

УДК

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ГРУППЫ ФТОРХИНОЛОНОВ

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

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

Показано, что при анализе лекарственных средств группы фторхинолонов методом ВЭЖХ использование буферных растворов в составе подвижной фазы и добавление ион-парных реагентов существенно повышает эффективность колонки и симметричность пиков анализируемых соединений. Установлено, что в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ оптимальные значения параметров хроматографических пиков фторхинолонов наблюдаются в подвижной фазе, содержащей в качестве водного компонента фосфатный буфер с рН 2,5 с добавлением тетрабутиламмония в концентрации 1 ммоль/л. Разработанная методика может быть использована при анализе субстанций и лекарственных препаратов фторхинолонов по разделам нормативной документации “подлинность” и “количественное определение”.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время противомикробные средства группы фторхинолонов находят всё более широкое применение в медицинской практике [1, 5]. В зарубежных фармакопеях [4, 7, 8] из всех фторхинолонов описаны ципрофлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин и пефлоксацин. Метод ВЭЖХ используется при фармакопейном анализе данных лекарственных средств, однако при этом применяются различные условия хроматографирования.

Задачей настоящей работы являлась разработка унифицированной методики установления подлинности 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. Офлоксацин: рабочий стандарт, Aventis Pharma Ltd, Франция.
5. Ломефлоксацина гидрохлорид: субстанция, Searle, Франция.

#### Приготовление испытуемых растворов

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 10 мг испытуемой субстанции, растворяли в 0,01 М растворе кислоты хлористоводородной при непре-

рывном 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. Концентрация испытуемого раствора 20 мкг/мл.

#### Условия хроматографирования

Исследование проводили в условиях обращено-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 длинах волн: 277 нм (ципрофлоксацин, норфлоксацин, пефлоксацин), 288 нм (ломефлоксацин), 294 нм (офлоксацин).

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 состава ПФ был основан на кислотно-основных свойствах фторхинолонов. Данные лекарственные вещества являются амфолитами, так как содержат в молекуле одновременно кислотные и

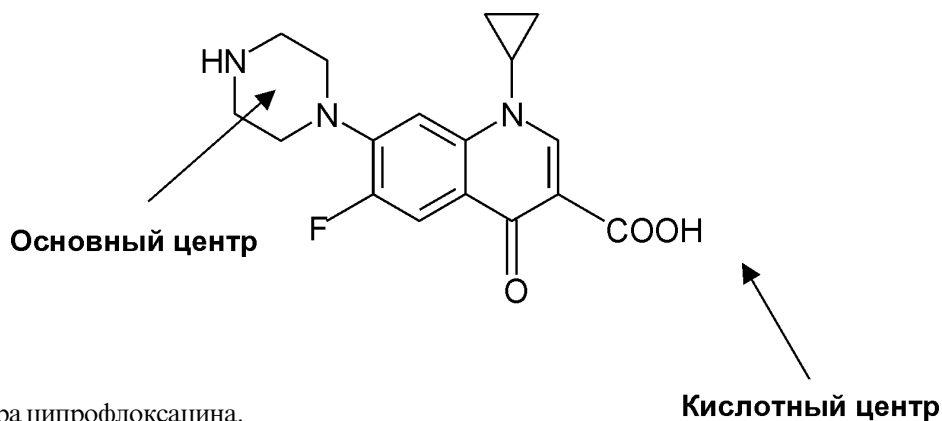


Рис. 1. Структура ципрофлоксацина.

основные центры. Например, в молекуле ципрофлоксацина – это вторичный алифатический атом азота и карбоксильная группа (рис. 1).

Было исследовано влияние подвижных фаз различного состава на хроматографические характеристики фторхинолонов. При этом соотношение ацетонитрила и водного компонента в элюенте составляло обычно от 25:75 до 10:90, соответственно, что говорит о высокой подвижности данных соединений на обращенной фазе.

Для получения оптимальных параметров удерживания необходимо создание такого значения pH ПФ, при котором молекулы данных веществ будут находиться преимущественно в одной ионной форме, чтобы предотвратить размывание хроматографичес-

кой зоны. Известно, что изоэлектрическая точка фторхинолонов находится при значении pH около 7 (для ципрофлоксацина – 7,4 [9]). Поскольку использование ПФ с pH более 8,0 на стандартной колонке с привитой фазой исключено, то необходимо использовать ПФ с кислыми значениями pH.

Действительно, при использовании в качестве ПФ смеси ацетонитрил – раствор аммония ацетата без стабилизации значения pH наблюдается двоение (ципрофлоксацин, пефлоксацин) либо сильное размывание пиков фторхинолонов (офлоксацин) даже при небольших временах удерживания (рис. 2). Для офлоксацина при этих условиях эффективность составила около 600 теоретических тарелок (т.т.), фактор симметрии – 5,3.

В ПФ ацетонитрил – фосфатный буфер pH 4,44

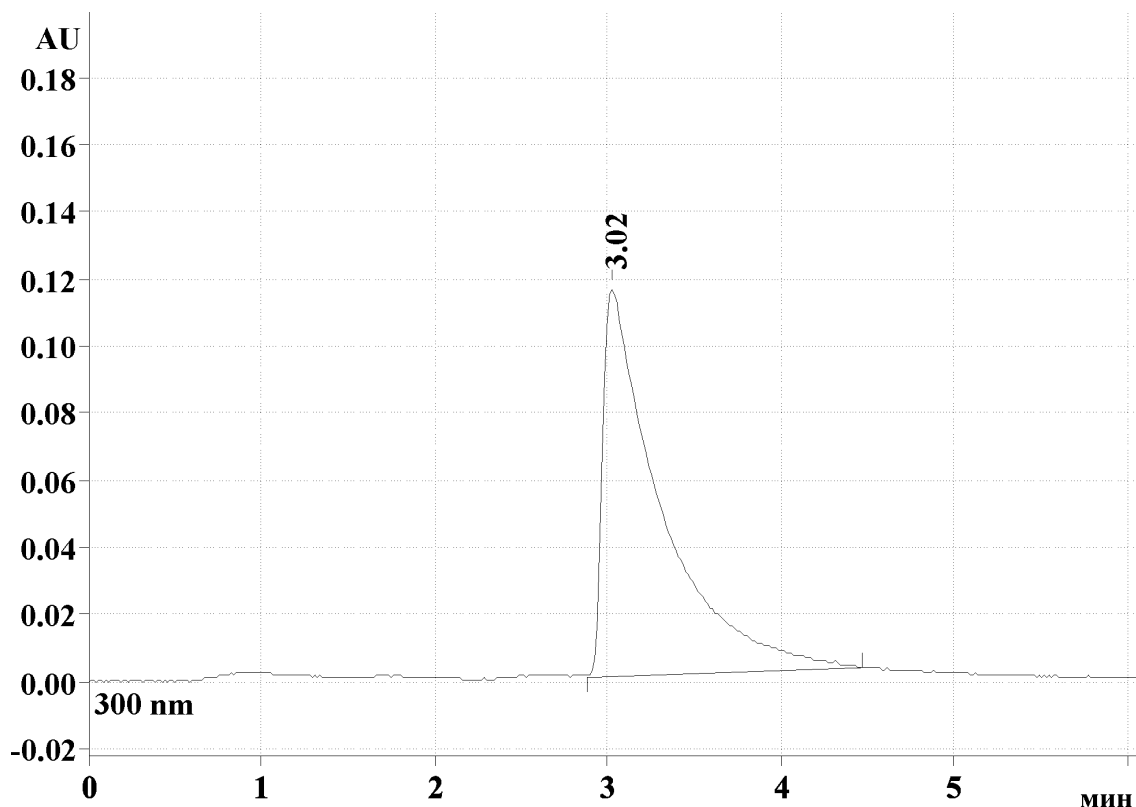


Рис. 2. Хроматограмма раствора офлоксацина в ПФ ацетонитрил – раствор аммония ацетата 50:50.

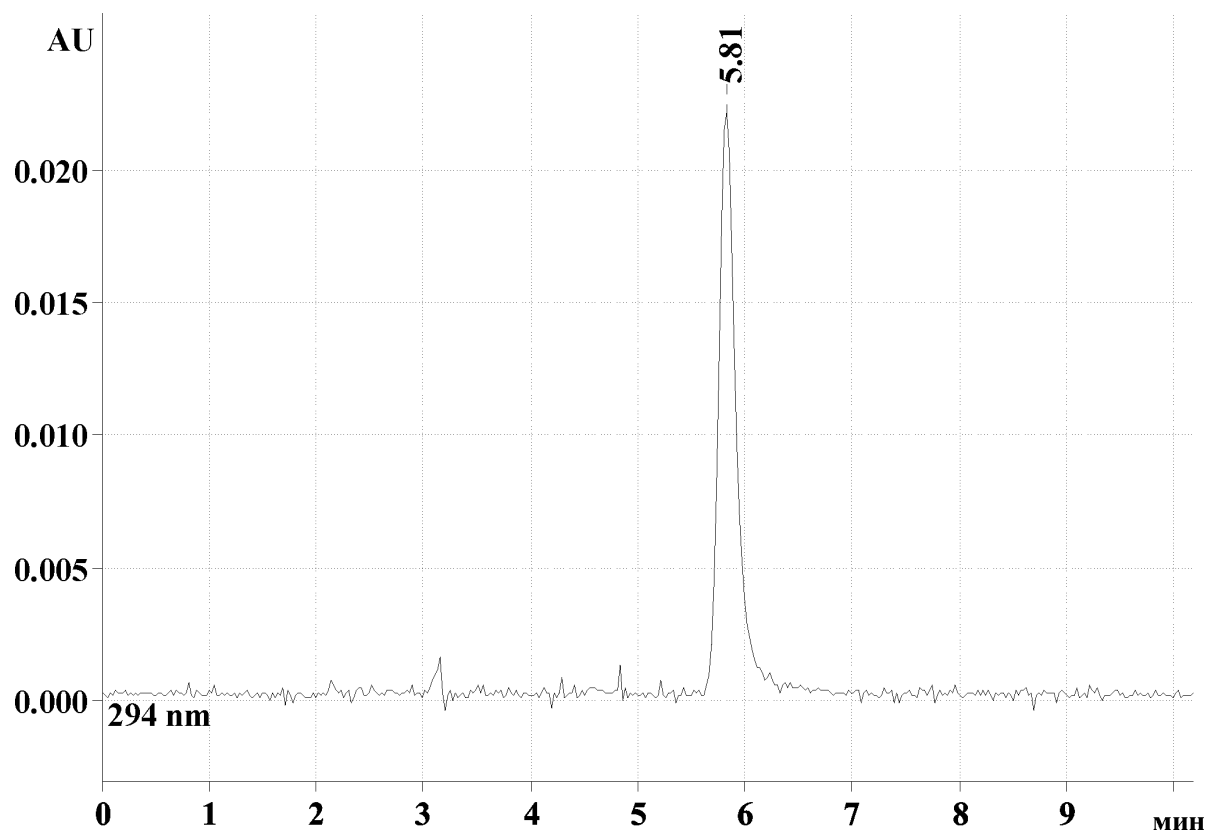


Рис. 3. Хроматограмма раствора ципрофлоксацина в ПФ ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 4,44) 20:80.

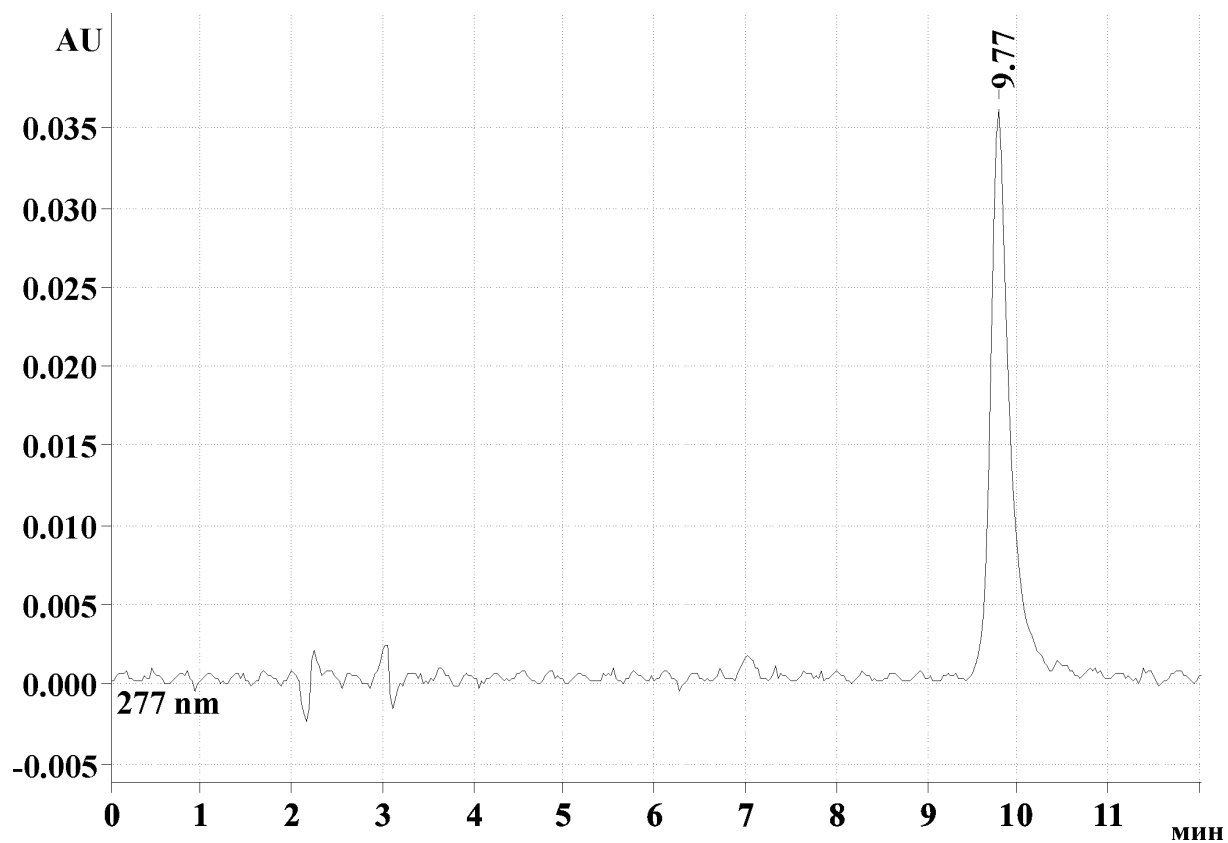


Рис. 4. Хроматограмма раствора ципрофлоксацина в ПФ ацетонитрил – вода (рН 2,5;  $H_3PO_4$ ) 15:85.

параметры пиков значительно улучшаются (рис. 3). Например, для ципрофлоксацина при этих условиях эффективность составила около 7300 т.т., фактор симметрии – 1,4. Данное значение эффективности является относительно высоким, поскольку при разработке методик фармакопейного анализа обычно ориентируются на минимальное значение эффективности 2000 т.т. Симметрия пика также удовлетворительная, поскольку стандартное фармакопейное требование для этого параметра – 0,8-1,5 [4, 7]. Однако для пefлоксацина и ломефлоксацина фактор симметрии в этих условиях находится на грани допустимого уровня.

При низких значениях pH подавляющее большинство молекул фторхинолонов протонируется по вторичному алифатическому атому азота – то есть находится в растворе в виде катионов. Это позволяет использовать “режим подавления ионизации” карбоксильной группы с одновременной фиксацией соотношения ионизированной и неионизированной форм основания [2, 6].

Тем не менее, простое снижение pH водного компонента до 2,5 с использованием кислоты ортофосфорной только увеличило эффективность, но не улучшило симметрию пика (рис. 4). Для ципрофлоксацина в этих условиях эффективность составила около 11400 т.т., фактор симметрии – 1,55. Использование фосфатного буфера с pH 2,5 привело к ана-

логичным результатам (рис 5): эффективность колонки по пику ципрофлоксацина около 9500 т.т., фактор симметрии – около 1,5.

Для улучшения симметрии пика в подвижную фазу, содержащую фосфатный буфер с pH 2,5, в качестве динамического модификатора был добавлен триэтиламин. При таком значении pH молекула триэтиламина ионизирована. Данное соединение 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 заряженного сорбата уменьшается [3] (рис. 6). При этих условиях для ципрофлоксацина эффективность составила около 12500 т.т., фактор симметрии – 1,35.

Еще большего увеличения симметрии пика удалось добиться при использовании в качестве динамического модификатора тетрабутиламмония. Для сохранения приемлемого времени удерживания была уменьшена элюирующая сила ПФ за счет снижения содержания в её составе ацетонитрила (рис. 7).

При использовании в составе ПФ тетрабутиламмония эффективность колонки по пику ципрофлоксацина составила около 9900 т.т., фактор симметрии – около 1,2.

Использование в составе ПФ тетрабутиламмония

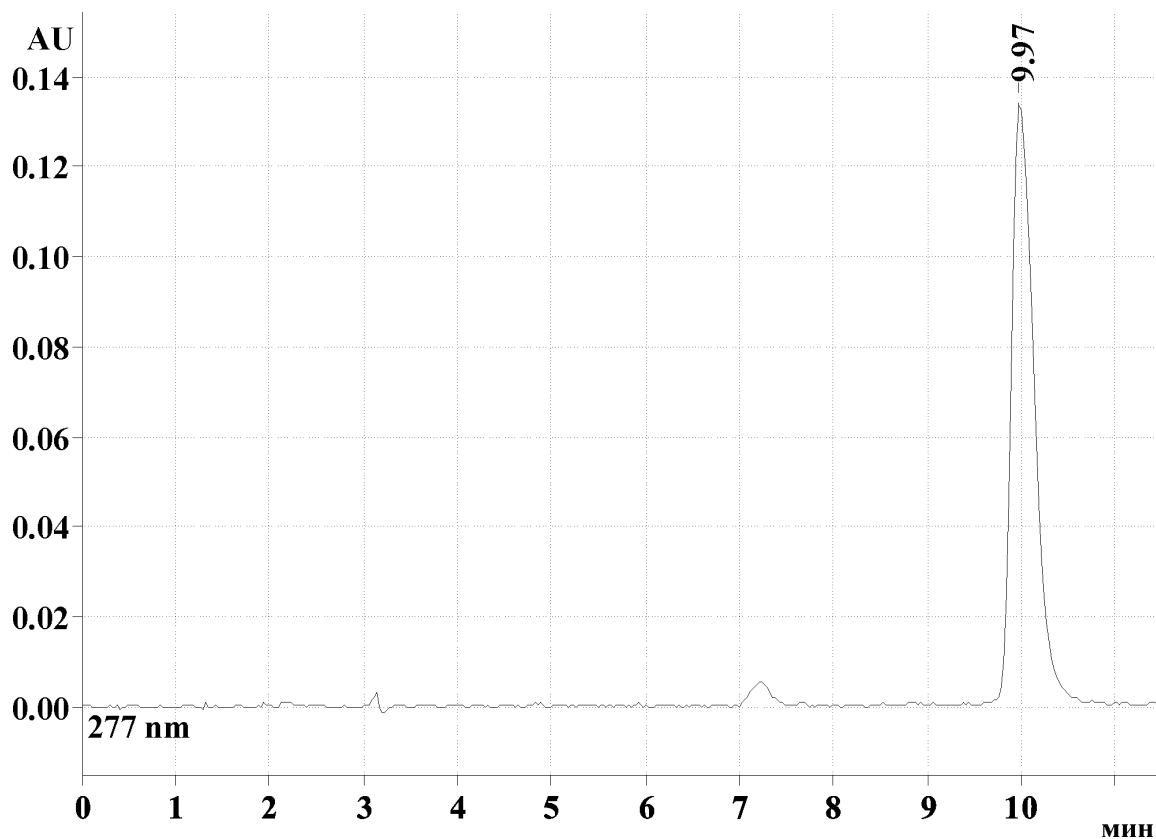


Рис. 5. Хроматограмма раствора ципрофлоксацина в ПФ ацетонитрил – фосфатный буфер (pH 2,5) 15:85.

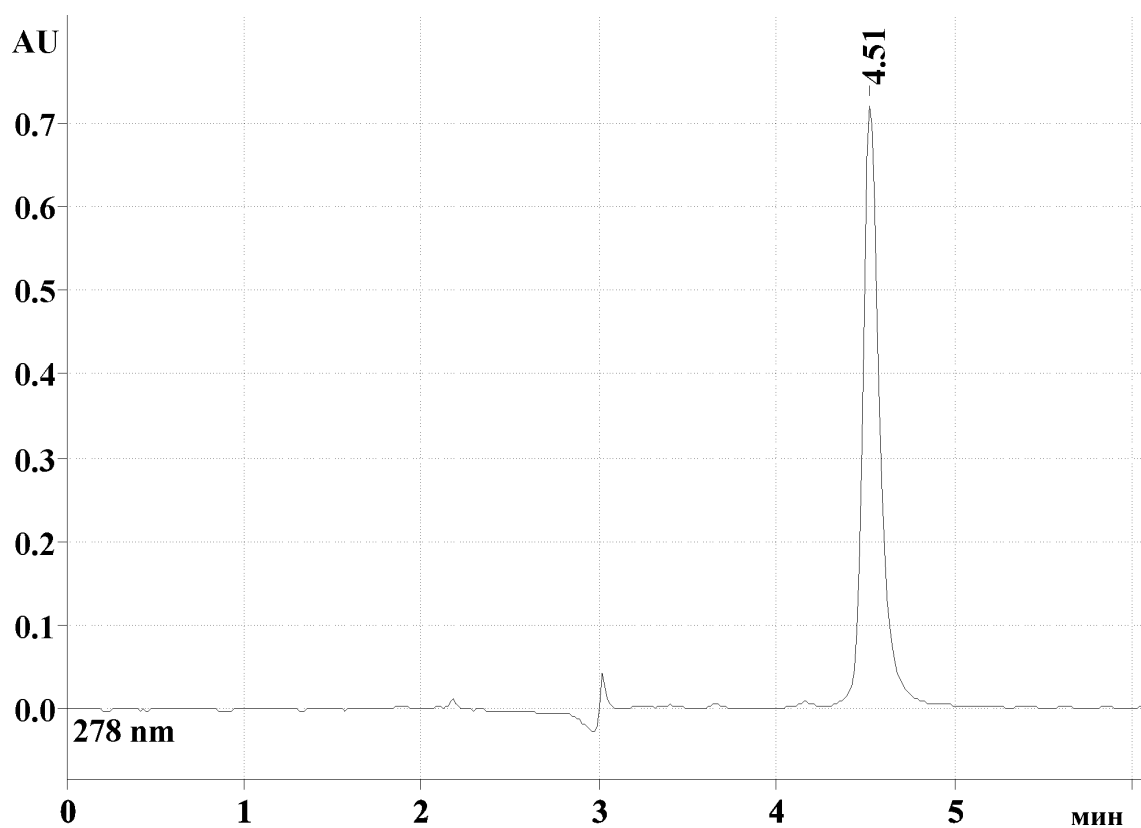


Рис. 6. Хроматограмма раствора ципрофлоксацина в ПФ ацетонитрил – фосфатный буфер + триэтиламин (рН 2,5) 20:80.

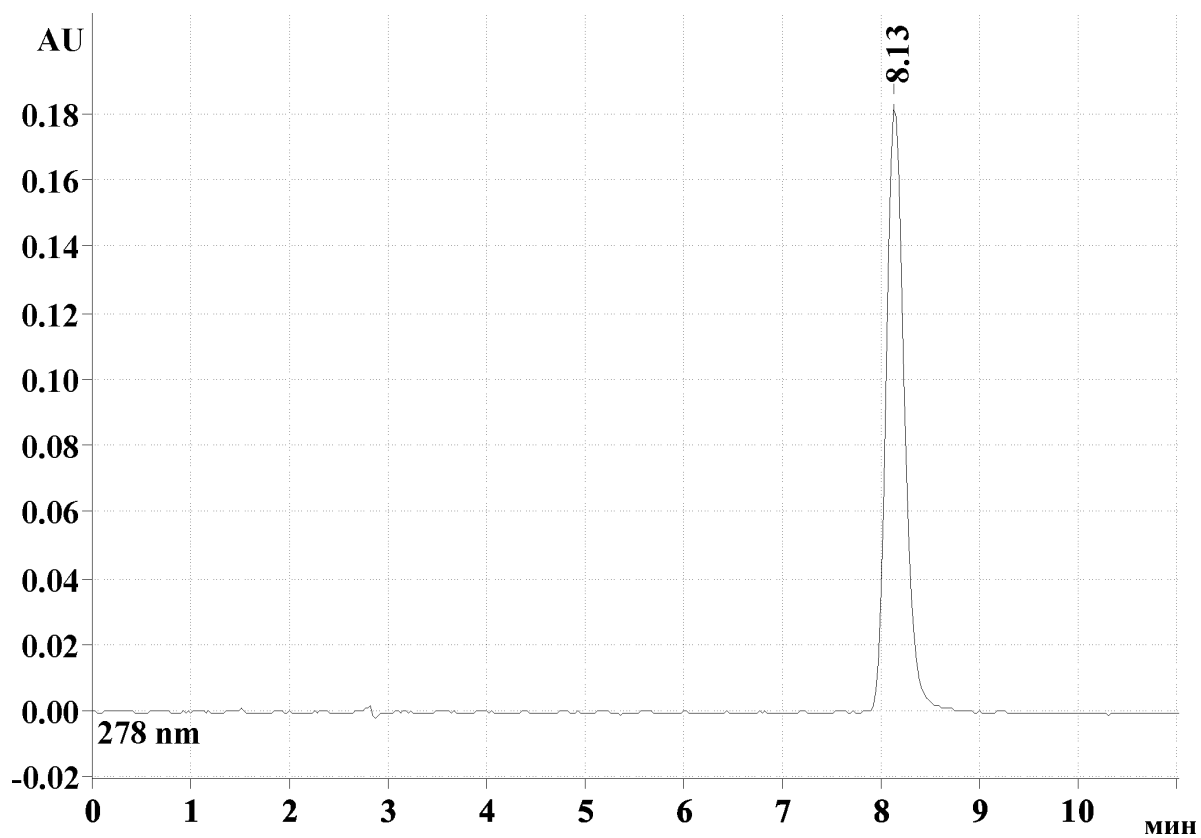


Рис. 7. Хроматограмма раствора ципрофлоксацина в ПФ ацетонитрил – фосфатный буфер + тетрабутиламмония йодид 1 ммоль/л (рН 2,5) 10:90.

**Хроматографические характеристики фторхинолонов (20 мкг/мл) в ПФ ацетонитрил – фосфатный буфер + тетрабутиламмония йодид 1 ммоль/л (рН 2,5) 10:90**

Фторхинолон	Время удерживания, мин	Число теоретических тарелок	Фактор симметрии
Ципрофлоксацин	8,1	9900	1,21
Норфлоксацин	7,3	9100	1,15
Пефлоксацин	8,2	18400	1,45
Офлоксацин	6,7	15500	1,43
Ломефлоксацин	7,2	6600	1,20

в концентрации 3 ммоль/л не приводит к значительному повышению эффективности и симметрии пиков по сравнению с концентрацией 1 ммоль/л, но уменьшает время удерживания. В данной ПФ немного затруднено управление подвижностью анализируемых соединений, так как изменение концентрации ацетонитрила даже на 1% приводит к изменению времени удерживания фторхинолонов на несколько минут.

Было также показано, что при хроматографировании спиртовых растворов субстанций фторхинолонов, наблюдается значительное искажение пиков анализируемых веществ: размывание, “двоение”.

В табл. 1 представлены параметры пиков фторхинолонов при использовании ПФ, содержащей тетрабутиламмония йодид.

**ВЫВОДЫ**

1. В условиях обращено-фазовой ВЭЖХ оптимальные значения параметров хроматографических пиков фторхинолонов наблюдаются в подвижной фазе, содержащей в качестве водного компонента фосфатный буфер с рН 2,5 с добавлением тетрабутиламмония в концентрации 1 ммоль/л.
2. Разработанная методика может быть использована при анализе субстанций и лекарственных препаратов

фторхинолонов 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., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. – М., 1986. – 214 с.
3. *Шату 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).