

ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ КОМБИНИРОВАННЫХ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫХ СРЕДСТВ МЕТОДОМ ТСХ

М.Р. Якубов, А.П. Арзамасцев, В.Л. Дорофеев

Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова

Установлено, что оптимальные подвижность и разделение пятен этамбутола, рифампицина, изониазида и пиразинамида на ТСХ пластинах «Сорбфил» наблюдаются в ПФ следующего состава: раствор аммиака 25% – ацетон – метанол – этилацетат (1:1:1:7). Пятна рифампицина вследствие его естественной окраски видны на хроматограмме без какой-либо предварительной обработки при естественном освещении. Пятна изониазида и пиразинамида проявляются только при облучении светом УФ-лампы при длине волны 254 нм. Для проявления пятен этамбутола требуется обработка парами йода. Разработанная методика может быть использована при выявлении фальсифицированных противотуберкулезных лекарственных средств.

За последние годы во всех странах наблюдается увеличение числа больных туберкулезом легких, для лечения которого используется ряд комбинированных противотуберкулезных препаратов (ПТП) [2, 3, 8, 9]. Учитывая высокую эффективность и активное потребление, данные средства являются объектами для подделки.

Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) нашел широкое применение в фармакопейном анализе для установления подлинности и анализа чистоты лекарственных средств [4, 5, 7]. Вместе с тем, ТСХ активно применяется за рубежом в экспресс-анализе при скрининге фальсифицированных лекарственных препаратов [6].

Целью настоящей работы являлась разработка методик экспресс-анализа комбинированных ПТП с использованием метода ТСХ с целью выявления фальсифицированных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

- таблетки, содержащие рифампицин, изониазид, пиразинамид и этамбутола гидрохлорид (150/75/400/275 и 225/150/750/400 мг, соответственно);
- таблетки, содержащие рифампицин, изониазид и пиразинамид (150/75/400 и 150/150/500 мг, соответственно).

Подготовка образцов для хроматографического анализа

Таблетки, содержащие этамбутол. Навеску измельченной таблетки, соответствующую содержанию около 50 мг этамбутола, помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 30 мл воды и интенсивно взбалтывали в течение 10 минут. Затем доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали. Полученную смесь фильтровали при постоянном перемешивании через бумажный фильтр типа «белая лента» в коническую колбу, отбрасывая первые 20 мл фильтрата. Концентрация этамбутола в полученном растворе составляла около 1 мкг/мл. Концентрация других лекарственных веществ, входящих в состав препаратов, составляла (для дозировок 150/75/400/275 и 225/150/750/400 мг, соответственно):

- рифампицин около 0,55 и 0,56 мкг/мл,
- изониазид около 0,27 и 0,38 мкг/мл,
- пиразинамид около 1,45 и 1,88 мкг/мл.

Таблетки, не содержащие этамбутол. Навеску измельченной таблетки, соответствующую содержанию около 50 мг изониазида, помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 30 мл воды и интенсивно взбалтывали в течение 10 минут. Затем доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали. Полученную смесь фильтровали при постоянном перемешивании через бумажный фильтр типа «белая лента» в коническую колбу, отбрасывая первые 20 мл фильтрата. Концентрация изониазида в полученном растворе составляла около 1 мкг/мл. Концентра-

ция других лекарственных веществ, входящих в состав препаратов, составляла (для дозировок 150/75/400 и 150/150/500 мг, соответственно):

- рифампицин около 2 и 1 мкг/мкл,
- пиразинамид около 5,33 и 3,33 мкг/мкл.

Условия хроматографирования

Хроматографирование проводили на пластинках для высокоэффективной ТСХ «Сорбфил» размером 10×10 см (ЗАО «Сорбполимер», г. Краснодар), покрытых силикагелем с люминофорным содержимым. Пластинки были представлены двумя видами, отличающимися между собой материалом подложки: алюминиевая фольга (ПТСХ-АФ-В-УФ) и полимер (ПТСХ-П-В-УФ).

Таблетки, содержащие этамбутол. На линию старта пластинок с помощью микрошприца наносили 5, 10 и 15 мкл испытуемого раствора. При объеме нанесения 10 мкл масса наносимых веществ составляла:

- этамбутол около 10 мкг,
- рифампицин около 5,5 и 5,6 мкг,
- изониазид около 2,7 и 3,8 мкг,
- пиразинамид около 14,5 и 18,8 мкг.

Таблетки, не содержащие этамбутол. На линию старта пластинок с помощью микрошприца наносили 1, 3 и 5 мкл испытуемого раствора. При объеме нанесения 3 мкл масса наносимых веществ составляла:

- изониазид около 3 мкг,
- рифампицин около 6 и 3 мкг,
- пиразинамид около 16 и 10 мкг.

Пробы наносились полоской 10 мм таким образом, чтобы расстояние от места нанесения до левого или правого края пластины, а также между пятнами составляло не менее 15 мм. Подобным образом на пластину 10×10 см наносили одновременно 3 испытуемых раствора. Сушку проб осуществляли с помощью нагревательного устройства для сушки пластинок УСП-1 (ЗАО «Сорбполимер», г. Краснодар) при температуре 60° С.

Использовали стеклянную хроматографическую камеру размером 150×120×80 мм. Насыщение камеры парами подвижной фазы (ПФ) проводили в течение 20-30 мин.

В качестве подвижной фазы использовали смесь: раствор аммиака 25% – ацетон – метанол – этилацетат (1:1:1:7).

Пробег фронта растворителя составлял 8 см. После хроматографирования пластинку высушивали в сушильном шкафу при температуре 110° С в течение 5 минут.

После высушивания хроматографическую пластину помещали на 4-5 мин в камеру с парами йода (только для таблеток с этамбутолом), а затем немедленно проявляли в УФ-свете облучателя хроматографического УФС 254/365 (ЗАО «Сорбполимер», г. Краснодар) при 254 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовано влияние ПФ различного состава и полярности на подвижность изучаемых лекарственных веществ и селективность хроматографической системы. Полярность ПФ ориентировочно оценивали по диэлектрической проницаемости входящих в ее состав растворителей. Для этого рассчитывали среднее взвешенное значение диэлектрической проницаемости фазы с учетом содержания каждого растворителя.

Были изучены ПФ содержащие следующие растворители в различных соотношениях (в порядке увеличения полярности): тетрахлорметан, диэтиловый эфир, хлороформ, этилацетат, ледяная уксусная кислота, изоамиловый спирт, бутанол, изопропиловый спирт, пропанол, ацетон, этанол, метанол, ацетонитрил, вода, раствор аммиака 25%, формамид.

При увеличении содержания в ПФ высокополярных компонентов (раствор аммиака 25%, формамид) резко повышается подвижность изучаемых веществ, но снижается селективность хроматографической системы, и все пятна на хроматограмме имеют значения R_f более 0,8, в том числе оказываются на уровне фронта растворителя. При использовании в ПФ тетрахлорметана пятна имеют значения R_f менее 0,2, либо остаются на линии старта.

Показано, что для снижения эффекта размытия пятен испытуемых веществ следует включать в состав ПФ раствор аммиака 25%. Установлено, что оптимальное содержание раствора аммиака 25% в ПФ для комбинированных ПТП составляет 10%.

Для увеличения селективности хроматографической системы необходимо использовать метанол. Оптимальное содержание метанола в ПФ составило 10%. ПФ также должна включать в себя другие растворители, которые хорошо смешиваются с раствором аммиака 25% и метанолом и имеют сильно различающихся между собой значениями диэлектрической проницаемости. Последнее обстоятельство позволяет, меняя их соотношение, регулировать полярность ПФ, а, следовательно, выбрать оптимальную подвижность изу-

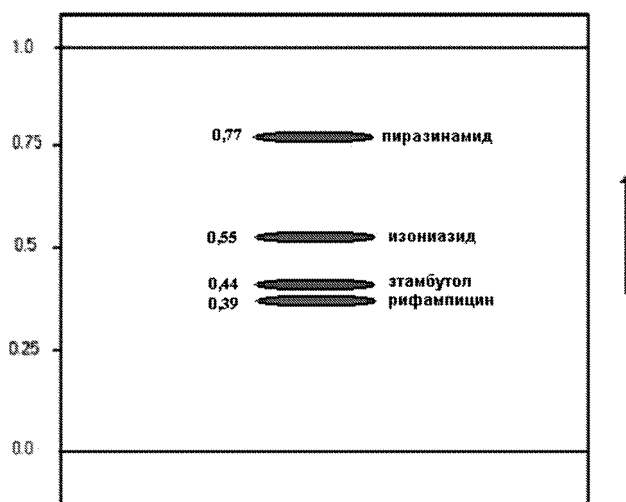


Рис. 1. ТСХ комбинированного ПТП, содержащего этамбутол, рифампицин, изониазид и пиразинамид в ПФ раствор аммиака 25% – ацетон – метанол – этилацетат (1:1:1:7). Рядом с пятнами указаны значения R_f .

чаемых лекарственных веществ. В качестве таких растворителей после ряда исследований были выбраны этилацетат и ацетон (значение диэлектрической проницаемости, соответственно, около 6 и 20).

Таким образом, было установлено, что оптимальные подвижность и разделение пятен этамбутола, рифампицина, изониазида и пиразинамида наблюдаются в ПФ с промежуточной полярностью (значение диэлектрической проницаемости смеси составляет около 17) следующего состава: раствор аммиака 25% – ацетон – метанол – этилацетат (1:1:1:7). При этом значения R_f находятся в пределах 0,2-0,8, что является оптимальным [1].

Для детектирования всех пятен использовали комбинирование обработки парами йода и облучения УФ-светом с длиной волны 254 нм. Пятна рифампицина вследствие его естественной окраски видны на хроматограмме без какой-либо предварительной обработки при естественном

освещении. Пятна изониазида и пиразинамида проявляются только при облучении светом УФ-лампы при длине волны 254 нм. А для проявления пятен этамбутола требуется обработка парами йода.

После обработки парами йода в УФ-свете на хроматограмме видны пятна всех изучаемых соединений. Пятна этамбутола надежно проявляются при нанесении на пластинку 10 мкг действующего вещества, а пятна изониазида – 3 мкг. При этом для имеющихся дозировок комбинированных ПТП нагрузка рифампицина составляет 3-6 мкг, пиразинамида – 10-19 мкг, что позволяет также четко видеть соответствующие пятна и, в то же время, не перегружает хроматографическую пластину. На рис. 1 представлена схема соответствующей хроматограммы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография): Т. 1, 2. Пер. с англ. – М., 1999.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2-х т. – 14-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: ООО Издательство Новая Волна, 2000.
3. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – М.: Боргес, 2002. – 384 с.
4. British Pharmacopoeia (2004).
5. European Pharmacopoeia, 5th ed. (2005).
6. Kenyon A.S., Layoff T.P. A Compendium of Unofficial Methods for Rapid Screening of Pharmaceuticals by Thin-Layer Chromatography. – St. Louis, MO: FDA, 1999.
7. The United States Pharmacopoeia, 27th revision (2004).
8. WHO Drug information. Vol. 18, p 308-322. No. 4, 2004
9. WHO Project on antituberculosis products. Working document QAS/04.118; QAS/04.119