

УДК

РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПАРАГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2005 г. А.В.Титова, М.А.Сумцов, Н.П.Садчикова

*ИКЛС ФГУ “НЦЭСМП” МЗ РФ, Москва
НИИ Фармация ММА им. И.М.Сеченова, Москва*

Найдены оптимальные условия разделения производных парагидроксибензойной кислоты (метилпарагидроксибензоат, пропилпарагидроксибензоат, этилпарагидроксибензоат, бутилпарагидроксибензоат и бензилпарагидроксибензоат, 4-гидроксибензойная кислота) методом ТСХ: пластинка “DC-Fertingplatten sil G-25 UV-254” фирмы “Mascnerey-Nagel+Co” DC, подвижная фаза спирт метиловый: вода (35:65). Методика может быть использована для подтверждения подлинности указанных соединений и определения родственных соединений в них.

ВВЕДЕНИЕ

В качестве консервантов при изготовлении лекарственных препаратов широко применяются производные парагидроксибензойной кислоты (ПГБК). К ним относятся метилпарагидроксибензоат (МПГБ), пропилпарагидроксибензоат (ППГБ), этилпарагидроксибензоат (ЭПГБ), бутилпарагидроксибензоат (БутПГБ) и бензилпарагидроксибензоат (БенПГБ). Сравнительный анализ требований зарубежных фармакопей [1, 2, 3] к качеству указанных веществ показал, что метод тонкослойной хроматографии используется только в оценке качества МПГБ, ППГБ и ЭПГБ для подтверждения их подлинности и нормирования в них содержания родственных соединений. Хроматографирование данной группы веществ рекомендовано проводить на хроматографической пластинке с октадецил силикагелем с индикатором в УФ-254 в подвижной фазе (ПФ), состоящей из кислоты уксусной ледяной, воды и спирта метилового в соотношении 1:30:70. Обнаружение зон адсорбции исследуемых веществ на хроматографической пластинке проводят в УФ свете при длине волны 254 нм.

Предварительные исследования хроматографического поведения производных ПГБК показали, что в описанных условиях БутПГБ и БенПГБ не делятся (рис.1), и указанная методика ТСХ может быть использована для подтверждения подлинности только МПГБ, ППГБ и ЭПГБ.

Настоящее исследование посвящено разработке унифицированной методики разделения всех указанных производных ПГБК методом ТСХ для включения её в проекты фармакопейных статей с целью подтверждения подлинности исследуемой группы веществ и оценки содержания в них родственных соединений.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

С целью поиска оптимальных условий анализа производных ПГБК методом ТСХ были рассмотрены системы растворителей и сорбенты, описанные в литературе и используемые для разделения указанной группы консервантов [4,5,6]. В результате анализа данных литературы установлено, что наилучшее разделение исследуемых соединений наблюдается на пластинках с силикагелем в подвижных фазах, содержащих воду. В этой связи было решено изучить хроматографическое поведение производных ПГБК в нейтральных и кислых системах растворителей на хроматографических пластинках “Silica gel 60 F254” фирмы “Merk” и “DC-Fertingplatten sil G-25 UV-254” фирмы “Mascnerey-Nagel+Co”.

Методика: на линию старта указанных хроматографических пластинок наносили по 2 мкл 0,5 % растворов ПГБК, МПГБ, ППГБ, ЭПГБ, БутПГБ, БенПГБ в ацетоне индивидуально и в смеси в одну точку и хроматографировали в ПФ на расстояние 15 см для пластинок фирмы “Merk” и 7 см для пластинок фирмы “Mascnerey-Nagel+Co”. Детектирование зон адсорбции соединений на пластинке проводили в УФ свете при длине волны 254 нм. Результаты эксперимента представлены в таблице 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как видно из полученных результатов (табл.1) четкое разделение производных ПГБК получено только на пластине “DC-Fertingplatten sil G-25 UV-254” фирмы “Mascnerey-Nagel+Co” в ПФ 3 как при индивидуальном, так и при суммарном нанесении исследуемых веществ (рис.2). При этом отмечено, что на хроматограмме вещества располагаются в последователь-

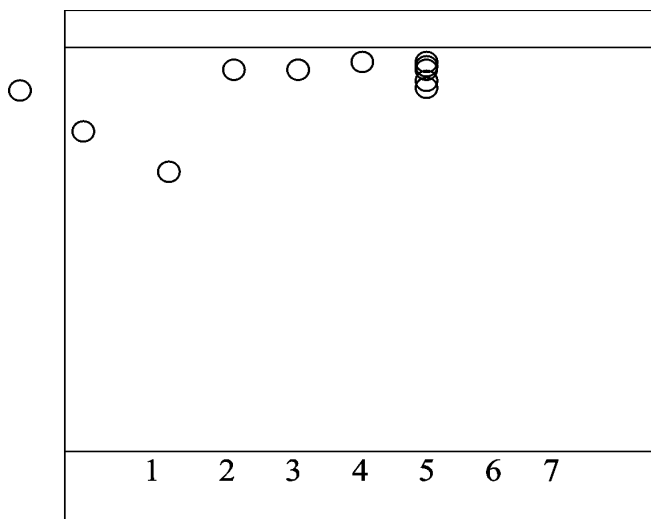


Рис. 1. Хроматограмма производных ПГБК в ПФ – уксусная кислота ледяная : вода : метанол (1: 30:70) на хроматографической пластинке $KC_{18}F$ 254 фирмы “Мерк”, Германия (№4803 800) индивидуально и в смеси (7): МГБ (1), ЭГБ (2), ПГБ (3), БугБ (4), БензГБ (5), ПГБК (6).

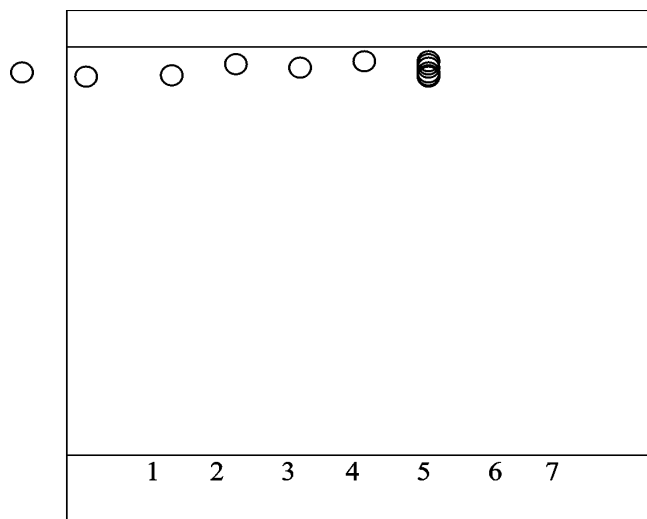


Рис. 2. Хроматографическое разделение производных ПГБК в ПФ-метанол:вода (35:65) на хроматографической пластинке DC-Fertingplatten sil G-25 UV – 254 фирмы “Masperey-Nagel+Co” при индивидуальном нанесении и в смеси (7): МПГБ (1), ЭПГБ (2), ППГБ (3), БутПГБ (4), БенПГБ (5), ПГБК (6).

Таблица 1

Значения R_f производных ПГБК в различных системах растворителей

Наименование вещества	V(l) Мм	Подвижная фаза											
		1		2		3		4		5		6	
		Сорбент											
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	1		
МПГБ	152,1	0,89	0,72	0,90	0,61	0,86	0,73	0,77	0,57	0,85	0,83		
ЭПГБ	166,2	0,90	0,70	0,83	0,50	0,86	0,65	0,66	0,40	0,86	0,85		
ППГБ	180,2	0,90	0,63	0,77	0,33	0,84	0,45	0,75	0,13	0,86	0,85		
БутПГБ	194,2	0,91	0,57	0,69	0,19	0,83	0,29	0,69	0,09	0,88	0,88		
БенПГБ	228,3	0,91	0,57	0,63	0,11	0,83	0,14	0,63	0,07	0,89	0,89		
4-ПГБК		0,90	0,81	0,96	0,93	0,93	0,90	0,83	0,90	0,89	0,85		

Примечание: Сорбент – 1. Silica gel 60 F254 фирмы “Merk”; 2. DC-Fertingplatten sil G-25 UV – 254 фирмы “Masperey-Nagel+Co”. Подвижная фаза - 1- ацетонитрил-вода (60:40); 2 – ацетонитрил-вода (20:80); 3 – спирт метиловый-вода (35:65); 4 – спирт метиловый-вода (20:80); 5 – спирт метиловый-вода-кислота уксусная ледяная (60:30:10); 6 – ацетонитрил-вода-кислота ледяная уксусная (60:30:10).

ности в соответствии с их молекулярной массой: от большего значения к меньшему (табл.1).

Разделение производных ПГБК на на хроматографической пластинке фирмы “Masperey-Nagel+Co” существенно зависит от количества воды в ПФ и не зависит от кислотности системы растворителей. Увеличение количества воды в составе ПФ с 65 % до 75 % привело к увеличению степени адсорбции веществ и БутПГБ и БенПГБ, имеющие наибольшую

молекулярную массу и расположенные в нижней части последовательности разделения производных ПГБК, не делились (табл.3). Снижение количества воды до 60 % и, соответственно, увеличение содержания спирта метилового с 35 % до 40 % в составе ПФ, наоборот, привело к увеличению подвижности производных ПГБК, но ЭПГБ и МПГБ, расположенные почти в верхней части последовательности разделения производных ПГБК, не делились.

Значения R_f производных ПГБК на активированных и не активированных хроматографических пластинках в ПФ спирт метиловый-вода (35:65)

Наименование вещества	Сорбент			
	1	1(акт)	2	2(акт)
МПГБ	1	0,9	0,71	0,71
ЭПГБ	1	0,9	0,60	0,57
ППГБ	1	0,9	0,43	0,40
БутПГБ	1	0,9	0,24	0,26
БенПГБ	1	0,9	0,11	0,11
4-ПГБК	1	0,9	0,93	0,93

Примечание: Сорбент – 1. Silica gel 60 F254 фирмы “Merk”; 2. DC-Fertingplatten sil G-25 UV – 254 фирмы “Mascnerey-Nagel+Co”.

Одним из способов увеличения разделяющей способности сорбента является его активирование. Активирование пластинок проводилось в сушильном шкафу при температуре 120 °С в течение 2 часов с последующим охлаждением их в эксикаторе. В результате проведенного эксперимента установлено, что активирование сорбента не оказало существенного влияния на разделение производных ПГБК в ПФ 3 (табл. 2) на обоих типах пластинок.

На пластинках “Silica gel 60 F254” фирмы “Merk” в отличие от аналогичных пластинок “DC-Fertingplatten sil G-25 UV-254” фирмы “Mascnerey-Nagel+Co” ПФ 3 поднималась только на половину планируемого пробега (около 8-10 см) независимо от продолжительности хроматографирования, при этом производные ПГБК располагались близко к линии ПФ. Аналогичные результаты нами отмечены при работе с другими ПФ, содержащими достаточно большое количество воды (табл. 1). Пластины обеих фирм (“Merk” и “Mascnerey-Nagel+Co”), используемые в нашем эксперименте, покрыты равным слоем силикагеля, имеющим одинаковый размер и форму частиц, однако ведут себя по-разному в ПФ, содержащих большое количество воды. Очевидно, это связано с природой связующего вещества, и указанные пластинки, несмотря на кажущуюся схожесть, не могут считаться аналогичными.

Известно, что хроматография в тонком слое сорбента широко используется в стандартизации фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ для нормирования содержания в них родственных соединений. При этом необходимо определить то максимальное количество вещества, которое можно хроматографировать в выбранных условиях без снижения эффективности разделения его с возможными примесями. Согласно данным литературы [1,3] кроме ПГБК в исследуемой группе ве-

ществ в качестве примесей могут присутствовать эфирные производные ПГБК. Обычно для определения родственных соединений на хроматографическую пластинку наносят 100 мкг исследуемого вещества. При хроматографировании 100 мкг производных ПГБК в описанных условиях наблюдалась перегрузка пластинки, и вещества исследуемой группы не делились. Установлено, что вещества достаточно хорошо делятся при нагрузке 50 мкг (коэффициент деления R между близкорасположенными веществами ЭПГБ и МПГБ около 1,4).

Для нормирования примесей необходимо определить то минимальное количество его, которое можно обнаружить на хроматограмме. Установлено, что чувствительность обнаружения исследуемых соединений одинакова и составляет 0,1 мкг. Поэтому при нормировании примесей на уровне 0,5% достаточно нанести 20 мкг исследуемого вещества и сравнить пятна с концентрацией веществ 0,2 мкг, что предусмотрено в зарубежных фармакопеях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований найдены оптимальные условия разделения производных ПГБК (МПГБ, ППГБ, ЭПГБ, БутПГБ, БенПГБ и ПГБК) методом ТСХ. Разработанная методика может быть использована для подтверждения подлинности указанной группы веществ и определения в них родственных соединений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. British Pharmacopoeia. – London, 2001. – электронная версия.
2. The United States Pharmacopoeia 27, The National Formulary 22; электронная версия.
3. European Pharmacopoeia 4.8; электронная версия
4. Кибардин С.А., Макаров К.А. Тонкослойная

хроматография в органической химии. // М: Химия, 1978. – 127с.

5. *Кирхнер Ю.* Тонкослойная хроматография. // М: Мир, 1981, Т1. – 616с.

6. *Микеш О.* Лабораторное руководство по хро-

матографическим и смежным методам. // М: Мир, 1982, Ч1. – 397с.

7. *Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч.* Тонкослойная хроматография в фармацевтической и клинической биохимии. // М: Мир, 1980, Ч2. – 622 с.