

УДК

## ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ГРУППЫ ФТОРХИНОЛОНОВ III И IV ПОКОЛЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ВЭЖХ

© 2004 г. А.А. Коновалов, В.Л. Дорофеев, А.П. Арзамасцев

*Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова*

Показано, что при анализе спарфлоксацина и моксифлоксацина методом ВЭЖХ, добавление в подвижную фазу ион-парного реагента существенно повышает эффективность колонки и симметричность пиков анализируемых соединений. Установлено, что в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ оптимальные значения хроматографических параметров наблюдаются в подвижной фазе ацетонитрил – вода (рН 2,5; фосфатный буфер, тетрабутиламмония йодид 1 ммоль/л) 15:85 при температуре колонки 40°C. Разработанные методики могут быть использованы при анализе субстанций и лекарственных препаратов спарфлоксацина и моксифлоксацина по разделам нормативной документации “подлинность” и “количественное определение”.

### ВВЕДЕНИЕ

Спарфлоксацин и моксифлоксацин являются синтетическими противомикробными лекарственными средствами группы фторхинолонов III и IV поколений, соответственно. Они обладают широким антибактериальным спектром и высокой биодоступностью при пероральном применении, что делает их средствами выбора при лечении многих инфекционных заболеваний [1, 5]. Однако недостаточно изучен анализ данных лекарственных средств химическими и физико-химическими методами, в частности, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В зарубежных фармакопеях [4, 7, 8] на данный момент они не представлены. Задачей настоящей работы являлось установление оптимальных условий для анализа спарфлоксацина и моксифлоксацина с использованием метода ВЭЖХ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Объекты исследования

Рабочий стандартный образец спарфлоксацина, Dr.Reddy's Laboratories Ltd., Индия. Стандартный образец моксифлоксацина гидрохлорида 96,1%, Bayer AG, Германия.

#### Приготовление испытуемых растворов

10 мг рабочего стандартного образца спарфлоксацина или стандартного образца моксифлоксацина гидрохлорида помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 0,01 М растворе кислоты хлористоводородной при непрерывном перемешивании в течение 5 мин. Объем раствора доводили до метки тем же растворителем.

2,5 мл полученного раствора помещали в мерную

колбу вместимостью 25 мл, доводили объем раствора до метки 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Концентрации полученных растворов спарфлоксацина и моксифлоксацина гидрохлорида 20 мкг/мл.

#### Хроматографические условия

Исследование проводили в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ.

В работе использовали градиентный ВЭЖХ хроматограф BISCHOFF (Швейцария). Колонка PRONTOSIL AQ-120 (250 мм × 4 мм, C<sub>18</sub>, 5 мкм), предколонка PRONTOSIL AQ-120 (14 мм × 4 мм, C<sub>18</sub>, 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 298 нм для спарфлоксацина и 296 нм для моксифлоксацина.

#### Подвижная фаза (ПФ):

ПФ I. Ацетонитрил – вода (рН 2,5; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 20:80.

ПФ II. Ацетонитрил – вода (рН 2,5; фосфатный буфер) 20:80.

ПФ III. Ацетонитрил – вода (рН 2,5; фосфатный буфер с добавлением тетрабутиламмония йодида в концентрации 1 ммоль/л) 15:85.

Управление прибором и расчет хроматографических параметров осуществляли с использованием программы “Мультихром” (версия 2.1 для Windows®, Ampersand Ltd.) на персональном компьютере типа IBM PC.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор значения рН для водного компонента ПФ был

основан на кислотно-основных свойствах фторхинолонов. Данные лекарственные вещества являются амфолитами, так как содержат в молекуле одновременно кислотные и основные центры. В случае спарфлоксацина и моксифлоксацина – это вторичный алифатический атом азота и карбоксильная группа (рис. 1).

В связи с этим необходимо создание такого значения рН ПФ, при котором молекулы данных веществ будут находиться преимущественно в одной ионной форме, чтобы предотвратить размывание хроматографической зоны. Изoeлектрическая точка фторхинолонов находится при значении рН около 7 (для аналогичного по структуре ципрофлоксацина – 7,4 [9]). Поскольку использование ПФ с рН более 8,0 на стандартной колонке с привитой фазой исключено, то было решено создать кислую среду с использованием ортофосфорной кислоты. При значении рН менее 3,0 подавляющее большинство молекул спарфлоксацина и моксифлоксацина протонируется по вторичному алифатическому атому азота – то есть находится в растворе в виде катионов. Таким образом, используется “режим подавления ионизации” карбоксильной группы с одновременной фиксацией соотношения ионизированной и неиони-

зированной форм основания.

На рис. 2 и 3 представлены хроматограммы испытуемых растворов в ПФ I. В табл. 1 представлены основные хроматографические характеристики спарфлоксацина и моксифлоксацина, имеющие значение при оценке пригодности хроматографической системы в фармакопейном анализе: эффективность колонки по основному пику (число теоретических тарелок N) и фактор симметрии (Т). Также указано абсолютное время удерживания (t<sub>r</sub>).

В ПФ I, содержащей в качестве водного компонента раствор кислоты ортофосфорной с рН 2,5, эффективность составила около 7000 теоретических тарелок для спарфлоксацина и 8300 – для моксифлоксацина. Данные значения являются относительно высокими, поскольку при разработке методик фармакопейного анализа обычно ориентируются на минимальное значение эффективности 2000 теоретических тарелок. Но, в то же время, значения фактора симметрии пиков анализируемых веществ в данной ПФ составили около 1,8 для спарфлоксацина и 2,1 для моксифлоксацина, что в общем случае неприемлемо, поскольку стандартное фармакопейное требование для фактора симметрии – 0,8-1,5 [4, 7].

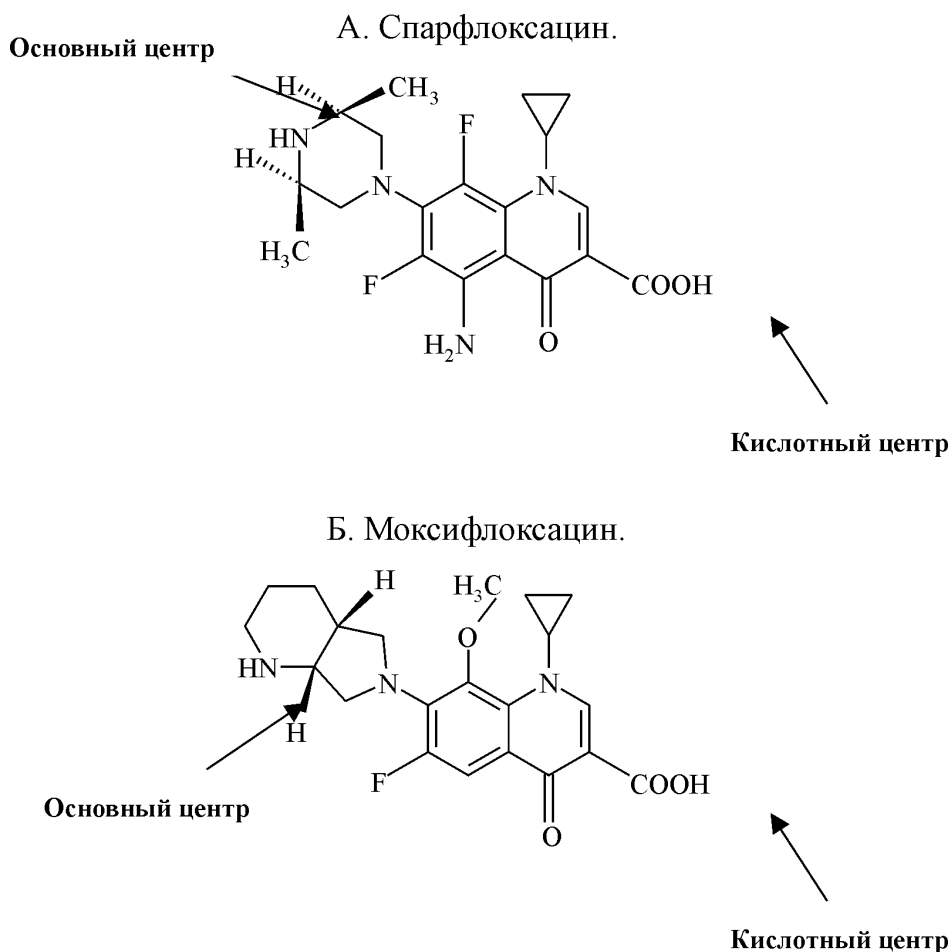


Рис. 1. Структура спарфлоксацина и моксифлоксацина.

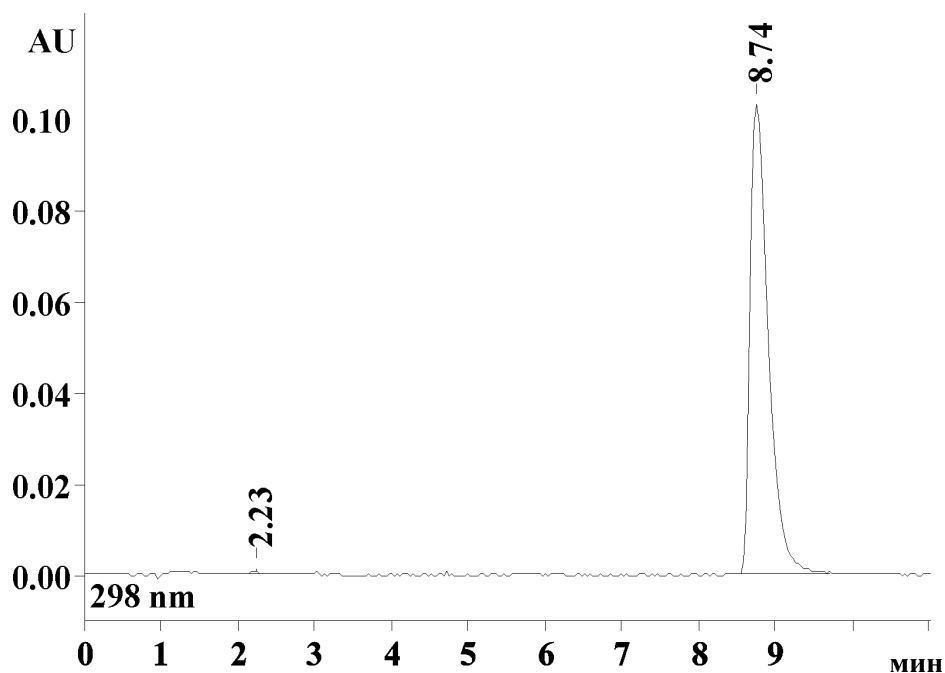


Рис. 2. Хроматограмма раствора спарфлоксацина 20 мкг/мл в ПФ ацетонитрил – вода (рН 2,5;  $H_3PO_4$ ) 20:80 (ПФ I).

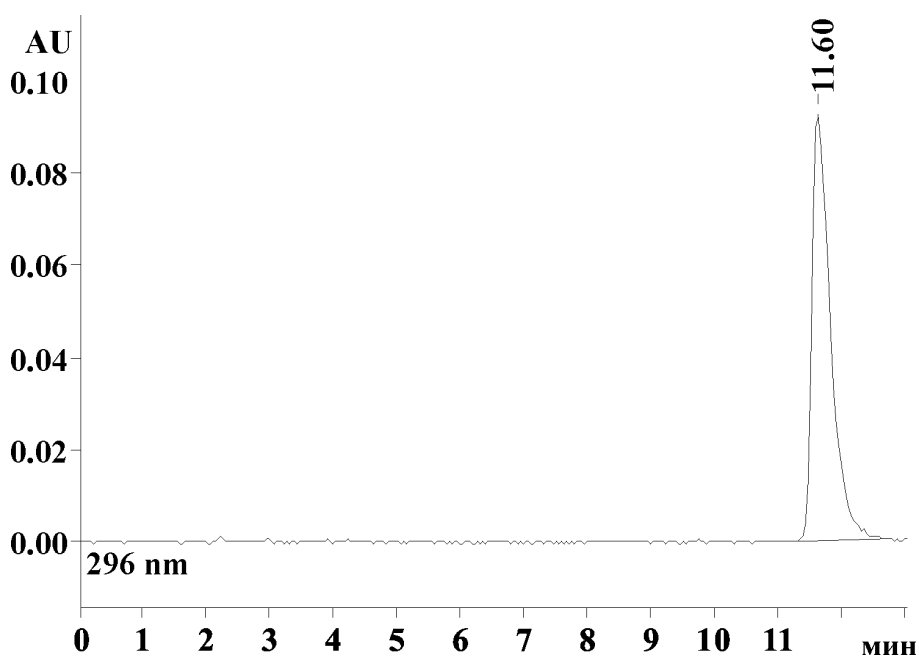


Рис. 3. Хроматограмма раствора моксифлоксацина гидрохлорида 20 мкг/мл в ПФ ацетонитрил – вода (рН 2,5;  $H_3PO_4$ ) 20:80 (ПФ I).

Тогда для уменьшения размывания хроматографической зоны, то есть фактически для повышения однородности ионного состава анализируемых веществ, была использована ПФ II, содержащая в качестве водного компонента фосфатный буферный раствор с тем же значением рН 2,5. На рис. 4 и 5 представлены хроматограммы испытуемых растворов в ПФ II.

В ПФ II эффективность составила около 9300 теоретических тарелок для спарфлоксацина и 8200

для моксифлоксацина, а значения фактора симметрии – около 1,5 для спарфлоксацина и 1,4 для моксифлоксацина. Очевидно, что фосфатный буфер оправдывает свое назначение, повышая эффективность колонки на 30-35% для спарфлоксацина и улучшая форму пика обоих соединений. Тем не менее, значение фактора симметрии для спарфлоксацина в условиях ПФ II находится на грани допустимого.

Тогда для увеличения эффективности системы

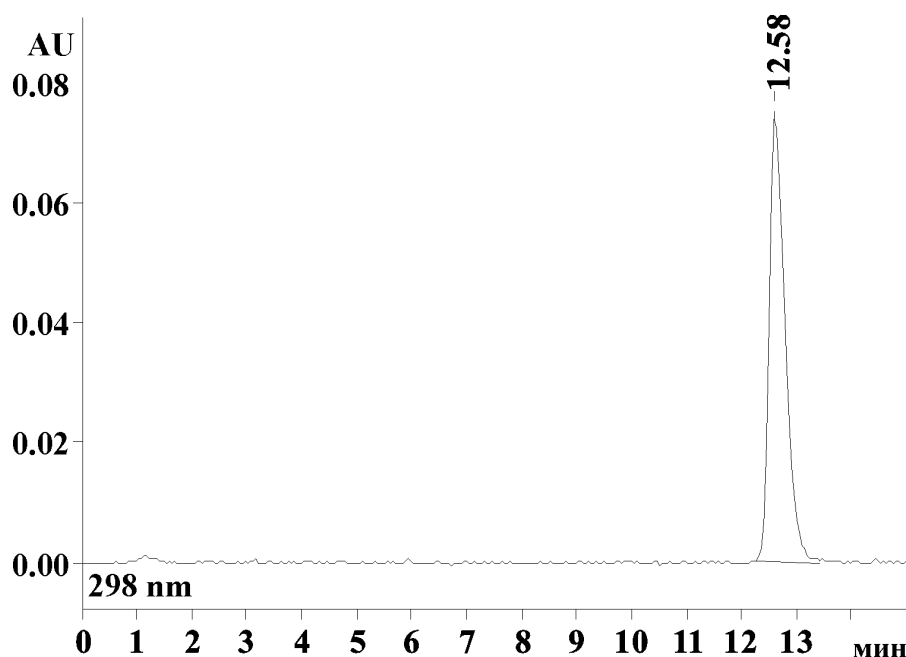


Рис. 4. Хроматограмма раствора спарфлоксацина 20 мкг/мл в ПФ ацетонитрил – вода (рН 2,5; фосфатный буфер) 20:80 (ПФ II).

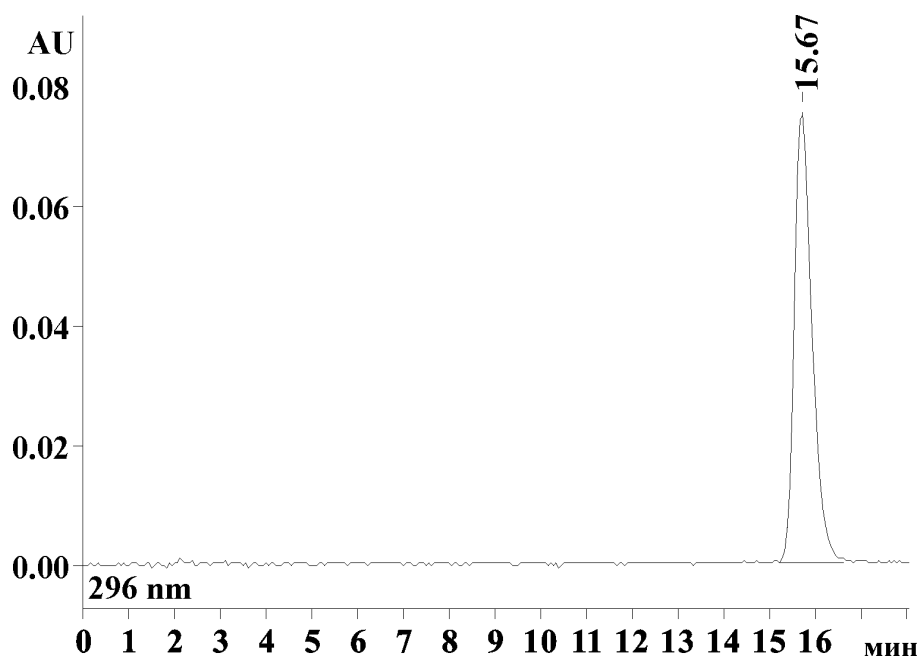


Рис. 5. Хроматограмма раствора моксифлоксацина гидрохлорида 20 мкг/мл в ПФ ацетонитрил – вода (рН 2,5; фосфатный буфер) 20:80 (ПФ II).

Таблица 1

Хроматографические характеристики моксифлоксацина и спарфлоксацина

Лек. вещество	Параметр	ПФ I	ПФ II	ПФ III
Спарфлоксацин	t <sub>r</sub> , мин	8,7	12,6	8,1
	N	7000	9300	18800
	T	1,80	1,51	1,26
Моксифлоксацин	t <sub>r</sub> , мин	11,6	15,7	12,9
	N	8300	8200	15200
	T	2,09	1,38	1,10

было применено хроматографирование с динамическим модификатором – тетрабутиламмония йодидом. Обычно тетрабутиламмоний, заряженный положительно, используется как ион-парный реагент при анализе отрицательно заряженных соединений, например, карбоновых кислот. Тогда образование ионной пары наиболее полно происходит в слабо-щелочной среде при рН около 7,4 [2, 6]. Для фторхинолонов это соответствует или находится близко к изоэлектрической точке. Поэтому, несмотря на образование ионной пары за счет карбоксильной группы,

будет отсутствовать фиксация соотношения ионизированной и неионизированной форм основания.

Учитывая вышесказанное, тетрабутиламмоний был добавлен в фосфатный буфер со значением рН 2,5. При этих условиях ионная пара с положительно заряженным сорбатом не образуется: тетрабутиламмоний связывается неполярной частью молекулы с октадецильными радикалами неподвижной фазы, за счет чего она приобретает положительный заряд, обращенный в сторону ПФ. Известно, что при таком модифицировании время удерживания положительно

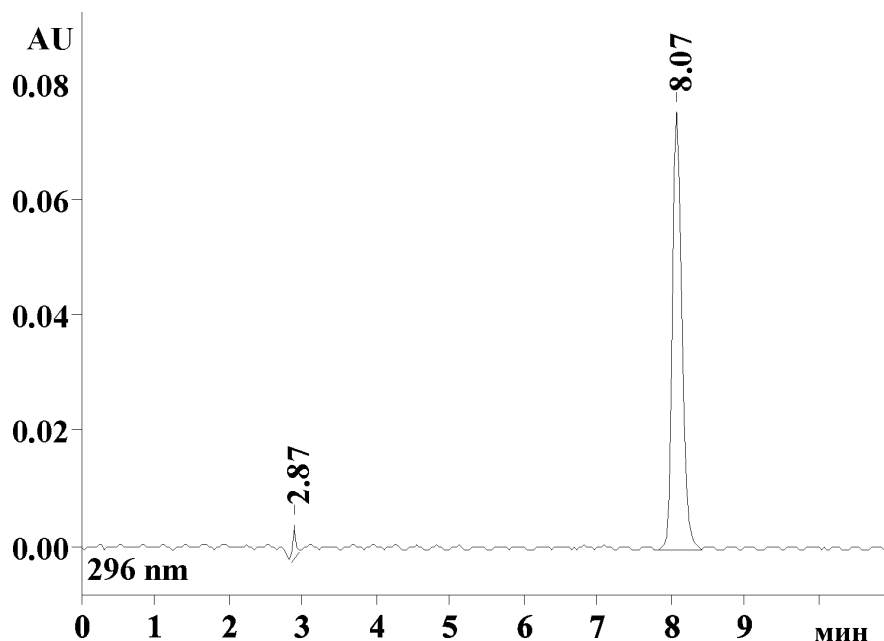


Рис. 6. Хроматограмма раствора спарфлоксацина 20 мкг/мл в ПФ ацетонитрил – вода (рН 2,5; фосфатный буфер, тетрабутиламмония йодид 1 ммоль/л) 15:85 (ПФ Ш).

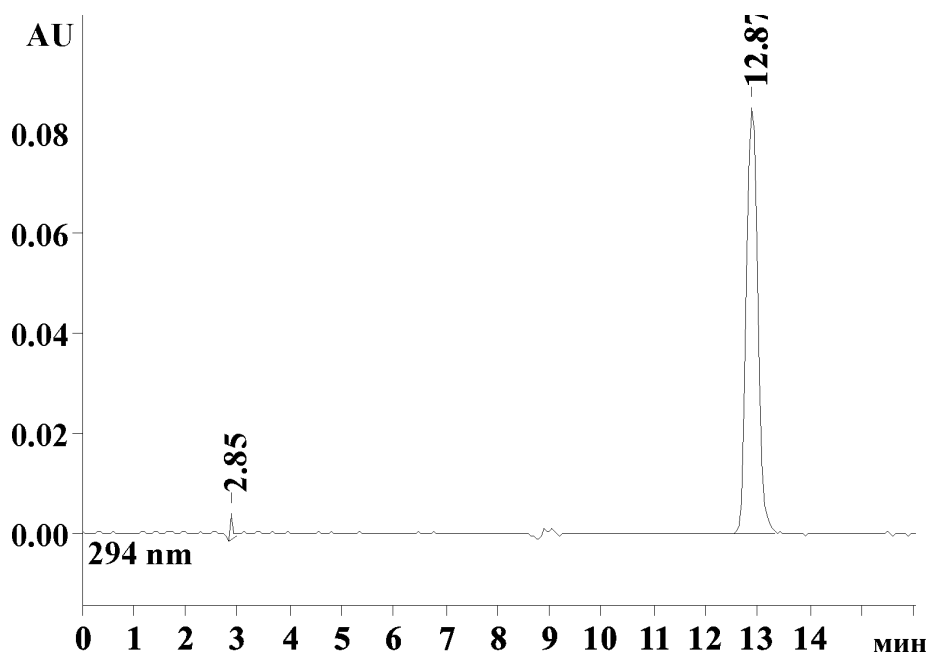


Рис. 7. Хроматограмма раствора моксифлоксацина гидрохлорида 20 мкг/мл в ПФ ацетонитрил – вода (рН 2,5; фосфатный буфер, тетрабутиламмония йодид 1 ммоль/л) 15:85 (ПФ Ш).

заряженного сорбата уменьшается [3], что и произошло с анализируемыми фторхинолонами. Поэтому для сохранения приемлемого времени удерживания была уменьшена элюирующая сила ПФ за счет снижения содержания в её составе ацетонитрила (рис. 6 и 7).

Как видно из табл. 1, использование динамического модификатора значительно увеличило эффективность колонки и симметрию пиков анализируемых соединений.

### ВЫВОДЫ

1. Установлено, что в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ наиболее оптимальные значения эффективности, фактора симметрии и времени удерживания пиков спарфлоксацина и моксифлоксацина наблюдаются в подвижной фазе ацетонитрил – вода (pH 2,5; фосфатный буфер, тетрабутиламмония йодид 1 ммоль/л) 15:85 при температуре колонки 40°C.
2. Разработанные методики могут быть использованы при анализе субстанций и лекарственных препаратов спарфлоксацина и моксифлоксацина по разделам нормативной документации “подлинность” и “количественное определение”.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Падейская Е. Н., Яковлев В. П.* Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике. – М.: ЛОГАТА, 1998. – 352 с.
2. *Стыскин Е.Л., Ицксон Л.Б., Брауде Е.В.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. – М., 1986. – 214 с.
3. *Шатц В.Д., Сахартова О.В.* Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. – Рига: Зинатне, 1988. – 390 с.
4. *British Pharmacopoeia* (2001).
5. *Drug Information for the Health Care Professional USP DI, 23<sup>rd</sup> ed.*, 2003.
6. *Edward L. Johnson, Robert Stevenson.* Basic liquid chromatography. – California: Varian Associates, Inc., 1978.
7. *European Pharmacopoeia, 4th ed.* (2002).
8. *The United States Pharmacopoeia, 27th revision* (2004).
9. *W.O. Foye, T.L. Lemke, D.A. Williams.* Principles of Medicinal Chemistry. 4<sup>th</sup> ed, Williams & Wilkins (1995).