

*В. Л. Дорофеев, А. А. Коновалов, В. Ю. Кочин, А. П. Арзамасцев*

## **АНАЛИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ГРУППЫ ФТОРХИНОЛОНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ТСХ**

Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова

В настоящее время накоплен обширный материал, касающийся фармакологических свойств и клинического применения фторхинолонов [1, 2]. В то же время, физические и физико-химические свойства и анализ данных веществ современными методами описаны в доступной литературе крайне недостаточно [3 – 5].

В частности, мало изучены хроматографические характеристики фторхинолонов, в том числе их анализ методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Данный метод нашел широкое применение в фармакопейном анализе для установления подлинности и анализа чистоты лекарственных средств. Вместе с тем, ТСХ активно применяется за рубежом в экспресс-анализе при скрининге фальсифицированных лекарственных препаратов. Учитывая чрезвычайно высокую эффективность и ультраширокий спектр действия фторхинолонов, данные лекарственные средства являются в большинстве своем потенциальными объектами для подделки.

Целью настоящей работы являлась разработка методики установления подлинности лекарственных средств группы фторхинолонов с использованием метода ТСХ.

### *Материалы и методы*

**Объекты исследования.** Субстанции: ципрофлоксацина гидрохлорида моногидрат, офлоксацин, левофлоксацина гемигидрат, пefлоксацина метансульфоната (мезилата) дигидрат, норфлоксацин, ломефлоксацина гидрохлорид, спарфлоксацин, моксифлоксацина гидрохлорид.

(В дальнейшем при указании вещества будет приводиться только международное непатентованное наименование.)

**Лекарственные препараты, содержащие вышеуказанные субстанции:** таблетки (все фторхинолоны), инъекционные растворы (ципрофлоксацин, офлоксацин, левофлоксацин, пefлоксацин, моксифлоксацин), капли (ципрофлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, ломефлоксацин), мази (ципрофлоксацин, офлоксацин).

**Подготовка образцов для хроматографического анализа.**

**Субстанции.** В мерной колбе вместимостью 25 мл растворяли в воде (ципрофлоксацин, пefлоксацин, ломефлоксацин, моксифлоксацин) или в спирте этиловом 95 % (офлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин, спарфлоксацин) 25 мг лекарственного вещества при постоянном перемешивании. Доводили объем рас-

твора до метки тем же растворителем и перемешивали. Концентрация лекарственного вещества 1,0 мг/мл.

**Таблетки.** Навеску измельченной таблетки, содержащую около 50 мг действующего вещества, помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 30 мл воды (ципрофлоксацин, пefлоксацин, ломефлоксацин, моксифлоксацин) или спирта этилового (офлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин, спарфлоксацин) и интенсивно взбалтывали в течение 5 мин. 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 лекарственного вещества около 1 мг/мл.

**Капли и растворы для инъекций.** В пробирке к препарату прибавляли необходимое количество воды для получения раствора с концентрацией около 1 мг/мл.

**Мази.** В коническую колбу помещали 1,0 г мази и 3 мл воды (ципрофлоксацин) или спирта этилового (офлоксацин) и интенсивно взбалтывали в течение 15 мин. Полученную смесь фильтровали через бумажный фильтр типа “белая лента” в пробирку. Концентрация лекарственного вещества около 1 мг/мл.

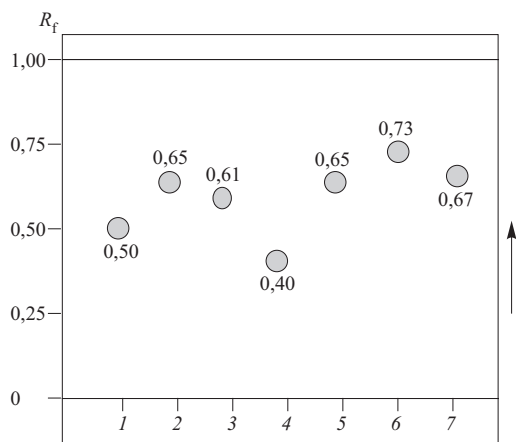
### **Условия хроматографирования**

Хроматографирование проводилось на пластинках для высокоэффективной ТСХ “Сорбфил” размером 10 × 10 см (ТУ 26-11-17-89, ЗАО “Сорбполимер”, Краснодар), покрытых силикагелем, с люминофорным покрытием. Пластины были представлены двумя видами, отличающимися между собой материалом подложки: алюминиевая фольга (ПТСХ-АФ-В-УФ) и полимер (ПТСХ-П-В-УФ).

На линию старта пластин с помощью микрошприца наносили 2 мкл испытуемого раствора (2 мкг действующего вещества). Пробы наносились таким образом, чтобы расстояние от места нанесения до левого или правого края пластины, а также между пятнами составляло не менее 14 мм. Подобным образом на пластину 10 × 10 см удавалось нанести 6 испытуемых растворов. Сушку проб осуществляли с помощью нагревательного устройства для сушки пластин УСП-1 (ЗАО “Сорбполимер”, Краснодар) при температуре около 70 °С.

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

Пробег фронта растворителя составлял 8,5 см. Проявление пятен фторхинолонов проводилось в свете



ТСХ фторхинолонов в ПФ метанол – раствор аммиака 25 % – этилацетат – ацетонитрил (1:1:2:1). Рядом с пятнами указаны значения  $R_f$ : 1 — ципрофлоксацин, 2 — офлоксацин, левофлоксацин, 3 — пefлоксацин, 4 — норфлоксацин, 5 — ломефлоксацин, 6 — спарфлоксацин, 7 — моксифлоксацин

УФ-лампы (при 254 нм) облучателя хроматографической УФС 254/365 (ЗАО “Сорбполимер”, Краснодар) после высушивания хроматографической пластинки на воздухе в течение 5 – 10 мин.

### Результаты и их обсуждение

Исследовано влияние ПФ различного состава и полярности на подвижность фторхинолонов и селективность хроматографической системы. Полярность ПФ оценивали по диэлектрической проницаемости входящих в ее состав растворителей [6, 7]. 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): бензол, толуол, диэтиловый эфир, хлороформ, этилацетат, кислота уксусная ледяная, изоамиловый спирт, бутанол, изопропиловый спирт, пропанол, ацетон, этанол, метанол, ацетонитрил, глицерин, раствор аммиака 25 %, формамид.

При увеличении содержания в ПФ высокополярных компонентов (раствор аммиака 25 %, формамид) резко повышается подвижность фторхинолонов, 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 увеличении содержания в ПФ компонентов с низкой полярностью (этилацетат, ледяная уксусная кислота) снижаются и подвижность исследуемых веществ, и селективность хроматографической системы. При использовании в ПФ бензола, толуола и хлороформа пятна фторхинолонов имеют значения  $R_f$  менее 0,2, либо остаются на линии старта.

Установлено, что оптимальные подвижность и разделение пятен фторхинолонов наблюдаются в ПФ с промежуточной полярностью (значение диэлектрической проницаемости смеси от 20 до 40), содержащих

следующие растворители: диэтиловый эфир, этилацетат, изоамиловый спирт, бутанол, изопропиловый спирт, этанол, метанол, ацетонитрил, раствор аммиака 25 %. При этом значения  $R_f$  находятся в пределах 0,2 – 0,8, что, согласно современным представлениям, является оптимальным [8]. Для подбора конечного состава ПФ учитывались следующие факты и предположения.

Показано, что для снижения эффекта размывания пятен фторхинолонов следует включать в состав ПФ раствор аммиака 25 %. Установлено, что оптимальное содержание раствора аммиака 25 % в ПФ составляет около 20 %.

Для увеличения селективности хроматографической системы необходимо использовать метанол. Сходные результаты дает также включение вместо метилового спирта этанола, но селективность при этом немного снижается. Оптимальное содержание метанола также составляет 20 %.

Оставшиеся 60 % состава ПФ должны включать в себя два растворителя, хорошо смешивающиеся с раствором аммиака 25 % и метанолом, и имеющие промежуточные, но значительно различающиеся между собой значения диэлектрической проницаемости. Последнее обстоятельство позволяет, меняя их соотношение, регулировать полярность ПФ, а, следовательно, выбирать оптимальную подвижность фторхинолонов. В качестве таких растворителей после ряда исследований были выбраны этилацетат и ацетонитрил (значение диэлектрической проницаемости, соответственно, около 6 и 37).

В результате был подобран оптимальный состав ПФ, являющийся универсальным для анализа всех исследованных фторхинолонов: метанол – раствор аммиака 25 % – этилацетат – ацетонитрил (1:1:2:1). Диэлектрическая проницаемость данной ПФ, рассчитанная как среднее взвешенное, имеет значение около 32. Значения  $R_f$  пятен фторхинолонов находятся в диапазоне 0,40 – 0,73. На рисунке схематично представлены соответствующие хроматограммы. Левофлоксацин является левовращающим изомером офлоксацина, и методом ТСХ на силикагеле эти два фторхинолона не разделяются.

Добиться полного разделения всех фторхинолонов ни в одной из исследованных ПФ не удалось.

Для дифференцирования офлоксацина и левофлоксацина необходимо использовать другие, в том числе стереоселективные методы анализа.

Детектирование в УФ-свете с использованием разработанной методики позволяет различать пятна фторхинолонов при нанесении на линию старта 0,5 мг действующего вещества. Поэтому, с одной стороны, для надежной идентификации, а с другой — для получения аккуратных пятен, на хроматографическую пластинку наносили 2 мг лекарственного вещества.

При проведении детектирования было отмечено, что офлоксацин, моксифлоксацин и спарфлоксацин различаются по способности флуоресцировать в УФ-свете. При длине волны 254 нм фторхинолоны де-

тектируются в виде темных пятен на светящемся (люминесцирующем) фоне пластины. Однако офлоксацин и моксифлоксацин при данной длине волны имеют более яркое сиреневое свечение, а спарфлоксацин флуоресцирует желто-зеленым светом. При облучении УФ-светом с длиной волны 365 нм интенсивность флуоресценции офлоксацина и моксифлоксацина значительно увеличивается (ярко-голубое свечение), а флуоресценция спарфлоксацина становится темно-серой. Все другие исследованные в данной работе фторхинолоны при длине волны 365 нм детектируются в виде пятен темно-синего цвета. Такая флуоресценция плохо видна на люминесцирующем фоне пластины и нехарактерна.

Разработанные методики установления подлинности фторхинолонов с использованием метода ТСХ включены в практическое руководство “Экспресс-анализ с целью выявления фальсифицированных лекарственных средств” и могут использоваться для выявле-

ния фальсифицированных субстанций и препаратов, не содержащих указанных на упаковке лекарственных веществ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, в 2-х т., 14-е изд., перераб., испр. и доп., ООО Издательство Новая Волна, Москва (2000).
2. Е. Н. Падейская, В. П. Яковлев, *Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике*, ЛОГАТА, Москва (1998).
3. *British Pharmacopoeia* (2001).
4. *European Pharmacopoeia*, 4th ed.
5. *The United States Pharmacopoeia*, 26th revision.
6. И. Т. Гороновский, Ю. П. Назаренко, Е. Ф. Некряч, *Краткий справочник по химии*, Наукова Думка, Киев (1974).
7. Э. Шталь, *Хроматография в тонких слоях*, Мир, Москва (1965).
8. Ф. Гейсс, *Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография)*, Том 1,2, Москва (1999).

Поступила 24.06.03.