

УДК

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ С ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В КОМБИНИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТАХ

© 2005 г. С.В. Емшанова,¹ А.П. Зуев,¹ Н.П. Садчикова,² О.В. Овчинникова,¹ М.Е. Иванова¹

¹ ОАО «АКРИХИН», Московская область;

² Московская Медицинская академия им. И. М. Сеченова

В статье представлены результаты исследований по выбору состава растворителей для подвижной фазы (ПФ) хроматографической системы, позволяющей идентифицировать ряд лекарственных субстанций и лекарственных форм, обладающих противотуберкулезной активностью. Обоснован выбор ПФ, состоящей из ацетона, изопропилового спирта, этилацетата и раствора аммиака концентрированного. Приведены условия теста на пригодность выбранной хроматографической системы.

Целью настоящей работы являлась разработка экспресс-методики установления подлинности таблетированных лекарственных препаратов, содержащих ряд субстанций, обладающих противотуберкулезной активностью, с использованием метода тонкослойной хроматографии (ТСХ). Основное достоинство ТСХ заключается в несложности аппаратуры, простоте и большой скорости проведения эксперимента, достаточной чёткости разделения смеси веществ и в возможности анализа их микроколичеств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Субстанции ломефлоксацина гидрохлорида, изониазида, пиперазина, этимбутола гидрохлорида, пиридоксина гидрохлорида.

Подготовка образцов для хроматографирования

0,372 г порошка растёртых таблеток помещают в коническую колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл спирта метилового, обрабатывают ультразвуком в течение 10 минут, охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 2 мл фильтрата (испытуемый раствор).

Условия хроматографирования

Хроматографирование проводят на пластинках Кизельгель 60 F₂₅₄ фирмы “Merck” размером 10 x 20 см с толщиной слоя 0,25 мм в предварительно насыщенной камере. На линию старта пластинки наносят полосой длиной 10 мм следующую пробу: 0,01 мл испытуемого раствора (100 мкг этимбутола гидрохлорида и 114 мкг пиперазина, 68 мкг ломефлоксацина гидрохлорида, 42 мкг изониазида и 3 мкг пиридоксина гидрохлорида) – полоса А. Рядом наносят полосой Б 0,01

мл раствора смеси стандартных образцов веществ-свидетелей (СОВС) (68 мкг ломефлоксацина гидрохлорида, 42 мкг изониазида, 114 мкг пиперазина, 100 мкг этимбутола гидрохлорида и 3 мкг пиридоксина гидрохлорида).

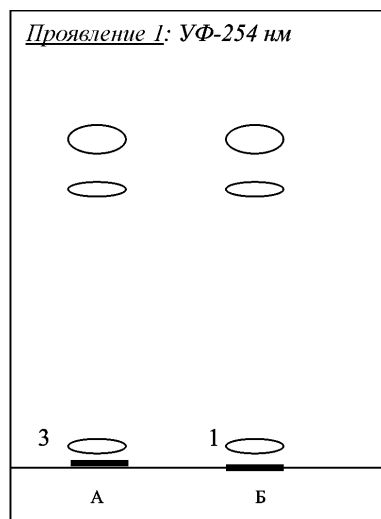
Пластинку с нанесёнными пробами сушат на воздухе в течение 5 минут, а затем помещают в насыщенную камеру со смесью этилацетат – спирт изопропиловый – ацетон – аммиака раствор концентрированный (15:20:2:5) и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт подвижной фазы пройдёт 16 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат в токе воздуха до исчезновения запаха аммиака (около 10 минут), просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм и проводят оценку полученной хроматограммы.

Основные пятна на хроматограмме препарата соответствуют по положению и интенсивности поглощения при 254 нм (ломефлоксацина гидрохлорид, изониазид и пиперазин) основным пятнам на хроматограмме Б смеси СОВС аналогичных активных веществ.

Затем пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 366 нм (определяют подлинность ломефлоксацина гидрохлорида и пиридоксина гидрохлорида).

После этого пластинку нагревают при 110 °С в течение 5 минут, опрыскивают 0,1 % раствором нингидрина в спирте 95 % и ещё раз нагревают при той же температуре до появления чёткого пятна (определяют подлинность этимбутола гидрохлорида).

Результаты анализа считаются достоверными, если на хроматограмме Б СОВС ломефлоксацина гидрохлорида, изониазида, пиперазина, этимбу-



62 мкг ломефлоксацина г/х	62 мкг ломефлоксацина г/х
42 мкг изониазида	42 мкг изониазида
114 мкг пиразинамида	114 мкг пиразинамида
100 мкг этамбутола г/х	100 мкг этамбутола г/х
3 мкг пиридоксина г/х	3 мкг пиридоксина г/х

А. Хроматограмма таблеток

1. Ломефлоксацина гидрохлорид с $R_f \sim 0,02$
2. Изониазид с $R_f \sim 0,5$
3. Пиразинамид с $R_f \sim 0,6$

Б. Хроматограмма СОВС ломефлоксацина гидрохлорида, изониазида, пиразинамида, этамбутола гидрохлорида и пиридоксина гидрохлорида

1. Ломефлоксацина гидрохлорид с $R_f \sim 0,02$
2. Изониазид с $R_f \sim 0,5$
3. Пиразинамид с $R_f \sim 0,6$

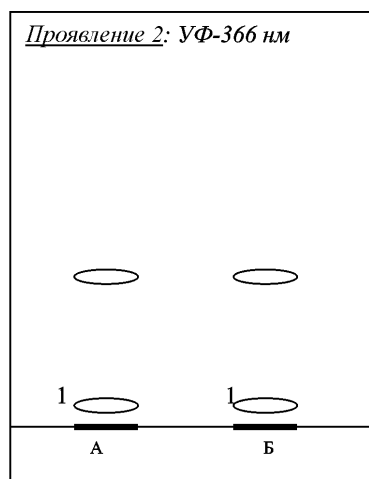
Хроматограмму Б используют для определения пригодности хроматографической системы: на хроматограмме Б должно быть три четких отдельных пятна

Рис. 1. Хроматограммы подлинности препарата (этилацетат – спирт изопропиловый – ацетон – аммиака раствор концентрированный (15:20:2:5))

тола гидрохлорида и пиридоксина гидрохлорида при просматривании пластинки в УФ-свете при длине волны 254 нм наблюдается три четких отдельных пятна, при 366 нм – два пятна, а после опрыскивания раствором нингидрина – одно пятно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной работе изучено влияние состава подвижной фазы и его полярности на разделение ряда субстанций, обладающих противотуберкулезной активностью, и селективность хроматографической системы. Известно, что растворители, используемые для ТСХ, различаются по прочности сорбции и силе взаимодействия с разделяемыми веществами. Одни из них способны смыть лишь слабосвязанные сорбаты, другие – вызывают десорбцию почти любых молекул. Для определения общего характера влияния того или иного растворителя на удерживание используется понятие его элюирующей силы [1, 4]. Элюирующая сила –



62 мкг ломефлоксацина г/х	62 мкг ломефлоксацина г/х
42 мкг изониазида	42 мкг изониазида
114 мкг пиразинамида	114 мкг пиразинамида
100 мкг этамбутола г/х	100 мкг этамбутола г/х
3 мкг пиридоксина г/х	3 мкг пиридоксина г/х

А. Хроматограмма таблеток

1. Ломефлоксацина гидрохлорид с $R_f \sim 0,02$
2. Пиридоксина гидрохлорид с $R_f \sim 0,3$

Б. Хроматограмма СОВС ломефлоксацина гидрохлорида, изониазида, пиразинамида, этамбутола гидрохлорида и пиридоксина гидрохлорида

1. Ломефлоксацина гидрохлорид с $R_f \sim 0,02$
2. Пиридоксина гидрохлорид с $R_f \sim 0,3$

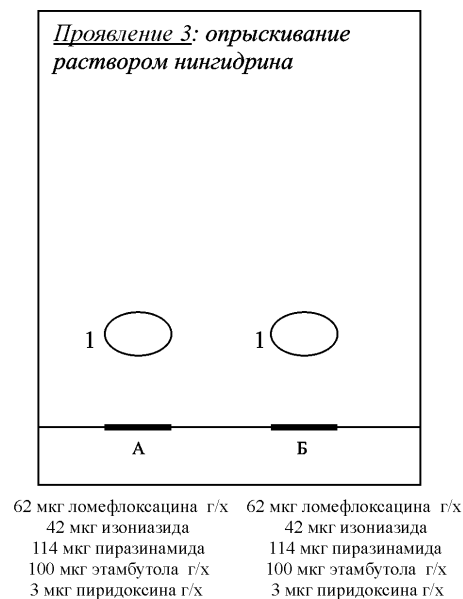
Хроматограмму Б используют для определения пригодности хроматографической системы: на хроматограмме Б должно быть два четких отдельных пятна

Рис. 2. Хроматограммы подлинности препарата (этилацетат – спирт изопропиловый – ацетон – аммиака раствор концентрированный (15:20:2:5))

это свойство подвижной фазы (ПФ) вступать в такие межмолекулярные взаимодействия с компонентами системы, которые способствуют десорбции разделяемых соединений, более быстрому перемещению хроматографических зон. В варианте ТСХ с нормальными фазами элюирующая способность растворителя возрастает по мере увеличения полярности. Увеличивая полярность растворителя, можно повысить R_f анализируемых веществ. Полярность системы в целом оценивали по диэлектрической проницаемости входящих в состав растворителей [3, 5].

Нами изучены ПФ, содержащие следующие растворители в разных соотношениях (с последовательным увеличением элюирующей силы): толуол, хлороформ, этилацетат, ацетон, бутанол, изопропиловый спирт (ИПС), этанол, метанол, вода, ледяная уксусная кислота.

Было отмечено, что при увеличении содержания в подвижной фазе компонентов с большой полярностью



А. Хроматограмма таблеток

1. Этамбутола гидрохлорид с $R_f \sim 0,25$

Б. Хроматограмма СОВС ломефлоксацина гидрохлорида, изониазида, пиразинамида, этамбутола гидрохлорида и пиридоксина гидрохлорида

1. Этамбутола гидрохлорид с $R_f \sim 0,25$

Хроматограмму Б используют для определения пригодности хроматографической системы: на хроматограмме Б должно быть одно пятно

Рис. 3. Хроматограммы подлинности препарата (этилацетат – спирт изопропиловый – ацетон – аммиака раствор концентрированный (15:20:2:5)).

и высокой элюирующей способностью, таких, как вода, ледяная уксусная кислота, метанол, раствор аммиака концентрированный подвижность исследуемых субстанций становится достаточно высокой, и пятна практически всех сорбатов оказываются либо на уровне фронта растворителя, либо с $R_f > 0,9$.

Использование ПФ с большим содержанием компонентов с низкой полярностью (этилацетат, изопропиловый спирт, толуол, этанол) снижает подвижность исследуемых веществ и селективность хроматографической системы. Так, при введении в ПФ хлороформа, толуола, бутанола пятна пиразинамида и изониазида накладываются друг на друга, а этамбутола гидрохлорида, ломефлоксацина гидрохлорида, пиридоксина гидрохлорида остаются на линии старта. Поэтому для повышения подвижности разделяемых веществ, содержащих аминогруппы, их разделения и повышения компактности пятен [1], в ПФ вводили раствор аммиака концентрированный.

Установлено, что оптимальное разделение компонентов, их лучшая подвижность наблюдаются в ПФ,

содержащие следующие растворители: этилацетат, спирт изопропиловый, ацетон, раствор аммиака концентрированный, ледяная уксусная кислота, метанол, этанол. При этом значения R_f находятся, за исключением ломефлоксацина гидрохлорида ($R_f \sim 0,02$), в пределах 0,2 – 0,8, что является, согласно современным представлениям, наиболее оптимальным [2].

Для окончательного выбора состава и количества растворителей, входящих в ПФ, руководствовались следующими соображениями.

Установлено, что для увеличения селективности хроматографической системы необходимо использовать ацетон, оптимальное содержание которого составляет около 5%. Снижения эффекта размывания пятен пиразинамида, изониазида, этамбутола гидрохлорида удалось добиться введением в ПФ раствора аммиака концентрированного, содержание которого составило около 12%. Остальные компоненты состава ПФ включают растворители, имеющие разные значения диэлектрической проницаемости. Это позволяет менять их соотношение и таким образом регулировать полярность хроматографической системы, а значит, и оптимальную подвижность исследуемых субстанций. В качестве таких растворителей после предварительных дополнительных исследований выбраны ИПС и этилацетат, имеющие значения диэлектрической проницаемости около 19 и 6 соответственно.

На основании проведенных исследований выбран состав ПФ, включающей в себя следующие растворители: этилацетат – спирт изопропиловый – ацетон – раствор аммиака концентрированный (15:20:2:5). R_f пятен исследуемых субстанций имеет следующие значения: изониазида – 0,5; пиразинамида – 0,6; пиридоксина гидрохлорида – 0,3; ломефлоксацина гидрохлорида – 0,02. При детектировании пятен обнаружено, что исследуемые вещества различаются по способности флуоресцировать в УФ-свете. При длине волны 254 нм ломефлоксацина гидрохлорид, изониазид и пиразинамид определяются в виде темных пятен на светящемся фоне пластины. При облучении пластины с пробами разделяемых веществ УФ-светом при длине волны 366 нм ломефлоксацина гидрохлорид и пиридоксина гидрохлорид обнаруживаются в виде светящихся пятен ярко-сиреневого цвета. Это объясняется тем, что ломефлоксацина гидрохлорид и пиридоксина гидрохлорид содержат хромофорные группы, которые флуоресцируют под действием УФ-света. Пятно этамбутола гидрохлорида после опрыскивания пластины раствором нингидрина приобретает красное окрашивание.

Таким образом, разработанная методика установления подлинности субстанций ломефлоксацина гидрохлорида, пиразинамида, изониазида, пиридок-

сина гидрохлорида в твёрдых лекарственных формах является достаточно специфичной и может быть использована для экспресс-анализа лекарственных форм противотуберкулезных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ф.Гейсс*. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография), том 1, 2, Москва, 1999.

2. *И.И.Евгеньева*. Планарная хроматография и анализ органических веществ. Соросовский образовательный журнал, №11, 1999, с. 50-55.

3. *О.Б.Рудаков, И.П.Седищев*. Обобщённый критерий полярности растворителей как средство управления хроматографическим процессом. Известия Академии наук. Сер. Химическая. №1, 2003, с. 17-19.

4. *О.Б.Рудаков*. Растворитель как средство управления процессом в жидкостной хроматографии. Воронеж: ВГУ, 2003.

5. *Э.Шталь*. Хроматография в тонких слоях. Мир, Москва, 1965.