

УДК

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ ДЛЯ АНАЛИЗА ЧИСТОТЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ГРУППЫ ФТОРХИНОЛОНОВ

© 2004 г. В.Л. Дорофеев, С.Е. Слюбаева, А.П. Арзамасцев

Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

Показано, что при разработке методик анализа фторхинолонов по разделу нормативной документации “посторонние примеси” с использованием обращено-фазовой ВЭЖХ необходимо использовать в качестве базовой подвижную фазу ацетонитрил – [фосфатный буфер + тетрабутиламмония дигидрофосфат 1 ммоль/л (рН 2,5)] 10:90. Увеличение концентрации тетрабутиламмония до 3 ммоль/л не оказывает существенного влияния на разделение пиков. Увеличение времени удерживания за счет снижения концентрации ацетонитрила улучшает разделение пиков, однако одновременно может наблюдаться искажение пиков веществ, находящихся в высокой концентрации.

ВВЕДЕНИЕ

В современном фармакопейном анализе [2, 3, 4] метод ВЭЖХ находит широкое применение для установления подлинности, анализа чистоты и количественного определения лекарственных средств.

Лекарственные вещества группы фторхинолонов могут содержать родственные соединения, имеющие различные принципы образования: изомерия положения заместителей, деметилирование пиперазинильного радикала, образование N-окисей по пиперазинильному радикалу, образование продуктов декарбоксации и др. [2, 3]. В зарубежных фармакопеях [2, 3, 4] описаны ципрофлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин и пефлоксацин. Однако методики ВЭЖХ при анализе фторхинолонов на посторонние примеси различны.

Задачей настоящей работы являлась разработка методики, позволяющей проводить анализ чистоты лекарственных средств группы фторхинолонов с использованием метода ВЭЖХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

1. Норфлоксацин: стандартный образец, KRKA, Словения.
2. Пефлоксацина метансульфоната (мезилата) дигидрат: рабочий стандарт, Dr. Reddy's Laboratories Ltd, Индия.
3. Ципрофлоксацина гидрохлорида моногидрат: субстанция, Ranbaxy Laboratories Ltd, Индия.
4. Ципрофлоксацина этилендиаминовый аналог: стандартный образец, Фармакопея США.

Приготовление стандартных растворов

Стандартный раствор норфлоксацина

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 12,5 мг стандартного образца норфлоксацина, растворяли в 0,01 М растворе кислоты хлористоводородной при непрерывном перемешивании в течение 5 мин. Объем раствора доводили до метки тем же растворителем. Концентрация полученного раствора 500 мкг/мл.

Помещали 1 мл раствора норфлоксацина 500 мкг/мл в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора до метки 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной. Концентрация полученного раствора 20 мкг/мл.

Стандартный раствор пефлоксацина мезилата

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 25,0 мг стандартного образца пефлоксацина мезилата, растворяли в 0,01 М растворе кислоты хлористоводородной при непрерывном перемешивании в течение 5 мин. Объем раствора доводили до метки тем же растворителем. Концентрация полученного раствора 1000 мкг/мл.

Стандартный раствор, содержащий смесь норфлоксацина и пефлоксацина мезилата

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 1,88 мл стандартного раствора норфлоксацина 20 мкг/мл и 7,5 мл стандартного раствора пефлоксацина мезилата 1000 мкг/мл. Доводили объем раствора до метки 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной. Концентрация пефлоксацина мезилата в полученном растворе 300 мкг/мл. Концентрация норфлоксацина 1,5 мкг/мл, что соответствует 0,5% от содержания пефлоксацина мезилата.

Стандартный раствор ципрофлоксацина гидрохлорида

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 12,5 мг стандартного образца ципрофлоксацина гидрохлорида, растворяли в 0,01 М растворе кислоты

хлористоводородной при непрерывном перемешивании в течение 5 мин. Объем раствора доводили до метки тем же растворителем. Концентрация полученного раствора 500 мкг/мл.

Стандартный раствор этилендиаминового аналога ципрофлоксацина

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 5,0 мг стандартного образца этилендиаминового аналога ципрофлоксацина, растворяли в 0,01 М растворе кислоты хлористоводородной при непрерывном перемешивании в течение 5 мин. Объем раствора доводили до метки тем же растворителем. Концентрация полученного раствора 200 мкг/мл.

Стандартный раствор, содержащий смесь ципрофлоксацина гидрохлорида и этилендиаминового аналога ципрофлоксацина

Помещали 1 мл раствора ципрофлоксацина гидрохлорида 500 мкг/мл и 2,5 мл раствора этилендиаминового аналога ципрофлоксацина в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора до метки 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной. Концентрация каждого вещества около 20 мкг/мл.

Условия хроматографирования

Исследование проводили в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ.

В работе использовали градиентный ВЭЖХ хроматограф BISCHOFF (Швейцария). Колонка PRONTOSIL AQ-120 (250 мм × 4 мм, C_{18} , 5 мкм), предколонка PRONTOSIL AQ-120 (14 мм × 4 мм, C_{18} , 5 мкм). Температура колонки 40°C (термостат VARIOTHERM). Скорость потока 1 мл/мин. Объем пробы 20 мкл (инжектор Rheodyne). Детектирование: диодно-матричный детектор DAD 3L при длине волны 277 нм.

Управление прибором и расчет хроматографических параметров осуществляли с использованием программы "Мультихром" (версия 2.1 для Windows®, Ampersand Ltd.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбранные для анализа соединения имеют близкую структуру. Пефлоксацин отличается от норфлоксацина только присутствием метильной группы в 4 положении пиперазинильного радикала. Аналогично сходные структуры имеют и ципрофлоксацин и его этилендиаминовый аналог (рис. 1). Норфлоксацин выступает как примесь в пефлоксацине (продукт деметилирования), а этилендиаминовый аналог – примесь в ципрофлоксацине [2, 3]. В связи с этим разделение данных пар веществ с использованием метода ВЭЖХ позволяет найти подход к разработке методик анализа чистоты фторхинолонов.

Выбор состава подвижной фазы (ПФ) был осно-

ван на кислотно-основных свойствах анализируемых соединений. Фторхинолоны являются амфолитами, так как содержат в молекуле одновременно кислотные и основные центры – алифатический атом азота и карбоксильную группу (рис. 1).

Для водного компонента ПФ было выбрано значение pH 2,5. В такой среде практически все молекулы фторхинолонов находятся в ионизированном состоянии, представляя собой катионы за счет протонирования алифатического атома азота [5]. Вместе с тем, ионизация карбоксильной группы подавлена. Таким образом, в кислой среде повышается однородность ионного состава молекул фторхинолонов, что должно снижать размывание хроматографической зоны.

На рис. 2 представлена хроматограмма раствора, содержащего норфлоксацин в концентрации 0,5% от содержания пефлоксацина мезилата, полученная в ПФ ацетонитрил – фосфатный буфер с pH 2,5 15:85. Ввиду близости структуры анализируемые соединения имеют мало различающиеся времена удерживания. При этом пефлоксацин выходит из колонки немного позже, что закономерно связано с наличием в его структуре дополнительного метильного радикала, увеличивающего липофильность данного соединения.

Эффективность колонки по норфлоксацину в данных условиях составила около 6900 теоретических тарелок (т.т.), фактор симметрии – 0,87. Аналогичные параметры для пефлоксацина составили 2900 и 1,72. Разрешение между пиками 0,96.

Для повышения эффективности системы в фосфатный буфер в качестве динамического модификатора был добавлен тетрабутиламмоний (в виде дигидрофосфата). Значение pH водного компонента 2,5. Поскольку тетрабутиламмоний и молекулы фторхинолонов имеют одинаковый заряд, удержание последних уменьшается [1]. Поэтому для сохранения приемлемого времени удерживания была уменьшена элюирующая сила ПФ за счет снижения содержания в её составе ацетонитрила (рис. 3).

Эффективность колонки по норфлоксацину в данных условиях составила около 9500 т.т., фактор симметрии – 0,98. Аналогичные параметры для пефлоксацина составили 4800 и 2,48. Разрешение между пиками 1,02.

Таким образом, добавление иона тетрабутиламмония в минимальной концентрации увеличивает эффективность системы, хотя разделение пиков остается на прежнем уровне.

Увеличение концентрации тетрабутиламмония до 3 ммоль/л при том же соотношении ацетонитрила и водного компонента 10:90 приводит к уменьшению времени удерживания (рис 4). Концентрация испытуемого раствора была снижена в 1,5 раза, поскольку

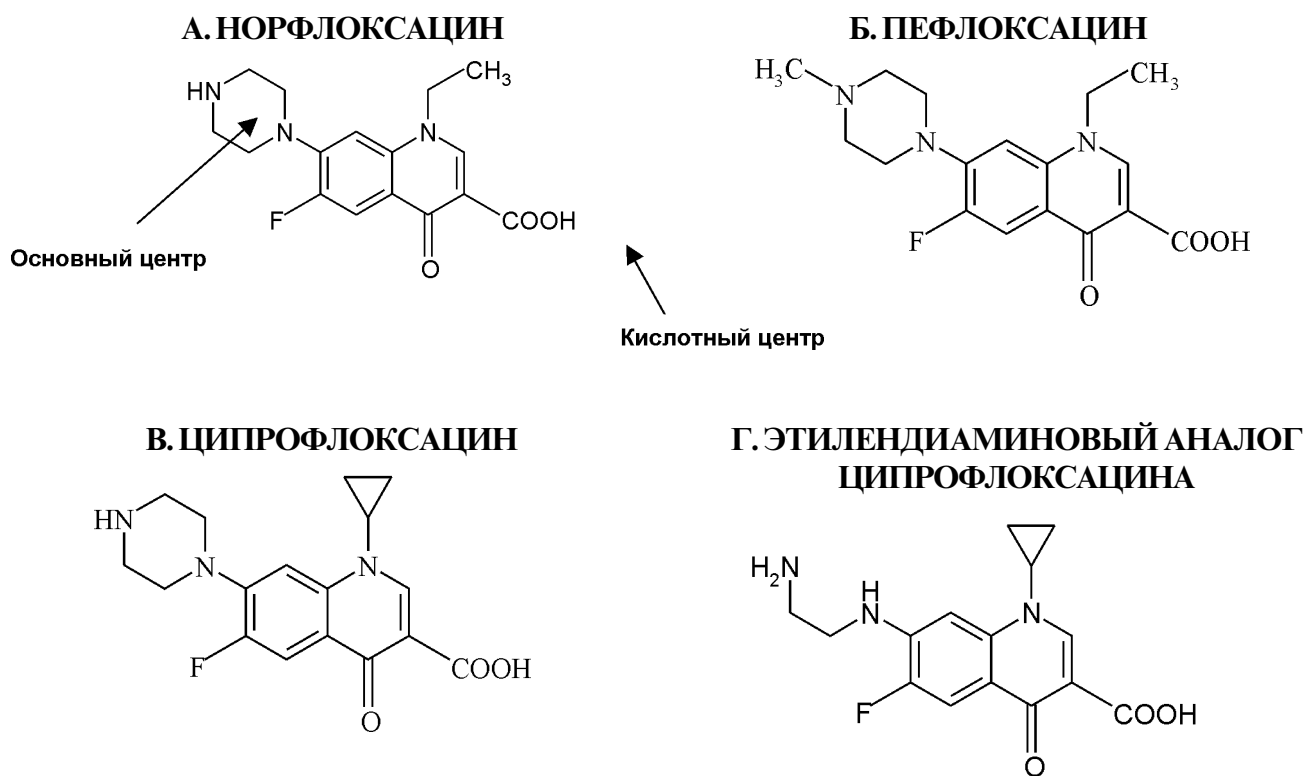


Рис. 1. Структура анализируемых соединений.

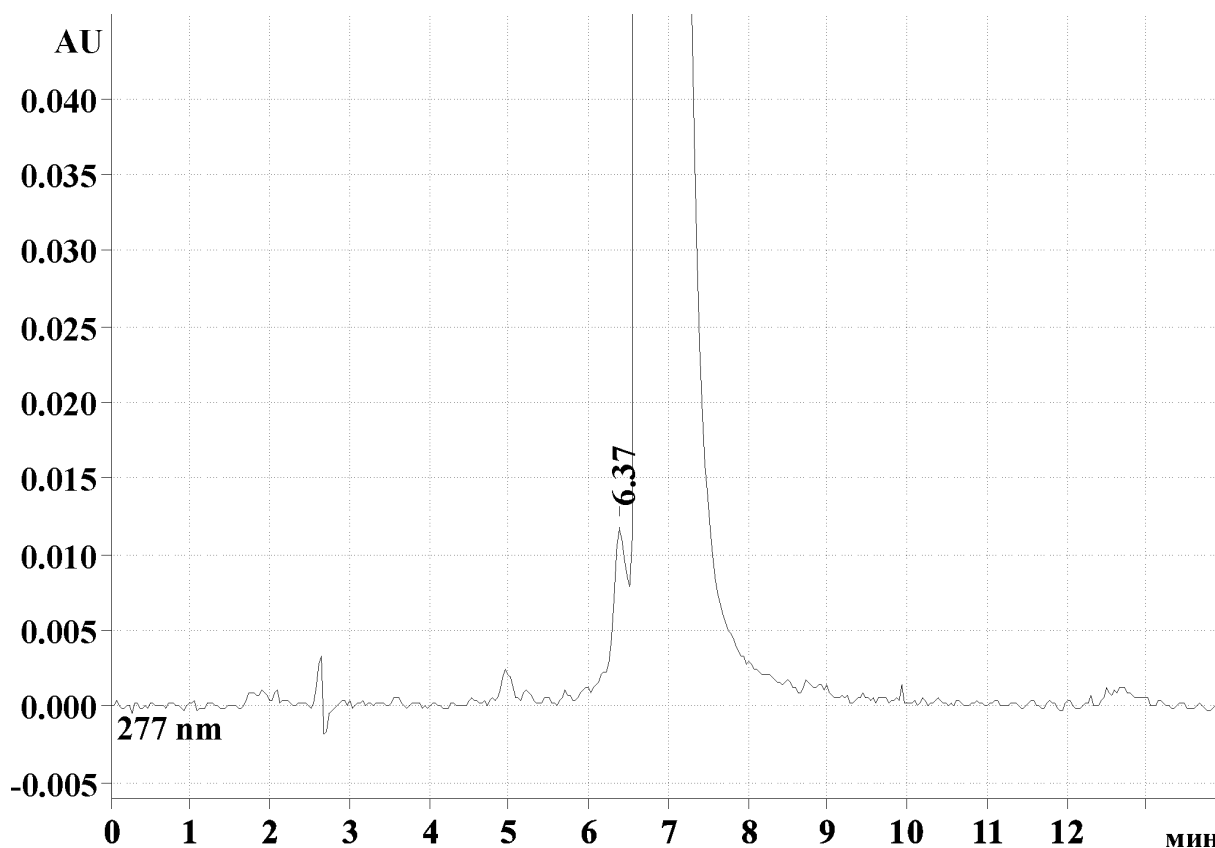


Рис. 2. Хроматограмма раствора, содержащего норфлоксацин 1,5 мкг/мл и пefлоксацина мезилат 300 мкг/мл, в ПФ ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 2,5) 15:85.

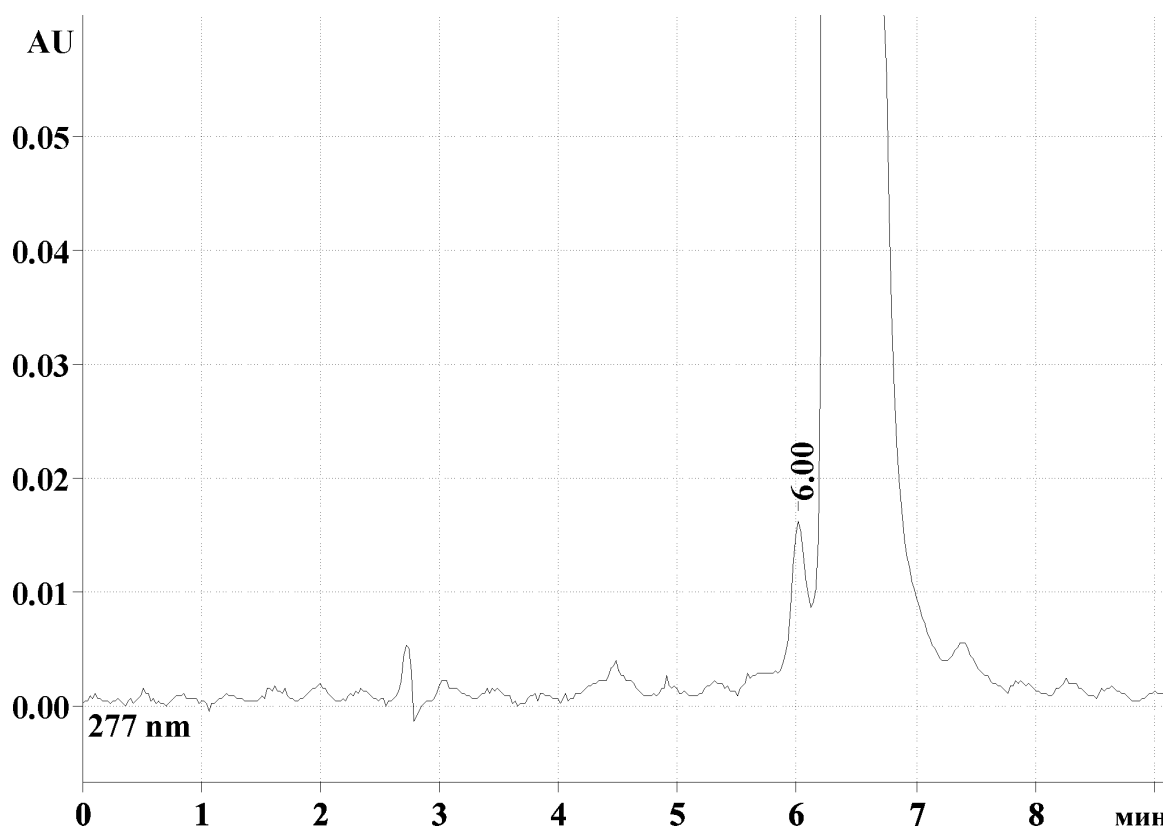


Рис. 3. Хроматограмма раствора, содержащего норфлоксацин 1,5 мкг/мл и пefлоксацина мезилат 300 мкг/мл, в ПФ ацетонитрил – фосфатный буфер + тетрабутиламмония дигидрофосфат 1 ммоль/л (рН 2,5) 10:90.

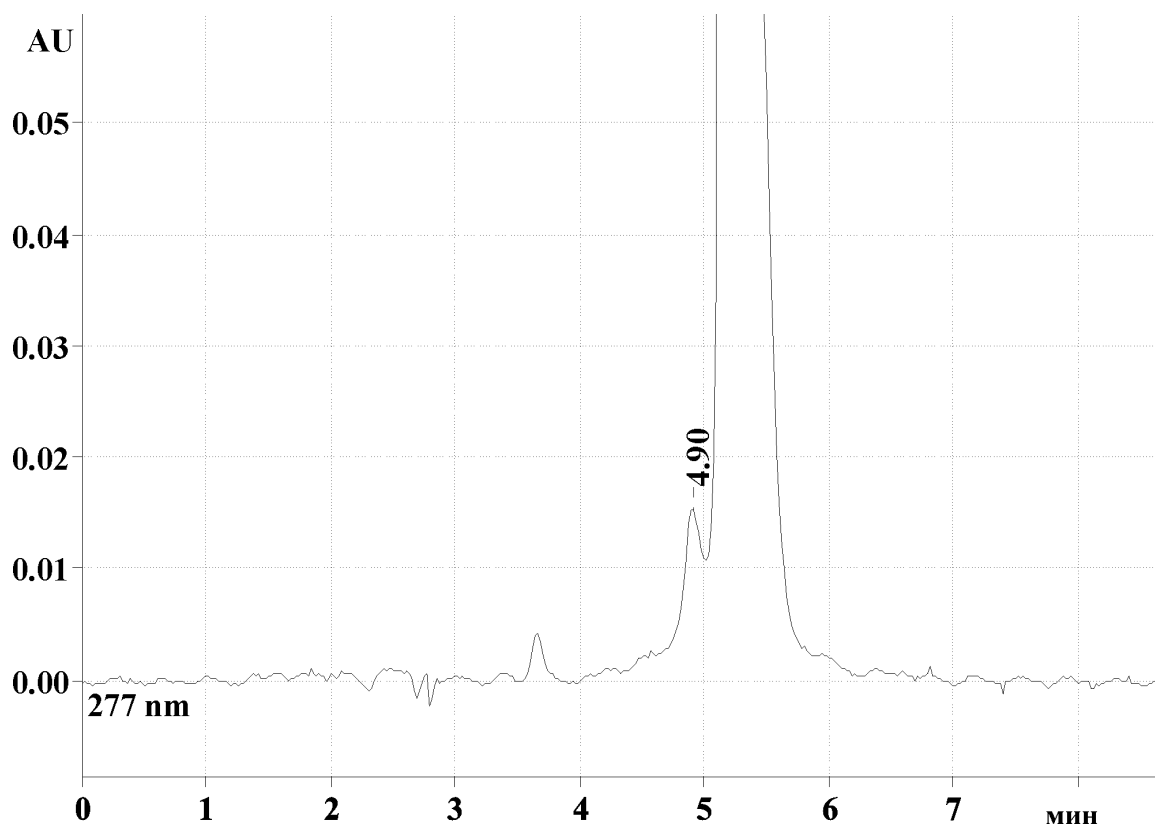


Рис. 4. Хроматограмма раствора, содержащего норфлоксацин 1,0 мкг/мл и пefлоксацина мезилат 200 мкг/мл, в ПФ ацетонитрил – фосфатный буфер + тетрабутиламмония дигидрофосфат 3 ммоль/л (рН 2,5) 10:90.

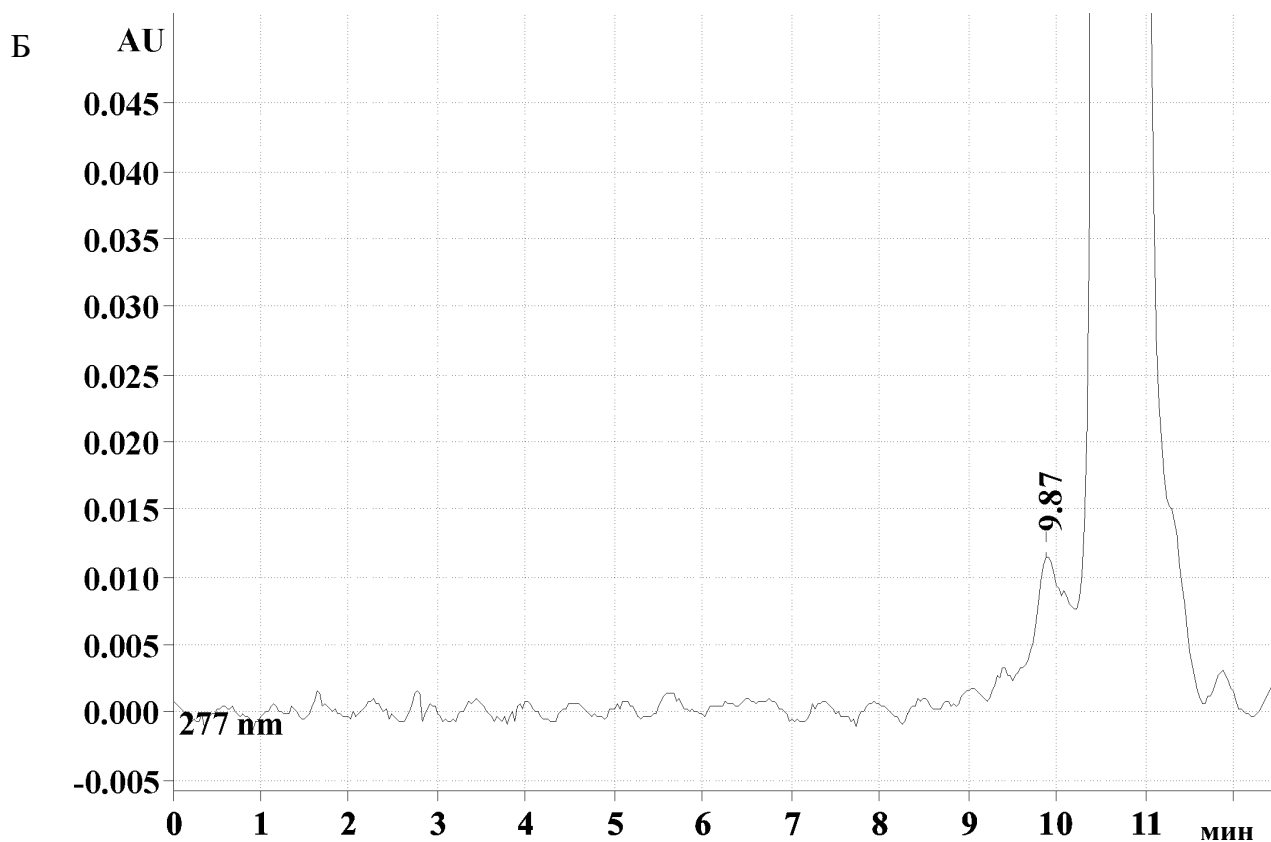
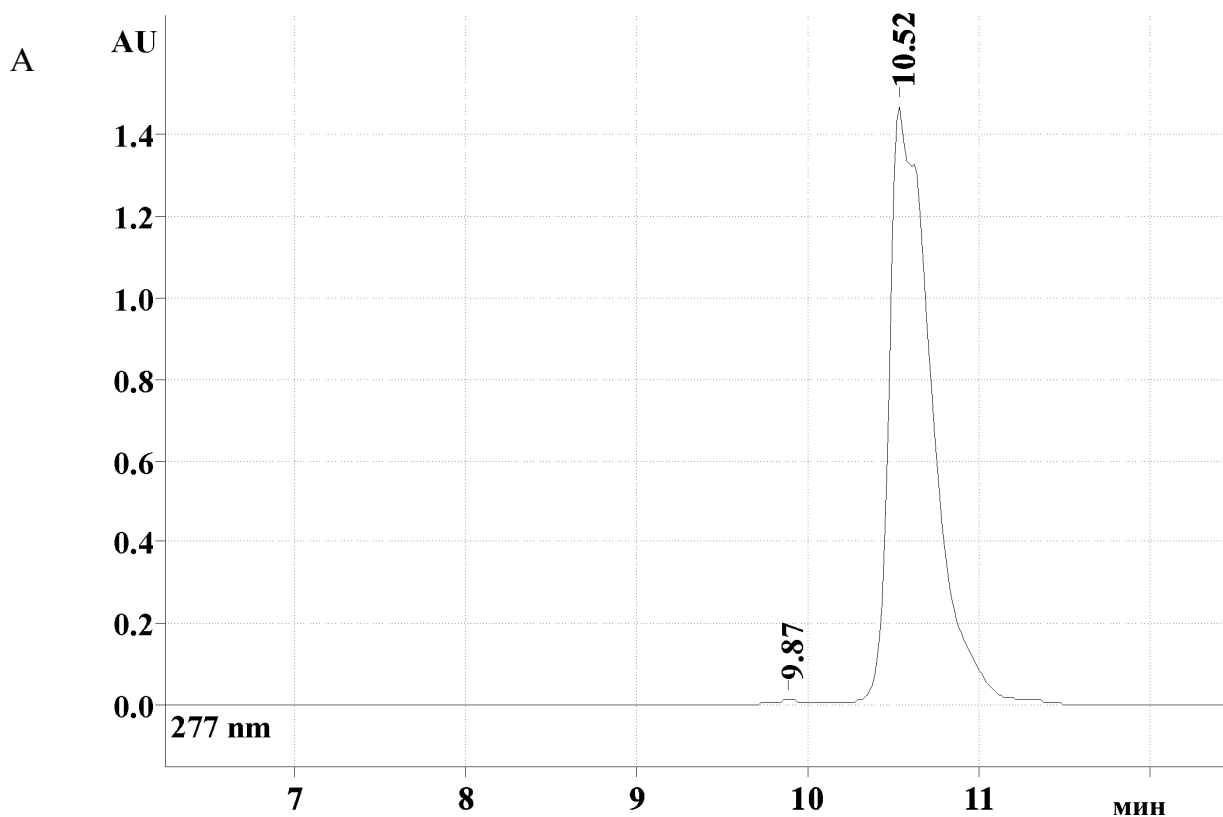


Рис. 5. Хроматограмма раствора, содержащего норфлоксацин 1,5 мкг/мл и пefлоксацина мезилат 300 мкг/мл, в ПФ ацетонитрил – фосфатный буфер + тетрабутиламмония дигидрофосфат 3 ммоль/л (рН 2,5) 7:93.

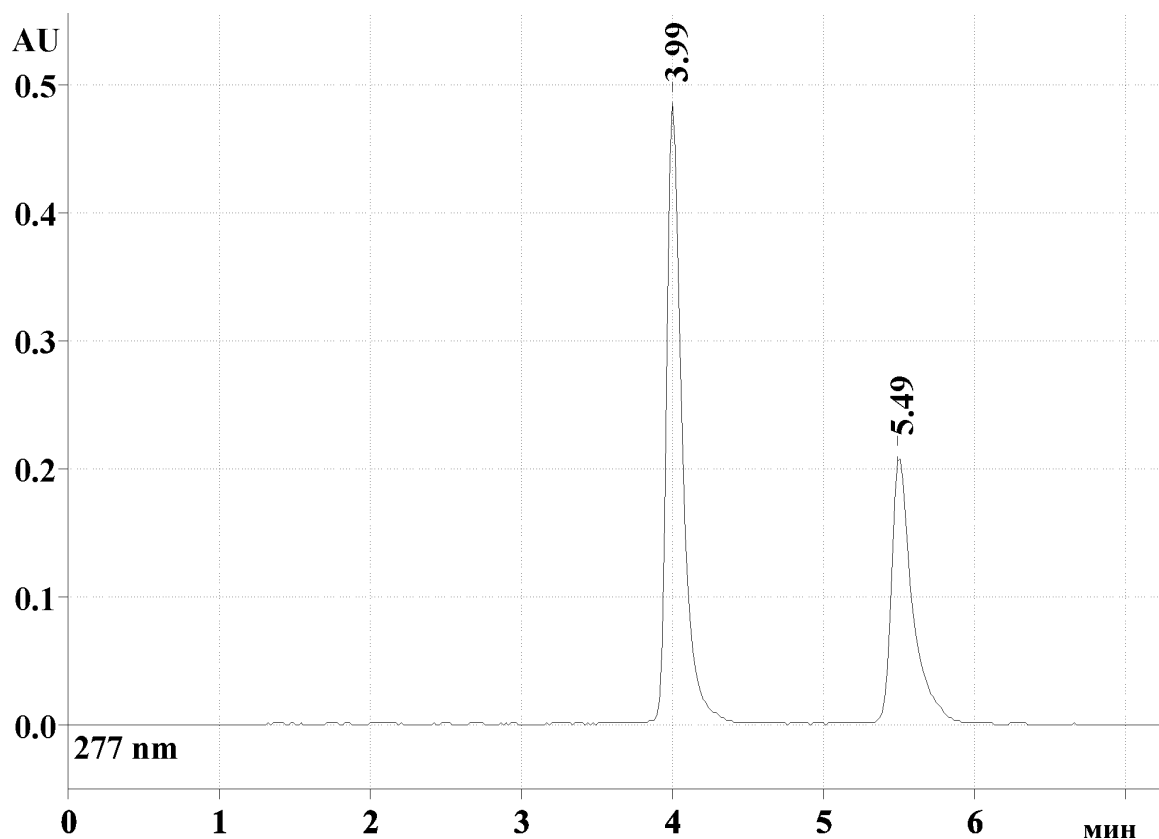


Рис. 6. Хроматограмма раствора, содержащего ципрофлоксацин (5,49 мин) и его этилендиаминовый аналог (3,99 мин), в ПФ ацетонитрил – фосфатный буфер + тетрабутиламмония дигидрофосфат 3 ммоль/л (рН 2,5) 10:90.

сужение пика пefлоксацина привело к увеличению его высоты и, соответственно, “зашкаливанию” детектора. Эффективность колонки по норфлоксацину в данных условиях составила около 4300 т.т., фактор симметрии – 0,84. Аналогичные параметры для пefлоксацина составили 8600 и 1,67. Разрешение между пиками значимо не изменилось, составив 1,19.

Для улучшения разделения пиков норфлоксацина и пefлоксацина было увеличено время удерживания за счет дополнительного снижения содержания в ПФ ацетонитрила (рис. 5). Разрешение при этом составило 1,75, однако из рис. 5 видно, что полное разделение пиков не достигнуто. В данных условиях также наблюдается “двоение” пика пefлоксацина (рис. 5 А).

Несмотря на то, что для норфлоксацина и пefлоксацина не удалось достичь полного разделения пиков, в выбранных условиях примеси, имеющие сходное с лекарственным веществом строение, могут хорошо отделяться от главного компонента. На рис. 6 представлена хроматограмма раствора, содержащего ципрофлоксацин и его этилендиаминовый аналог. Разрешение в данном случае составило 7,7.

ВЫВОДЫ

1. При разработке методик анализа фторхинолонов по

разделу нормативной документации “посторонние примеси” с использованием обращено-фазовой ВЭЖХ необходимо использовать в качестве базовой подвижную фазу ацетонитрил – [фосфатный буфер + тетрабутиламмония дигидрофосфат 1 ммоль/л (рН 2,5)] 10:90.

2. Увеличение концентрации тетрабутиламмония до 3 ммоль/л не оказывает существенного влияния на разделение пиков.

3. Увеличение времени удерживания за счет снижения концентрации ацетонитрила улучшает разделение пиков. Однако одновременно может наблюдаться искажение пиков веществ, находящихся в высокой концентрации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. – Рига: Зинатне, 1988. – 390 с.
2. British Pharmacopoeia (2001).
3. European Pharmacopoeia, 4th ed. (2002).
4. The United States Pharmacopoeia, 27th revision (2004).
5. W.O. Foye, T.L. Lemke, D.A. Williams. Principles of Medicinal Chemistry. 4th ed, Williams & Wilkins (1995)