

УДК 543.257.063

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ И АНАЛЬГЕЗИРУЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ МЕТОДОМ ВЭЖХ

*С.Ю. Гармонов, И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова,
Р.Н. Исмаилова, Э.А. Иртуганова*

Аннотация

Разработан унифицируемый подход и проведена оптимизация хроматографического разделения компонентов лекарственных средств противовоспалительного и анальгезирующего действия в условиях обращено-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Установлены рабочие условия чувствительных и экспрессных определений примесей, вспомогательных веществ и действующих компонентов при одном ВЭЖХ определении в различных лекарственных смесях противовоспалительного и анальгезирующего действия.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, лекарственные средства, контроль качества.

Введение

Совершенствование принципов стандартизации и контроля качества лекарственных средств (ЛС), обеспечивающих их эффективность и безопасность применения, обуславливает разработку, унификацию и валидацию методов анализа ЛС на этапах их создания, производства и потребления. К таким методам в полной мере относится высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), которая за последние десятилетия во многом определила заметный прогресс в фармации и практической медицине. ВЭЖХ как универсальный и высокочувствительный метод анализа, которому в ряде случаев нет альтернативы, позволяет одновременно осуществлять контроль за содержанием нескольких лекарственных веществ (ЛВ), вспомогательных компонентов и возможных токсичных примесей в многокомпонентных ЛС, отличаясь при этом высокой точностью и воспроизводимостью [1–3].

Однако более широкое использование ВЭЖХ в практике рутинного фармацевтического анализа ограничено отсутствием унифицированных подходов к созданию методик анализа. В настоящее время для определения какого-либо ЛС и примесей в нем применяются определенные аналитические процедуры подготовки проб и методики ВЭЖХ анализа, которые в каждом конкретном случае предписывают использование разных колонок, подвижных фаз (ПФ) и детекторов [2]. Очевидно, что эти обстоятельства приводят к необходимости каждый раз изменять параметры хроматографической системы и осуществлять ее калибровку, что в конечном итоге значительно увеличивает продолжительность

всего анализа, требует высокой квалификации персонала и, наконец, существенно повышает стоимость анализа.

Одним из приоритетных фармакологических групп современных препаратов составляют ЛС с противовоспалительным и анальгезирующим действием, которые находят широкое применение в медицинской практике для лечения различных заболеваний, в частности простудных [4, с. 15–16.]. В связи с этим цель работы состояла в создании унифицированного способа контроля качества ряда противовоспалительных и анальгезирующих лекарственных средств в многокомпонентных ЛС с использованием обращенно-фазной ВЭЖХ.

1. Экспериментальная часть

В работе применяли жидкостные хроматографы: LC-20 фирмы “Schimadzu” (Япония) с диодно-матричным и флуоресцентным детекторами; SERIES 200 фирмы Perkin Elmer (США) с УФ-детектором. Использовали спектрофотометр SPECORD 40 (AnalytikJena, Германия), рН-метр 211 (Hanna, Румыния), центрифугу Minispin Plus (Eppendorf, Германия), ультразвуковую ванну L-0,16/18 (Россия), установку для получения сверхчистой воды Simplicity Millipor (Франция).

Использованы ЛС промышленного изготовления различных производителей. В качестве стандартов применяли стандартные образцы USP, BP фирм Fluca, Sigma, Aldrich, Extrasynthese и субстанции ЛВ, отвечающие всем требованиям нормативной документации. Для приготовления элюентов и в подготовке проб использованы растворители: ацетонитрил (сорт 0) и гексан («Криохром», Санкт-Петербург); ацетонитрил (Ultragradient) фирм Labscan, Panreac; метанол фирмы Panreac; реактивы: трифторуксусная кислота (“Sigma”, США), уксусная кислота, фосфорная кислота, однозамещенный фосфат натрия «х.ч.», триэтиламин (“Sigma”, США), диэтиламин (“Sigma”, США). В качестве ионных парных реагентов использовали додецилсульфат натрия (“Fluca”, Германия).

2. Результаты и их обсуждение

Для поиска оптимальных условий разделения и обоснования выбора унифицируемой ПФ требовалось оценить хроматографическое поведение ЛВ с учетом активности незащищенных силанолов сорбента (pK_a 3.5) в зависимости от изменения диапазона рН ПФ, ограниченного для большинства сорбентов интервалом от 2 до 7.5. При этом можно выделить ЛВ со слабыми ($pK < 7$; кофеин, 4-аминофенол), средними ($pK > 7$; лидокаин, тетракаин) и сильными ($pK > 9$; хлорфенирамин, хлоргексидин, бензэтония хлорид, фенилэфрин) основными свойствами и слабыми ($pK > 4$; аскорбиновая кислота, парацетамол, бензойная кислота) и средними ($pK > 2$; ацетилсалициловая и салициловая кислоты) кислотными свойствами. Было установлено, что использование рН для контроля состояния ионизации аналита в обращенно-фазных условиях ВЭЖХ является эффективным приемом для изменения селективности разделения. Ионизированные функциональные группы имеют большую полярность, что приводит к уменьшению удерживания. Кроме того, они способны к ионному взаимодействию с незащищенными и активными силанолами сорбента, что влияет на форму пика и его воспроизводимость.

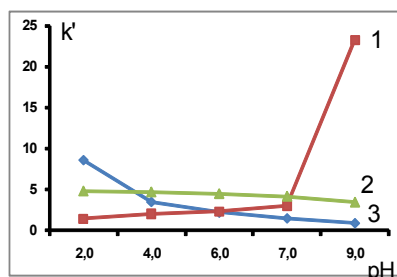


Рис. 1. Зависимость фактора удерживания тетракаина (1), пропилпарабена (2), салициловой кислоты (3) от pH ПФ. ХТетра RP18. Элюенты А: 0.02 М Na_2HPO_4 , H_3PO_4 ; Б: ацетонитрил, А/Б = 72/28 (об. %); 40 °С

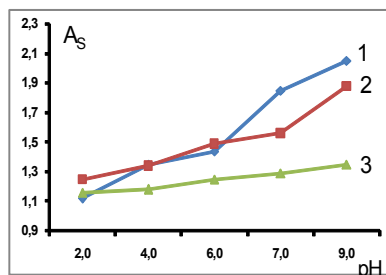


Рис. 2. Зависимость коэффициента асимметрии пика салициловой кислоты (1), тетракаина (2), пропилпарабена (3) от pH ПФ. Условия см. на рис. 1

В качестве примера на рис. 1, 2 представлено хроматографическое поведение анализируемых ЛВ с кислотными и основными свойствами.

В диапазоне pH ПФ вблизи значений рК ЛВ присутствуют в растворе одновременно в нейтральной и ионизированной формах. Силанолы сорбента в нейтральной среде ионизированы, что увеличивает степень их взаимодействия с полярными функциональными группами, приводя к образованию сильного хвостового фактора и снижению эффективности колонки. При pH ниже их pK_a на 1–1.5 ед. они находятся в нейтральном состоянии, поэтому подкисление ПФ является общим подходом по установлению вторичных взаимодействий.

Учитывая рабочий диапазон колонки, рК кислот и оснований, свойств свободных силанолов сорбента, ПФ с pH 2–3 является наиболее приемлемой для создания стартовых унифицируемых условий определения исследованных ЛВ. Для создания этих значений pH исследовали ПФ на основе фосфорной, муравьиной, уксусной, трифторуксусной кислот и буферных растворов на их основе.

При разработке новых способов определения преимущества унифицированного элюента заключаются в обеспечении стартовых условий анализа, экономии времени, быстрой адаптации хроматографической системы при смене объекта анализа. В растворе фосфатного буфера и фосфорной кислоты удалось получить разделение компонентов с наиболее приемлемой селективностью. Так, изучение различных по своим хроматографическим свойствам ЛВ хлорфенирамина малеата, хлоргексидина диацетата, бензэтония хлорида, салициловой кислоты и кофеина выявило возможность их разделения на колонках с различной селективностью гидрофобных фаз. При этом большое влияние на разделение оказывают свойства гидрофобного сорбента (рис. 3, 4).

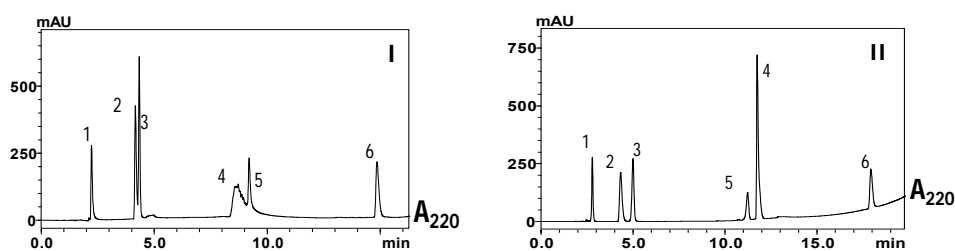


Рис. 3. Хроматограммы смеси (мкг/мл): малеат – 1 (60), хлорфенирамин – 2 (60), кофеин – 3 (46), хлоргексидин – 4 (78), салициловая кислота – 5 (64), бензэтония хлорид – 6 (50) при градиенте ПФ: А – 0.5% H_3PO_4 , Б – ацетонитрил. Symmetry (I) C18; Discovery RP Amide (II); 40 °С

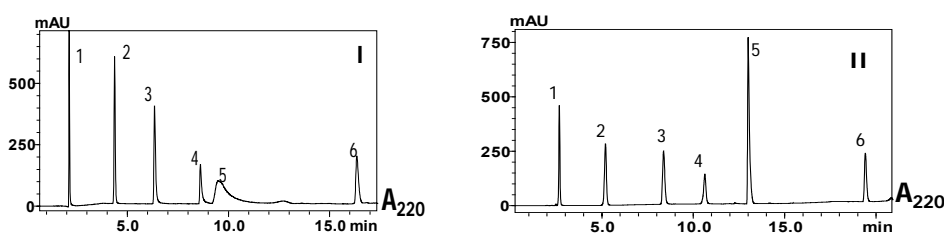


Рис. 4. Хроматограммы смеси (мкг/мл): малеат – 1 (60), кофеин – 2 (46), хлорфенирамин – 3 (60), салициловая кислота – 4 (64), хлоргексидин – 5 (78), бензэтония хлорид – 6 (50) при градиенте ПФ: А – 0.02 М Na_2HPO_4 , H_3PO_4 , рН 2.5, Б – ацетонитрил. Symmetry (I) C18; Discovery RP Amide (II) C16; 40 °С

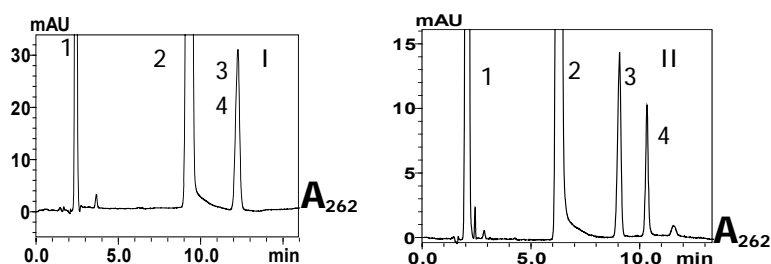


Рис. 5. Хроматограмма смеси (мкг/мл): аскорбиновая кислота – 1 (50), парацетамол – 2 (250), сахаринат натрия – 3 (10), хлорфенирамин – 4 (12) ПФ: (I) А – 0.02 М Na_2HPO_4 , H_3PO_4 , рН 2.5; Б ацетонитрил; (II) А – 0.025% CF_3COOH , 0.25% H_3PO_4 , Б – CH_3CN , градиент Б 5 → 18 за 9 мин, 1.0 мл/мин. Symmetry C18; 40 °С

В случае неудовлетворительного разделения соединений с третичным атомом азота в ПФ фосфатного буфера возможно изменение селективности разделения при использовании трифторуксусной кислоты. В этом случае удалось достигнуть разделения ЛВ с близкими спектральными и элюационными характеристиками, такими, как сахаринат натрия и хлорфенирамина малеат (рис. 5). Коэффициенты емкости и асимметрии пиков зависят от концентрации модификатора в ПФ (рис. 6).

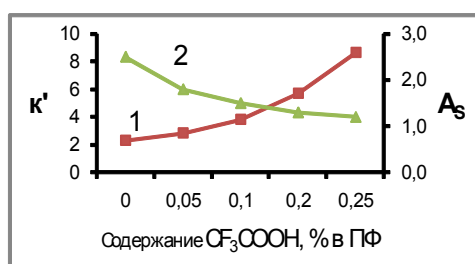


Рис. 6. Зависимость коэффициента емкости (1) и асимметрии пика (2) хлорфенирамина от концентрации модификатора трифторуксусной кислоты в ПФ 0.2% H₃PO₄ – ацетонитрил 95 : 5 (об. %) на колонке Symmetry C18; температура 40 °С

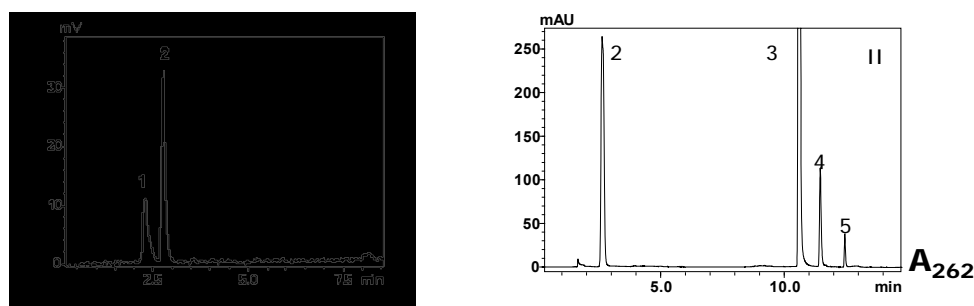


Рис. 7. Хроматограмма антигрипина (мкг/мл): 4-аминофенол – 1 (0.25), аскорбиновая кислота – 2 (100), парацетамол – 3 (500), сахаринат натрия – 4 (60), хлорфенирамина малеат – 5 (6). Длина волны возбуждения 260 нм, эмиссии 340 нм (I), длина волны 262 нм в (II) ПФ: А – 0.05% CF₃COOH, Б ацетонитрил, 0.2% Б – 3 мин, градиент Б 0.2 → 55 за 10 мин, 55% Б 2 мин. Symmetry C18; температура 30 °С

Возможности по унификации анализа можно продемонстрировать на примере многокомпонентных ЛФ антигрипина. В них содержание компонентов сильно различается и они обладают близкими элюационными характеристиками на гидрофобных фазах. Из-за этого в нормативной документации (НД) на лекарственные формы (ЛФ) антигрипина применяют несколько элюирующих смесей для каждого соединения. Нами предложены условия одновременного хроматографического определения действующих, вспомогательных компонентов и нормируемых примесей (рис. 7). В найденных рабочих условиях хорошо воспроизводимые градуировочные зависимости площади пика от содержания анализа описываются уравнениями:

$$\text{для парацетамола: } S = 95417 C_X (\text{мкг/мл}) + 9805 \quad (r = 0.9997, n = 15);$$

$$\text{для аскорбиновой кислоты: } S = 22650 C_X (\text{мкг/мл}) + 1584 \quad (r = 0.9996, n = 12);$$

$$\text{для хлорфенирамина малеата: } S = 23927 C_X (\text{мкг/мл}) - 1793 \quad (r = 0.9997, n = 14);$$

$$\text{для сахарината натрия: } S = 10445 C_X (\text{мкг/мл}) - 1008 \quad (r = 0.9995, n = 14).$$

В случае 4-аминофенола (АФ) не удалось получить приемлемого разделения, применяя унифицируемую ПФ на сорбенте С18. Содержание АФ нормируется во всех ЛФ, содержащих парацетамол и определение осложняется фоном матрицы и малыми его содержаниями (0.05–0.5%) [4]. В этом случае реализован ион-парный механизм разделения при использовании додецилсульфата

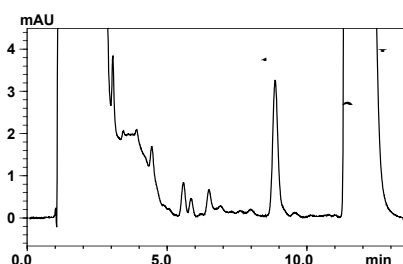


Рис. 8. Хроматограмма компонентов таблеток терафлю: 4-аминофенол – 2.5 мкг/мл (1), фенирамина малеат (2). ПФ: 0.01 М $C_{12}H_{25}NaSO_4$, 0.01 М Na_2HPO_4 , H_3PO_4 pH 2.2, Б – ацетонитрил, А/Б = 70/30. Symmetry C18. 40 °С

Табл. 1

Оценка пригодности хроматографической системы ($n = 9$)

Определяемое соединение	Время удерживания, мин	Симметрия пика	Число теоретических тарелок	Разрешение	RSD, % $t_{уд}$ пика	RSD, % S пика
4-Аминофенол	2.28	1.42	2300	–	0.18	0.31
Аскорбиновая кислота	2.81	1.21	6902	2.62	0.17	0.58
Парацетамол	10.58	1.16	183119	55	0.21	0.26
Хлорфенирамина малеат	12.35	1.14	299971	8.8	0.25	0.41
Критерий приемлемости		0.8–2.0	2000	не менее 1.5	не более 2	не более 2

Табл. 2

Результаты анализа таблеток антигриппина промышленной серии 02060607 ($n = 5$, $P = 0.95$)

Компоненты	Норма по НД, мг	X_{cp}	S	S_x	ΔX_{cp}	ϵ_{cp} , %
Парацетамол	237.5–262.5	248.3	1.92	0.86	2.38	0.96
Хлорфенирамина малеат	2.7–3.3	3.06	0.052	0.023	0.0646	2.11
Аскорбиновая кислота	46.25–53.75	48.86	1.42	0.64	1.77	3.61
Сахаринат натрия	30	29.21	0.89	0.40	1.11	3.7
4-Аминофенол	не более 0.25	$6 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$1.8 \cdot 10^{-5}$	$4.9 \cdot 10^{-5}$	8.28

натрия. Обладая более высокой удерживающей способностью чем, гексил- или октилсульфонат, он позволяет при высоком содержании модификатора получать приемлемые времена удерживания АФ, из-за чего остальные компоненты элюируются вместе с пиком перераспределения, не мешая определению смеси. Удерживание соединений с основными свойствами, в частности фенирамина, при этом значительно возрастает, что позволяет достоверно отделять все

компоненты смеси от примеси АФ (рис. 8). Наряду со спектрофотометрическим возможно использование более чувствительного флуоресцентного детектора (E_{ex} 260, E_{em} 340 нм).

Градуировочные зависимости площади пика от содержания АФ описываются уравнениями:

$$S = 18089 C_X (\text{мкг/мл}) + 630 \quad (r = 0.9998, n = 25), \text{ 272 нм, ПрО } 0.306 \text{ мкг/мл};$$

$$S = 319376 C_X (\text{мкг/мл}) + 1003 \quad (r = 0.9999, n = 21), \text{ ПрО } 0.04 \text{ мкг/мл}.$$

Показатели пригодности хроматографической системы приведены в табл. 1. Специфичность методики оценивалась по совпадению времен удерживания анализируемых компонентов с соответствующими стандартами и по доказательству отсутствия влияния действующих и вспомогательных веществ на аналитические определения. При этом точность метода описывается метрологическими характеристиками в соответствии с рекомендациями фармакопеи [5]. Предварительно установлено, что вспомогательные вещества, входящие в состав таблеток, определениям не мешают. Возможность ВЭЖХ определения проверена на готовых ЛФ (табл. 2).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (МД-2523.2008.3).

Summary

S.Yu. Garmonov, I.A. Salakhov, G.R. Nurislamova, R.N. Ismailova, E.A. Irtuganova.
Pharmaceutical Analysis of Antiinflammatory and Analgetic Drugs Using HPLC.

Reverse-phased high performance liquid chromatography (HPLC) separation of antiinflammatory and analgetic drugs components was optimized and a unified approach for their determination was developed. Working conditions of sensitive and express determination of impurities, auxiliary and active substances in various antiinflammatory and analgetic pharmaceutical mixtures in one HPLC measurement were established.

Key words: high performance liquid chromatography, drugs, quality control.

Литература

1. *Kazakevich Y., Lobrutto R.* HPLC for pharmaceutical scientists. – New Jersey: John Wiley, 2007. – 1135 p.
2. *Ahuja S., Dong M.W.* Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. – Amsterdam: Elsevier science, 2005. – 679 p.
3. *Lunn G.* HPLC methods for recently approved pharmaceuticals. – New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. – 717 p.
4. *Смирнов В.С.* Современные средства профилактики и лечения гриппа и ОРВИ. – СПб.: ФАРМиндекс, 2003. – 47 с.
5. Государственная фармакопея СССР: 11-е изд. Вып. 2. Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.

Поступила в редакцию
07.03.10

Гармонов Сергей Юрьевич – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии, стандартизации и менеджмента качества Казанского государственного технологического университета.

E-mail: *serggar@mail.ru*

Салахов Ильгиз Анясович – провизор-аналитик ГУ «Центр контроля качества лекарственных средств Республики Татарстан», г. Казань.

Нурисламова Гульнара Рашидовна – аспирант кафедры аналитической химии, стандартизации и менеджмента качества Казанского государственного технологического университета.

Исмаилова Румия Няжиповна – кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии, стандартизации и менеджмента качества Казанского государственного технологического университета.

Иртуганова Эльмира Анверовна – кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии, стандартизации и менеджмента качества Казанского государственного технологического университета.