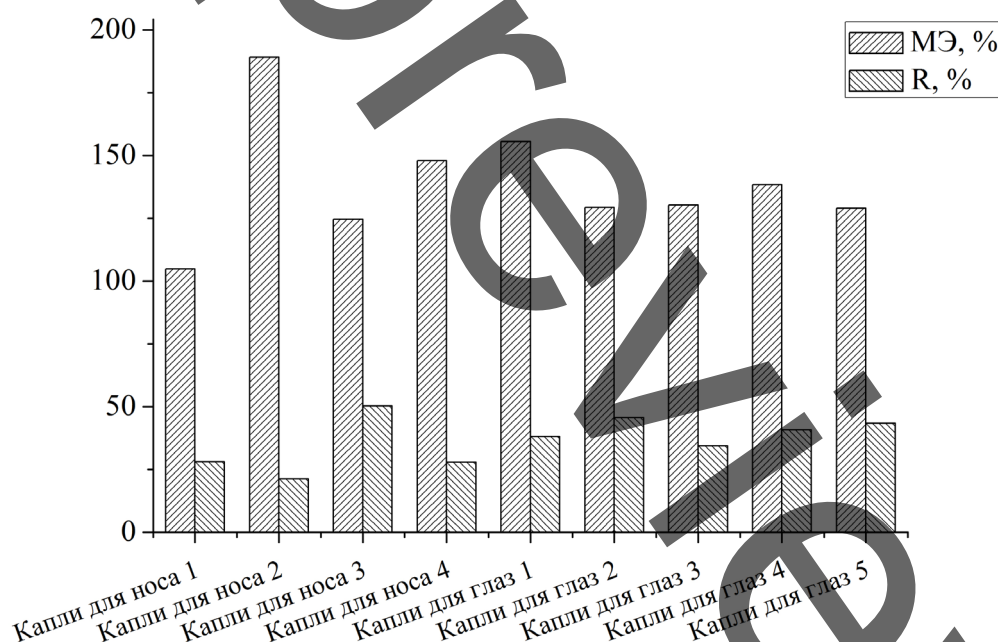


Рис. 3. Влияние матричного эффекта на степень извлечения ДЭГФ.

Как видно, по результатам расчета этих параметров можно судить о влиянии матрицы, то есть влиянии других компонентов образца на процесс концентрирования и последующего определения аналита. При этом значения степеней извлечения фталатов для различных лекарственных препаратов, за исключением капель для носа 3, капель для глаз 2 и капель

для глаз 4, составляют не более 60%. При исследовании модельных водных растворов степени извлечения составляли не менее 90% [6]. Следует отметить, что матричный эффект при извлечении фталатов из анализируемых лекарственных средств достаточно высок и может отклоняться от нулевого матричного эффекта на 10-90%. Значительный матричный эффект

можно объяснить существенным влиянием основных и сопутствующих компонентов не только на степень извлечения фталатов, но и на объем экстракционной фазы. Чем выше матричный эффект, тем больше уменьшается объем экстракционной фазы, что приводит к уменьшению степени извлечения фталатов.

Выводы

Результаты проведенного химического анализа ряда лекарственных средств, находящихся в поли-

мерных упаковках, методом газовой хроматографии с предварительным концентрированием дисперсионной микроэкстракцией показали наличие фталатов в количестве от 60 до 1200 нг/мл в 10 жидких лекарственных средствах. Показано, что матричный эффект при микроэкстракционном концентрировании и газохроматографическом определении фталатов достаточно высок, однако его влияние можно нивелировать, применив метод стандартных добавок.

Литература

1. Serodio P., Nogueira J.M.F. Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water, *Water Research*. 2006, 40, 2572–2582.
2. Hernandez-Diaz S., Mitchell A.A., Kelley K.E., Calafat A.M., and Hauser R. Medications as a Potential Source of Exposure to Phthalates in the U.S. Population, *Env. Health Persp.* 2009, 117(2), 185–189.
3. Kataoka H., Ise M., Narimatsu S. Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the analysis of bisphenol A, alkylphenols, and phthalate esters in foods contacted with plastics, *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 77–85.
4. Guideline on the use of phthalates as excipients in human 12 medicinal products. European Medicines Agency, 2013. 24 September 2015. EMA/CHMP/SWP/684886/2013. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). P.1 – 52. www.ema.europa.eu
5. Державна Фармакопея України: в 3 т. ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків, 2014, 2015.
6. European Pharmacopeia - 8th edition. Council of Europe, Strasbourg. v. 1, 2. 2014. 3603 p.
7. United States Pharmacopeia by US Pharmacopeia. v. 1, 2. 2008.
8. Drinking water standards and health advisories table. United States Environmental Protection Agency. Region IX. June 2007. 30 p. 75 Hawthorne Street, WTR-6, San Francisco, CA 94105. EPA National Primary Drinking Water Regulations. <https://www3.epa.gov>
9. Захаркив И.Б., Зуй М.Ф., Зайцев В.Н. Дисперсионная жидкостная микроэкстракция для определения фталатов в воде, *Химия и технология воды*. 2015. 37(2), 146–157.
10. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C. M. Chavez-Eng. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 2003, 75, 3019–3030.