

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2008

О. В. Чечета, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин, Г. А. Оголь

МЕТОД ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ОЦЕНКЕ СТЕПЕНИ ЧИСТОТЫ МАСЛЯНЫХ ПРЕПАРАТОВ ВИТАМИНА А

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Одним из важных этапов фармацевтического анализа является оценка степени чистоты лекарственных субстанций и препаратов на их основе. В настоящее время существует потребность в разработке простых, экономичных и доступных методов экспресс-анализа. Одним из таких методов является тонкослойная хроматография (ТСХ). В данной работе показана возможность применения метода ТСХ для контроля содержания и разделения примесей в масляных препаратах витамина А.

В настоящее время для анализа витамина А используются калориметрические методы [1]. Согласно фармакопейной статье (ФС) сопутствующие ретинола ацетату примеси в поливитаминных таблетках “глутамевит”, покрытых оболочкой, нормируются с помощью УФ-спектрофотометрии по отношению оптических плотностей $\lambda_{300}/\lambda_{325}$ [2]. Тот же способ определения примесей предлагает ФС ГФ XI изд. на индивидуальные лекарственные формы (ЛФ) ацетата и пальмитата витамина А [1].

Обзор литературы последних лет показал, что в фармацевтическом анализе жирорастворимых витаминов, в том числе ретинола и его эфиров, все большее значение приобретает метод ВЭЖХ, позволяющий одновременно контролировать подлинность, количественное содержание и наличие посторонних примесей [3–7]. Однако существует потребность в разработке более простых, экономичных и доступных методов экспресс-анализа. Одним из таких методов является тонкослойная хроматография (ТСХ). ТСХ последнее время активно используется в повседневной практике

фармакопейного анализа для определения подлинности и степени чистоты субстанций и ЛФ на их основе.

Целью работы являлось определение степени чистоты фармакопейного препарата масляного раствора ретинола ацетата 3,44 % в капсулах по 33000 МЕ различных производителей методом ТСХ.

Для исследования были взяты образцы 2 российских производителей данной ЛФ (далее производитель № 1 и № 2). На линию старта хроматографических пластинок марки “Sorbfil” размером 10×10 см в условиях, описанных в работе [8], наносили по 1 и 5 мкл спиртовых растворов препаратов с содержанием $2,84 \cdot 10^{-4}$; $5,68 \cdot 10^{-4}$; $1,14 \cdot 10^{-3}$; $2,27 \cdot 10^{-3}$; $4,54 \cdot 10^{-3}$ г/мл (рис. 1, 2). Хроматографирование осуществляли восходящим способом. Витамин А в исследуемых ЛФ был идентифицирован на хроматограммах с помощью таких специфичных проявителей, как серная (зоны окрашивались в темно-фиолетовый цвет) и хлорная (зоны окрашивались в коричневый цвет) кислоты [8, 9]. При использовании данных детектирующих реагентов на хроматограммах после проявления обнаруживались только зоны ретинола ацетата. Следует отметить, что величина относительной скорости пе-

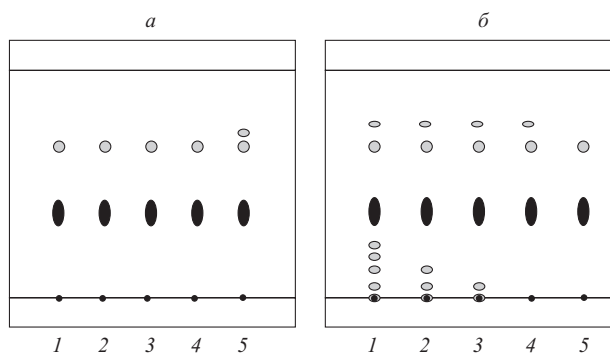


Рис. 1. Хроматограммы ретинола ацетата (производитель № 1): а — объем пробы 1 мкл (1 – 0,284 мкг; 2 – 0,568 мкг; 3 – 1,14 мкг; 4 – 2,27 мкг; 5 – 4,54 мкг); б — объем пробы 5 мкл (1 – 22,7 мкг; 2 – 11,35 мкг; 3 – 5,7 мкг; 4 – 2,84 мкг; 5 – 1,42 мкг).

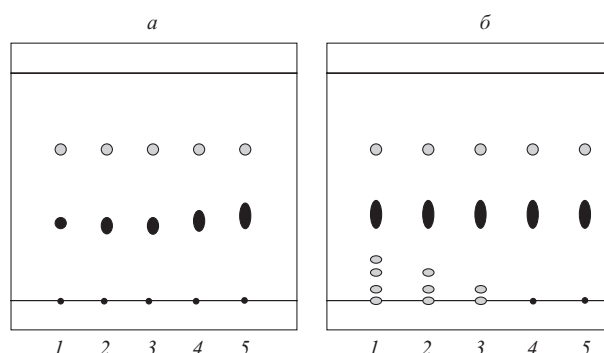


Рис. 2. Хроматограммы ретинола ацетата (производитель № 2): а — объем пробы 1 мкл (1 – 0,284 мкг; 2 – 0,568 мкг; 3 – 1,14 мкг; 4 – 2,27 мкг; 5 – 4,54 мкг); б — объем пробы 5 мкл (1 – 22,7 мкг; 2 – 11,35 мкг; 3 – 5,7 мкг; 4 – 2,84 мкг; 5 – 1,42 мкг).

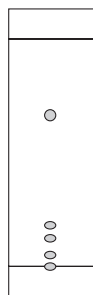


Рис. 3. Хроматограмма спиртового раствора соевого рафинированного масла (объем пробы 5 мкл; содержание масла 0,133 г/мл спиртового раствора).

ремещения вещества ($R_f = 0,46 \pm 0,02$) для витамина А с использованием в качестве элюента смеси растворителей гексан – хлороформ (2:1) [10] находится в интервале 0,3 – 0,5, что является оптимальным значением [11]. При использовании в качестве проявителя неспецифического реагента 10 % спиртового раствора фосфорномолибденовой кислоты с добавлением концентрированной хлористоводородной кислоты (25:1), кроме ретинола ацетата ($R_f = 0,46 \pm 0,02$), обнаруживалось большое количество дополнительных хроматографических зон в анализируемых ЛФ как производителя № 1, так и производителя № 2. Однако их количество было не одинаково. Определяемое вещество и посторонние зоны на хроматограмме проявлялись в виде пятен темно-синего цвета на желто-зеленом фоне. Нами также было установлено, что предел обнаружения витамина А с помощью выбранного детектирующего агента составил $2,84 \cdot 10^{-8}$ г или $8,25 \cdot 10^{-5}$ МЕ (0,1 мкл раствора с содержанием $2,84 \cdot 10^{-4}$ г/мл или 0,825 МЕ/мл), что говорит о высокой чувствительности данной методики.

На хроматограмме витамина А производителя № 1 отмечено разделение ретинола ацетата и дополнительных зон (предположительно примеси). При нанесении 0,284 мкг (точка 1а) обнаружено только основное пятно ретинола ацетата ($R_f = 0,46 \pm 0,02$) (рис. 1). С увеличением количества наносимого вещества число зон на хроматограмме увеличивалось. При хроматографировании ретинола ацетата с максимальным содержа-

Таблица 1
Параметры разделения зон ретинола ацетата и дополнительных хроматографических зон

№ зоны на хроматограмме	Значение R_f		
	производитель № 1	производитель № 2	масло – плацебо
1	$0,01 \pm 0,001$	$0,01 \pm 0,001$	$0,01 \pm 0,001$
2	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$
3	$0,1 \pm 0,01$	$0,1 \pm 0,02$	$0,1 \pm 0,01$
4	$0,15 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,02$
5 — примесь	$0,21 \pm 0,02$	–	–
6 — ретинола ацетат	$0,46 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,02$	–
7	$0,64 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,03$
8 — примесь	$0,74 \pm 0,02$	–	–

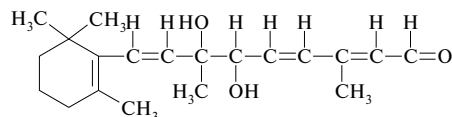


Рис. 4. Структурная формула антивитамина А.

нием — 22,7 мкг (точка 1б) — 7 пятен, 2 из которых выше зоны витамина А с величинами R_f , равными $0,64 \pm 0,03$ и $0,74 \pm 0,02$, и 5 — ниже с величинами R_f $0,01 \pm 0,001$; $0,04 \pm 0,01$; $0,1 \pm 0,01$; $0,15 \pm 0,02$; $0,21 \pm 0,02$ (рис. 1).

При нанесении таких же количеств ретинола ацетата производителя № 2 также обнаруживались посторонние хроматографические зоны (4 — ниже основного пятна с величинами R_f , равными $0,01 \pm 0,001$; $0,04 \pm 0,01$; $0,1 \pm 0,02$; $0,15 \pm 0,02$, и только 1 — выше со значением R_f $0,64 \pm 0,03$). Зон, с величинами R_f , равными $0,21 \pm 0,02$ и $0,74 \pm 0,02$, не обнаружено (рис. 2).

На следующем этапе работы проведено отнесение принадлежности неидентифицированных хроматографических зон примесей к рафинированному соевому маслу, которое в соответствии с нормативной документацией (НД) на изучаемое ЛС [12, 13], служит растворителем при производстве данной ЛФ. Для этого был проведен эксперимент с плацебо (рафинированное соевое масло без витамина А). Спиртовые растворы данного вида масла с содержанием, соответствующим таковому в изучаемых препаратах (0,00825; 0,0165; 0,033; 0,066 и 0,133 г/мл) хроматографировали в описанных выше условиях. На рис. 3 приведена хроматограмма спиртового раствора рафинированного соевого масла (5 мкл) с содержанием 0,133 г/мл. Было обнаружено 5 хроматографических зон с величинами R_f , равными $0,01 \pm 0,001$; $0,04 \pm 0,01$; $0,1 \pm 0,02$; $0,15 \pm 0,02$ и $0,64 \pm 0,03$. Результаты представлены в табл. 1.

Из данных табл. 1, рис. 1 – 3 следует, что дополнительные зоны на хроматограммах ЛФ витамина А различных производителей № 1 – 4 и № 7 соответствуют маслу — плацебо. Зоны № 5 и 8 на хроматограмме ретинола ацетата производителя № 1 (рис. 1, точка 1б) являются примесями, которые не обнаружены в мас-

Таблица 2
Параметры разделения зон ретинола ацетата с концентрацией $4,54 \cdot 10^{-3}$ г/мл (5 мкл) и дополнительных хроматографических зон (производитель № 1)

№ зоны на хроматограмме	K	L
1	99	$K_1/K_2 = 4,13$
2	24	$K_2/K_3 = 2,7$
3	9	$K_3/K_4 = 1,58$
4	5,7	$K_4/K_5 = 1,52$
5 — примесь	3,76	$K_5/K_6 = 3,2$
6 — ретинола ацетат	1,17	$K_6/K_7 = 2,1$
7	0,56	$K_7/K_8 = 1,6$
8 — примесь	0,35	

ляном растворе производителя № 2 (рис. 2, точка 1б). Таким образом, рекомендуемая картина разделения при нанесении 5 мкл пробы с концентрацией витамина А $4,54 \cdot 10^{-3}$ г/мл должна иметь вид, аналогичный хроматограмме на рис. 2 (точка 1б). Кроме основной зоны ретинола ацетата должно быть не более 5 дополнительных хроматографических зон, характерных для соевого масла.

В использованной элюирующей системе наблюдается удовлетворительное разделение хроматографических зон ретинола ацетата и дополнительных зон (рис. 1, точка 1б), так как значение селективности сорбции ($L = K_n/K_{n+1}$), т. е. отношение коэффициентов распределения (K) двух веществ больше единицы (табл. 2). Чем больше величина L , тем лучше картина разделения, так как зоны компонентов располагаются друг от друга на большом расстоянии [11]. Для трека с самым большим количеством нанесенного анализируемого раствора (точка 1б, рис. 1) параметры разделения представлены в табл. 2.

ФС на раствор ретинола ацетата в масле рекомендует определять лишь сумму поглощающих примесей при $\lambda = 300, 310, 320, 326, 330, 340$ и 350 нм [12]. ГФ Х изд. также предусмотрено проводить определение поглощающих примесей по отношению оптических плотностей при $\lambda = 300; 311,5; 326$ и 337 к 360 нм [13]. Согласно Европейской Фармакопее, родственные соединения и продукты распада в субстанции, а также в ЛФ ретинола определяют по отношению оптических плотностей при $\lambda = 300; 350$ и 370 к 326 нм [14]. Однако эти данные не отражают в полной мере количество допустимых примесей (свободный ретинол, дегидроретинол, ретиналь и ретиноевая кислота) и их концентрацию в препарате, а также наличие недопустимых примесей в ЛФ. К последним относится биологический антагонист витамина А — антивитамин А, представляющий собой гидроксильированное производное ретинола (рис. 4) [15].

Таким образом, в данной работе показана возможность применения метода ТСХ для контроля содержа-

ния и разделения примесей в масляных растворах препаратов витамина А. Кроме этого для препаратов, являющихся масляными растворами, следует определять такие показатели качества, как значение перекисного и йодного чисел — основных маркеров накопления продуктов окисления масла. Согласно ГФ Х изд. контролируется только величина кислотного числа [13]. В соответствии с Европейской фармакопеей в масляном растворе витамина А определяется еще и наличие пероксидов [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. ГФ XI изд., Вып. 2, Медицина, Москва (1990), сс. 41 – 45.
2. ФС 42-2798-99, “Таблетки глутамевит, покрытые оболочкой”.
3. А. П. Арбатский, Г. Н. Афоншин, В. М. Востоков, *Журн. аналит. химии*, **59**(12), 1304 – 1307 (2004).
4. Л. В. Денисова, В. Н. Филимонов, Л. Н. Балютинская и др., *Журн. аналит. химии*, **52**(9), 967 – 969 (1997).
5. С. А. Ключев, *Журн. аналит. химии*, **51**(9), 961 – 963 (1996).
6. Э. И. Козлов, И. А. Солунина, М. Л. Любарева и др., *Хим.-фарм. журн.*, **37**(10), 50 – 53 (2003).
7. А. И. Лутцева, Л. Г. Маслов, В. И. Середенко, *Хим.-фарм. журн.*, **35**(10), 41 – 45 (2001).
8. М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец, *Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии*, Мир, Москва (1980), т. 2, с. 610.
9. Ю. Кирхнер, *Тонкослойная хроматография*, Мир, Москва (1981), сс. 402 – 407.
10. О. В. Рыбакова, Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин, *Тез. докл. III Всеросс. конф. “Фармобразование – 2007”*, Воронеж (2007), ч. 1, сс. 301 – 303.
11. Ф. Гейсс, *Основы тонкослойной хроматографии*, Москва (1999), т. 1, 2, сс. 314 – 315.
12. ФС 42-7811-97, “Раствор ретинола ацетата в масле 33000 МЕ в капсулах”.
13. ГФ Х изд., Медицина, Москва (1968), сс. 588 – 589.
14. European Pharmacopoeia 3rd Edition, (2001), pp. 1590 – 1596.
15. Г. А. Мелентьева, *Фармацевтическая химия некоторых природных веществ с сильным биологическим действием*, Изд-во Мед. ин-та им. И. М. Сеченова, Москва (1964), сс. 48 – 56.

Поступила 10.07.2007

EVALUATION OF THE PURITY OF VITAMIN A OIL-BASED PREPARATIONS BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

O. V. Checheta, E. F. Safonova, A. I. Slivkin, and G. A. Ogol'

Voronezh State University, Voronezh, Russia

An important stage in the pharmaceutical analysis is the estimation of the degree of purity of parent substances and related preparations. There is a need in developing simple, economic and accessible methods for the rapid analysis. One of such methods is offered by thin-layer chromatography (TLC). In the present work, the possibility of using TLC for monitoring the content of impurities and for their separation and identification are considered in application to the technology of oil preparations of vitamin A.