

А. С. Осипов<sup>1</sup>, Е. Н Орлов<sup>2</sup>

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ ДЛЯ АНАЛИЗА БЕНЗЭТОНИЯ ХЛОРИДА В ГЛАЗНЫХ КАПЛЯХ

<sup>1</sup> ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Минздравсоцразвития, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева РАН, Москва, Россия

Исследована возможность применения подвижных фаз с ион-парными реагентами для определения бензэтония хлорида в глазных каплях. Среди исследованных подвижных фаз наиболее подходят фазы следующего состава: ацетонитрил — 5 мМ тетрабутиламмоний гидрофосфат в воде (65:35) и ацетонитрил — 2,5 мМ тетрабутиламмоний гидрофосфат, 2,5 мМ гептансульфонат натрия в воде (65:35). Наилучшая эффективность хроматографических колонок по пику бензэтония была получена на колонках Zorbax SB C8 150 × 4,6 мм (3,5 мкм) и Диасфер-110-Фенил 150 × 4,6 мм (5 мкм).

**Ключевые слова:** ВЭЖХ; ион-парные реагенты; бензэтоний хлорид.

Бензэтония хлорид применяется в офтальмологической практике как антисептическое средство. Препарат описан в Европейской и Американской фармакопеях [1, 2], однако методики анализа бензэтония хлорида с помощью метода ВЭЖХ в них не приведены. Бензэтония хлорид, обладая высокой гидрофобностью и четвертичной аминогруппой, является достаточно трудным объектом для хроматографирования по причине склонности к образованию мицелл в водных и водно-органических растворах.

В глазных каплях отечественного производства количественное содержание бензэтония хлорида либо не определяют совсем (только лишь подтверждают присутствие бензэтония хлорида в составе лекарственной формы методом ТСХ), либо для этого используют хроматографирование испытуемых образцов на колонке с немодифицированным силикагелем (подвижная фаза: метанол — гексан — триэтиламин — уксусная кислота 800:200:5:1). Следует отметить, что подготовка водной пробы для нормально-фазовой хроматографии достаточно длительна и трудоёмка, при этом существует возможность неконтролируемых потерь анализируемого образца. Необходимо отметить, что срок эксплуатации хроматографических колонок с немодифицированным силикагелем обычно меньше, чем для колонок для обращенно-фазовой хроматографии. Кроме того, стабильность результатов хроматографического разделения на данных колонках в большей степени зависит от чистоты органических растворителей и содержания в них и в анализируемых образцах следов воды [3]. Следует отметить, что тонкослойная хроматография на пластинках с силикагелем также сопряжена с подготовкой пробы для анализа.

Цель работы — разработка удобной для практического применения методики анализа бензэтония хлорида в лекарственных препаратах методом обращенно-фазовой хроматографии.

### *Экспериментальная часть*

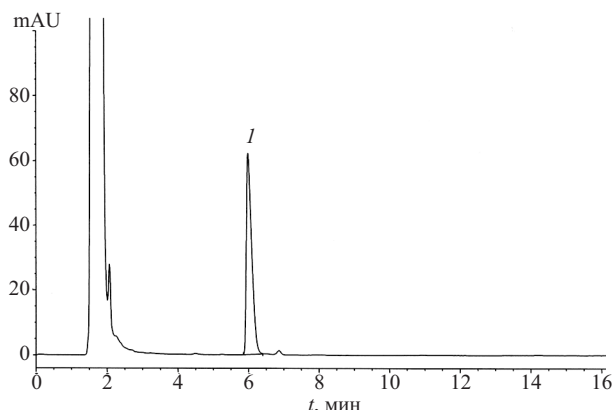
Работа проводилась с использованием хроматографа "Agilent", серия 1100 с диодно-матричным детектором (Agilent Technologies, США). Использовались колонки Luna C8(2) 150 × 4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США); Zorbax SB C8 150 × 4,6 мм, 3,5 мкм (Agilent Technologies, США); Nova-Pak 150 × 3,9 мм, 4 мкм (Waters, Ирландия) и Диасфер-110-Фенил 150 × 4,6 мм, 5 мкм (БиоХимМак, Россия). Детектирование проводили при 230 нм. Скорость потока элюента — 1,0 или 0,74 мл/мин в зависимости от диаметра колонок. Ввод образцов в объёме 20 мкл. В качестве стандартного образца применяли бензэтония хлорид производства ФГУП "ЦХЛС — ВНИХФИ", Россия. В составе подвижных фаз применяли ион-парные реагенты тетрабутиламмоний гидрофосфат и гептансульфонат натрия (Merck, Германия).

Анализировали глазные капли проксософелин и проксикарпин [4] производства ФГУП "Московский эндокринный завод", Россия. Пробы перед анализом разводили в соотношении 1:2 подвижными фазами, либо вводили в прибор без разведения. Испытуемые растворы перед введением в хроматограф фильтровали через мембранный капроновый фильтр с диаметром пор 0,2 мкм ("БиоХимМак", Россия).

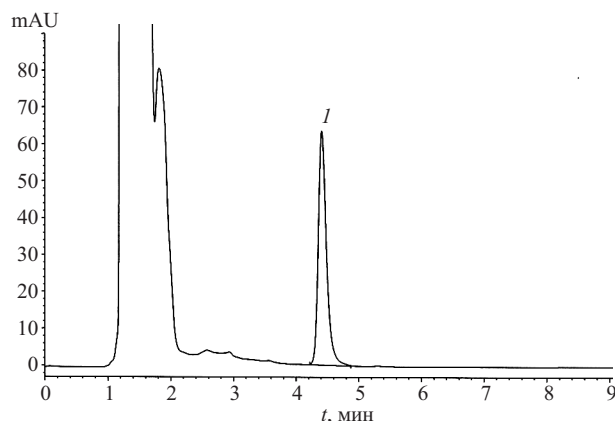
### *Результаты и их обсуждение*

Ранее на колонке Luna C8(2) 250 × 4,6 мм (5 мкм) была показана перспективность применения ион-парных реагентов тетрабутиламмония гидрофосфата (ТБА) и гептансульфоната натрия (ГС) для анализа бензэтония хлорида в составе подвижных фаз, содержащих метанол [5]. Необходимо отметить, что в данной работе хроматографировали, в основном, стандартные растворы бензэтония хлорида.

В настоящем исследовании анализировали лекарственные препараты проксософелин и проксикарпин, со-



**Рис. 1.** Хроматограмма лекарственного препарата проксофелин. I — Бензэтоний. Условия хроматографии: колонка Zorbax SB C18 150 × 4,6 мм, (3,5 мкм); скорость потока 1 мл/мин; подвижная фаза — метанол — 2,5 мМ ТБА, 2,5 мМ ГС в воде 75:25; детектирование при 230 нм.



**Рис. 2.** Хроматограмма лекарственного препарата проксикарпин. I — Бензэтоний. Условия хроматографии: колонка Luna C8(2) 150 × 4,6 мм (5 мкм); скорость потока 1 мл/мин; подвижная фаза — ацетонитрил — 3,7 мМ ТБА (50:50).

держащие в своём составе бензэтоний хлорид. Кроме того, был расширен круг исследованных колонок и подвижных фаз. Выбор длины хроматографических колонок (150 мм) и типов сорбентов (C8 или фенил) обусловлен только соображениями сокращения времени проведения анализа. Хроматографирование препарата проксифелин изучалось более детально (рис. 1). Некоторые результаты хроматографирования препарата приведены в таблице.

Применение подвижной фазы ацетонитрил — 2,5 мМ ТБА — 2,5 мМ ГС (65:35) в большинстве случаев обеспечивает более высокую эффективность колонок при хроматографировании препарата. ТБА и ГС

в составе подвижной фазы препятствуют ассоциации молекул бензэтония хлорида. Кроме того, ГС усиливает сорбцию бензэтония на хроматографической колонке. Однако применение подвижных фаз только с ГС приводит к значительному увеличению времени удерживания и ухудшению формы пика бензэтония. Только для колонки Диасфер-Фенил при использовании подвижной фазы метанол — 5 мМ ГС в воде (75:25) был достигнут удовлетворительный результат хроматографирования (таблица).

При применении подвижной фазы ацетонитрил — 5 мМ ТБА в воде (65:35) на колонке Luna C8(2) пик бензэтония расположен слишком близко к пику малоудерживаемых при данных условиях анализа компо-

#### Хроматографические параметры пика бензэтония при анализе препарата проксифелин

Наименование колонки, скорость потока, состав подвижной фазы	Время удерживания, мин	Эффективность колонки, теоретические тарелки	Коэффициент асимметрии пика
Zorbax SB C8 150 × 4,6 мм (3,5 мкм), 1,0 мл/мин, метанол — 5 мМ ТБА в воде (75:25)	4,53	8260	1,91
Zorbax SB C8 150 × 4,6 мм (3,5 мкм), 1,0 мл/мин, ацетонитрил — 5 мМ ТБА в воде (65:35)	2,37	9850	1,09
Диасфер-Фенил 150 × 4,6 мм (5 мкм), 1,0 мл/мин, ацетонитрил — 5 мМ ТБА в воде (65:35)	2,69	7730	0,93
Luna C8(2) 150 × 4,6 мм (5 мкм), 1,0 мл/мин, ацетонитрил — 5 мМ ТБА в воде (65:35)	2,28	6090	0,80
Zorbax SB C8 150 × 4,6 мм (3,5 мкм), 1,0 мл/мин, метанол — 2,5 мМ ТБА 2,5 мМ ГС в воде (75:25)	5,81	7740	2,30
Zorbax SB C8 150 × 4,6 мм (3,5 мкм), 1,0 мл/мин, ацетонитрил — 2,5 мМ ТБА 2,5 мМ ГС в воде (65:35)	3,33	9600	1,57
Диасфер-Фенил 150 × 4,6 мм (5 мкм), 1,0 мл/мин, метанол — 2,5 мМ ТБА 2,5 мМ ГС в воде (75:25)	6,00	4010	1,60
Диасфер-Фенил 150 × 4,6 мм (5 мкм), 1,0 мл/мин, ацетонитрил — 2,5 мМ ТБА 2,5 мМ ГС в воде (65:35)	3,45	8520	0,96
Luna C8(2) 150 × 4,6 мм (5 мкм), 1,0 мл/мин, метанол — 2,5 мМ ТБА 2,5 мМ ГС в воде (75:25)	4,67	6080	1,30
Luna C8(2) 150 × 4,6 мм (5 мкм), 1,0 мл/мин, ацетонитрил — 2,5 мМ ТБА 2,5 мМ ГС в воде (65:35)	2,46	7540	1,20
Novo-Pak 150 × 3,9 мм (4 мкм), 0,74 мл/мин, ацетонитрил — 2,5 мМ ТБА 2,5 мМ ГС в воде (65:35)	4,46	3750	2,09
Диасфер-Фенил 150 × 4,6 мм (5 мкм), 1,0 мл/мин, метанол — 5 мМ ГС в воде (75:25)	12,72	1350	1,61

нентов препарата проксокарпин (проксодолол, пилокарпин), что затрудняет количественную оценку содержания консерванта в лекарственном препарате. Время удерживания бензэтония может быть увеличено с уменьшением доли ацетонитрила в подвижной фазе (рис. 2). При хроматографировании препаратов на колонке Novo-Pak эффективность ее всегда была значительно хуже, чем при анализе препаратов на других колонках с применением аналогичных по составу подвижных фаз. Данный факт, вероятно, можно объяснить тем, что из всех исследуемых колонок у колонки Novo-Pak наименьший диаметр пор сорбента (60 ангстрем), а молекулярная масса бензэтония хлорида сравнительно большая (448,1 Да). Только при применении подвижной фазы состава ацетонитрил — 2,5 мМ ТБА, 2,5 мМ ГС в воде (65:35) на колонке Novo-Pak был получен приемлемый результат хроматографирования (таблица).

Необходимо отметить, что при анализе препарата проксокарпин в аналогичных условиях эффективность колонок по пику бензэтония была на 8 – 10 % меньше, чем при анализе препарата проксофелин. При этом время удерживания бензэтония практически не отличалось. Уменьшение эффективности колонок связано с тем, что в глазных каплях проксокарпин среди компонентов препарата, способных удерживаться на обращенно-фазовой колонке, бензэтония хлорид составля-

ет по массе всего 0,497 %, а в глазных каплях проксофелин — 0,815 %

Следует отметить, что ввод образцов глазных капель без разведения в хроматограф закономерно повышал площадь пика бензэтония в 3 раза, однако при этом эффективность колонки сокращалась на 41 – 47 % в зависимости от типа колонки. Как отмечалось выше, наилучшая форма пика бензэтония была достигнута с использованием подвижной фазы ацетонитрил — 2,5 мМ ТБА — 2,5 мМ ГС в воде (65:35). При хроматографировании на колонке Диасфер-Фенил 150 × 4,6 мм (5 мкм) с использованием данной подвижной фазы было подтверждено заявленное изготавителем содержание бензэтония хлорида в препаратах проксофелин и проксокарпин — 0,1 мг/мл.

## ЛИТЕРАТУРА

1. European Pharmacopoeia edition 6.8. Monograph: Benzethonium Chloride.
2. United State Pharmacopoeia XXX. Monograph: Benzethonium Chloride.
3. П. Садек, *Растворители для ВЭЖХ*, БИНОМ, Москва (2006), сс. 20 – 21, 26 – 27.
4. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2010), сс. 203, 277.
5. Е. Б. Нечаева, А. С. Осипов, В. Л. Багирова, *Тез. докл. XIII Российского нац. конгресса “Человек и лекарство”*, Москва (2006), с. 643.

Поступила 10.06.11

## APPLICATION OF HPLC TO ANALYSIS OF BENZETHONIUM CHLORIDE IN EYE DROPS

A. S. Osipov<sup>1</sup> and E. N. Orlov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> State Scientific Center for Drug Expertise and Control, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, Russia;

<sup>2</sup> Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The possibility to use mobile phases with ion-pair reagents for the HPLC determination of benzethonium chloride in eye drops has been studied. Among the investigated mobile phases intended for the determination of benzethonium chloride, most suitable mobile phases are (i) acetonitrile – 5 mM tetrabutylammonium hydrogen phosphate in water (65 : 35) and (ii) acetonitrile – 2.5 mM tetrabutylammonium hydrogen phosphate – 2.5 mM heptane-1-sulfonic acid sodium in water (65 : 35). The best performance of chromatographic columns with respect to the peak of benzethonium was obtained on Zorbax SB C8 150 × 4.6 mm (3.5 μm) and Dyaspher-110 Phenyl 150 × 4.6 mm (5 μm) columns.

**Key words:** HPLC; ion-pair reagents; benzethonium chloride; eye drops