



ХИМИЯ

УДК 543.544.5.068.7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ ОФ ВЭЖХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОРГАНИЗОВАННЫХ СРЕД

Н. В. Неврюева, Т. Д. Смирнова¹

Саратовский государственный медицинский университет
E-mail: natasha.k.83@mail.ru

¹Саратовский государственный университет
E-mail: smirnovatd@mail.ru

Показано, что при анализе лекарственных средств группы фторхинолонов методом обращено-фазовой ВЭЖХ с флуориметрическим детектором модификация подвижной фазы γ -циклодекстрином приводит к снижению предела обнаружения антибиотиков до 8 раз. Установлена возможность определения ципрофлоксацина в присутствии производных тетрациклинового и хинолонового рядов. Предлагаемая методика апробирована в анализе лекарственных препаратов, содержащих ципрофлоксацин.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, фторхинолоны, флуоресценция, организованные среды.

Method of Determination of Ciprofloxacin HPLC Using Organized Media in Pharmaceuticals

N. V. Nevryueva, T. D. Smirnova

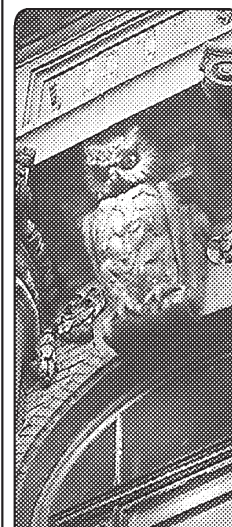
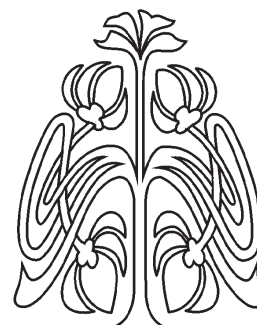
It is shown that in the analysis of medicines fluoroquinolone by reversed-phase HPLC with fluorimetric detection modification mobile phase γ -cyclodextrin leads to a decrease in the detection limit of antibiotics to 8 times. The possibility of determination of ciprofloxacin in the presence of tetracycline and quinolone derivative series. The proposed method is tested in the analysis of pharmaceutical preparations containing ciprofloxacin.

Key words: high performance liquid chromatography, fluoroquinolones, fluorescence, organized environment.

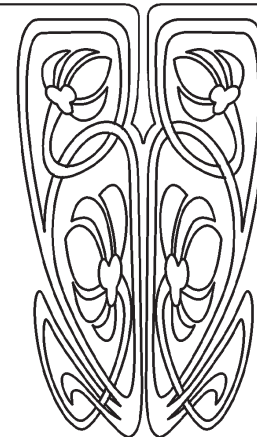
Введение

Обеспечение высокого качества лекарственных средств является одной из приоритетных задач в области здравоохранения Российской Федерации. Система контроля фармацевтического производства включает стадии мониторинга качества производства, эффективности и безопасности лекарственных препаратов, находящихся в обращении. В целях совершенствования контроля качества фармацевтической продукции возникает необходимость в простых и дешевых способах определения в них содержания основного вещества.

Антибиотики занимают особое место в химиотерапии инфекционных болезней. Производные тетрациклина и хинолона характеризуются широким спектром действия и находят применение в клинике и ветеринарии. Для определения ципрофлоксацина (ЦФ)



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ





используют микробиологические, спектрофотометрические, хроматографические методы анализа.

Неоспоримые преимущества хроматографических методов состоят в возможности анализа объектов сложного состава и одновременного определения нескольких биологически активных веществ, относящихся к одному классу соединений. Наиболее часто используют для определения фторхинолонов обращено-фазовую ВЭЖХ с флуориметрическим детектором [1]. В качестве подвижной фазы (ПФ) применяют высокотоксичную смесь метанол – вода, 50:50 (об./об.) [2], NaH_2PO_4 – ацетонитрил (85:15, об./об.) pH 6.0 [1, 3], смесь ацетонитрила и ацетатного буфера (pH 3.6) [4]. Время разделения компонентов анализируемой смеси может достигать 30–40 мин.

Известно, что использование организованных сред в составе подвижных фаз в некоторых случаях позволяет избежать применения токсичных растворителей, повысить интенсивность аналитического сигнала и сократить время разделения [5].

Целью настоящей работы является изучение влияния добавок некоторых циклодекстринов в подвижную фазу ВЭЖХ на разделение и чувствительность определения ЦФ с использованием флуориметрического детектора.

Экспериментальная часть

Реагенты. Растворы всех основных и вспомогательных химических реактивов готовят на бидистиллированной воде. Антибиотики фторхинолонового ряда – ЦФ, налидиксовая кислота (НК), флюмеквин (ФЛ) («Sigma»), а также тетрациклин (ТТ) и окситетрациклин (ОТТ) («Mergck») содержат не менее 98% основного вещества. Рабочие растворы антибиотиков концентрации 0.25 мг/мл готовят растворением точной навески. Используют водные растворы α -, β -, γ -циклодекстринов (ЦД) («Fluka») с содержанием основного вещества не менее 98%. Для приготовления подвижной фазы используют ацетонитрил («Panteas») с содержанием основного вещества 99,9%. Ацетатно-аммиачные буферные растворы готовят из 2М CH_3COOH и $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (квалификация х.ч.).

Аппаратура. Хроматографирование проводят на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Стайер» фирмы «Аквилон», Россия. Детектирование осуществляют с помощью флуориметрического детектора «Стайер» (Россия) с кварцевой галогеновой лампой. Раз-

делительная колонка – Phenomenex Luna 5u C_{18} с защитным картриджем («Phenomenex C_{18} »). Хроматограммы обрабатывают с помощью программы «Мультихром».

Результаты и их обсуждение

Выбор оптимальных условий разделения. Известно, что площадь хроматографического пика определяемого вещества зависит от ряда параметров и в первую очередь – от *состава подвижной фазы* (ПФ). В качестве органического растворителя нами выбран наименее токсичный и наиболее часто используемый на практике ацетонитрил. Для определения ЦФ апробированы ПФ состава ацетонитрил : ацетатно-аммиачный буферный раствор (pH 3.0–8.0); ацетонитрил – $2.7 \cdot 10^{-3}$ М щавелевая кислота (pH 2.5). Установлено, что в случае использования смеси ацетонитрил : ацетатно-аммиачный буфер (43:57 об./об.) площадь хроматографического пика ЦФ ($t_{\text{уд}} = 2.0$ мин) максимальна. Изучение *влияния кислотности* ПФ на хроматографическое разделение ЦФ в диапазоне pH 3.0–10.0 позволило установить, что интенсивность аналитического сигнала наблюдается при pH 4.3–4.5 ($t_{\text{уд}} = 2.0$ мин). При понижении кислотности площадь пика уменьшается, сокращается время удерживания, а в щелочной среде (pH 9.0) пик пропадает.

Как следует из литературы, в анализе чаще всего используют *скорость ПФ* 1 мл/мин. В нашем случае при уменьшении этого параметра в 2 раза время удерживания ЦФ возрастает до 10 мин, что увеличивает время анализа, а возрастание скорости потока ПФ способствует нежелательному увеличению давления в системе (до 140 мА). Таким образом, нами в качестве оптимальной выбрана скорость 1 мл/мин.

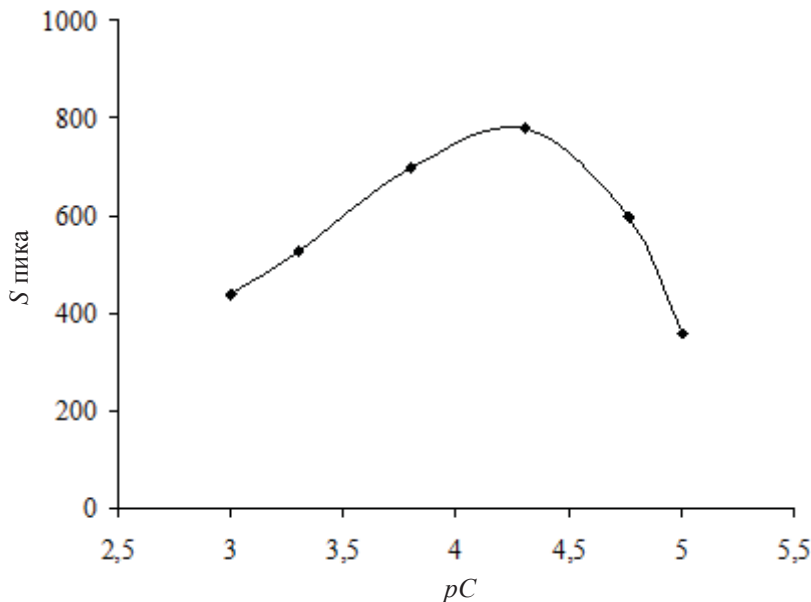
Время удерживания ЦФ в установленных оптимальных условиях хроматографирования составляет 2 мин.

Влияние организованных сред. Изучено влияние добавок различных концентраций α -, β -, и γ -ЦД в ПФ на величину площади хроматографического пика ЦФ. Показано, что хроматографические характеристики ЦФ в присутствии α - и β -ЦД не меняются ввиду небольших размеров полости циклодекстринов. В присутствии γ -ЦД при соотношении компонентов ПФ ацетонитрил : ацетатно-аммиачный буфер = 43:57 и оптимальной кислотности (pH 4.5) наблюдается увеличение площади пика в 1.5 раза. Такое возрастание интенсивности собственной флуоресценции аналита связано с



образованием комплекса включения и удалением молекул воды из его микроокружения, а также проявлением защитного эффекта полости циклодекстрина от влияния посторонних тушителей.

Время удерживания при добавлении в ПФ γ -ЦД не изменяется и составляет 2 мин. Площадь пика зависит от концентрации γ -ЦД и максимальна при $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (рисунок).



Зависимость площади хроматографического пика в системе ЦФ – γ -ЦД от концентрации – γ -ЦД, $C_{\text{ЦФ}} = 25 \text{ мкг/мл}$, ПФ: ацетонитрил: ацетатно-аммиачный буфер (43:57 об./об., рН = 4,5), время удерживания 2 мин

Построение градуировочного графика. В каждую из десяти пробирок вносят 1 мкл ацетатно-аммиачного буферного раствора (рН 4,5), добавляют $0,25 \text{ мкл } 1 \cdot 10^{-3} \text{ M } \gamma$ -ЦД, раствор ЦФ в диапазоне концентраций от 0,10–300 мкг/мл, буферный раствор до общего объема 5 мкл и

тщательно перемешивают. Из каждой пробирки отбирают 50 мкл и вводят в хроматограф. В табл. 1 представлены некоторые метрологические характеристики определения ЦФ. Как видно из табл. 1, в присутствии ЦД предел обнаружения (ПрО) понижается в 9 раз.

Таблица 1

Метрологические характеристики определения ЦФ

Фторхинолон	Модификатор ПФ	Диапазон определяемых концентраций, мкг/мл	ПрО, мкг/мл	Уравнение градуировочного графика	r^2
ЦФ	–	2,5–100	1,7	$y = 17,6x + 80,6$	0,99
	γ -ЦД	0,25–75	0,2	$y = 28,5x + 64,5$	0,99
ЦФ в присутствии некоторых антибиотиков	–	2,5–100	1,4	$y = 15,4x + 220$	0,99
	γ -ЦД	0,25–75	0,2	$y = 26,6x + 64,5$	0,99

Определение ЦФ в смеси с некоторыми антибиотиками. Изучена возможность хроматографического определения ЦФ в присутствии флюомеквина, тетрациклина и окситетрациклина. Установлено, что время удерживания ЦФ в указанных условиях отличается от времен удерживания представленных антибиотиков (табл. 2).

Для построения градуировочного графика определения ЦФ в присутствии других антибиотиков в каждую из десяти пробирок вносят 1 мл ацетатно-аммиачного буферного раствора (рН 4,5), добавляют $0,25 \text{ мкл } 1 \cdot 10^{-3} \text{ M } \gamma$ -ЦД, 0,10–100 мкг/мл ЦФ и антибиотики так, чтобы их концентрация в растворах составляла 50 мкг/мл, разбавляют буферным раствором



Таблица 2

Количественные хроматографические характеристики антибиотиков в присутствии γ -ЦД

Антибиотик	Время удерживания, мин	Площадь пика	F_{ass}	α	N
Ципрофлоксацин	2.0	810.0	0.87	1.7	$6.30 \cdot 10^3$
Флюмеквин	12.8	47.25	0.84	11.6	$1.22 \cdot 10^3$
Налидиксовая кислота	3.8	534.3	0.75	2.8	$1.54 \cdot 10^3$
Тетрациклин	2.7	67.90	0.84	1.7	$1.13 \cdot 10^3$
Окситетрациклин	6.2	642.7	0.80	5.3	$2.96 \cdot 10^3$

Примечание. α – коэффициент селективности, $\alpha = (t_R - t_m)_1 / (t_R - t_m)_2$, где t_R – время удерживания антибиотика, t_m – время пребывания антибиотика в подвижной фазе; N – число теоретических тарелок, $N = 16(t_R/W)^2$, t_R – удерживания, W – ширина пика у основания.

до общего объема 5 мкл и 50 мкл вводят в хроматограф. Результаты анализа представлены в табл. 2. Как видно из табл. 2, пик, соответствующий ЦФ, имеет наибольшую площадь и характеризуется максимальным числом теоретических тарелок.

Определение ЦФ в лекарственных препаратах. Методика апробирована на лекарственных препаратах, содержащих ЦФ, – глазных каплях различного производства: «Ципролет» фирмы Dr. Reddy's laboratories (Индия), «Ципрофлоксацин» АКОС Синтез (г. Курган), «Ципромед» Promed Exports (Индия). Кроме определяемого ЦФ, лекарственный препарат содержит вспомогательные вещества: этилендиаминтетрауксусную кислоту, маннитол, ацетат натрия, уксусную кислоту, которые, как нами предварительно установлено, не мешают определению.

Методика определения. Исследуемый раствор (0.2 мкл) лекарственных препаратов после 25-кратного разбавления помещают в две пробирки и добавляют в каждую 0.25 мкл $5 \cdot 10^{-3}$ М γ -ЦД, в одну из них – стандартную добавку ЦФ (20–30 мкг/мл) и разбавляют до общего объема 5 мкл ацетатно-аммиачным буферным раствором pH 4.5, затем 50 мкл вводят в хроматограф, измеряют аналитический сигнал для двух проб с добавкой и без нее. Содержание ЦФ в лекарственном препарате определяют по формуле

$$C_x = 25 \cdot C_{ст} \cdot S_1 / S_2 - S_1,$$

где $C_{ст}$ – стандартная добавка ЦФ, мг/мл; S_1 – площадь пика для пробы без добавки; S_2 – площадь пика ЦФ для пробы со стандартной добавкой; C_x – искомая концентрация ЦФ в лекарственном препарате, мг/мл.

Результаты определения представлены в табл. 3.

Правильность определения контролировали методом «введено–найдено».

Таблица 3
Результаты определения ЦФ в лекарственных препаратах, заявленное содержание 3 мг/мл ($n = 3, P = 0.95$)

Препарат	Найдено, мг/мл	S_r
«Ципролет», Индия	2.62 ± 0.07	0.03
«Ципрофлоксацин», Курган	2.49 ± 0.15	0.06
«Ципромед», Индия	2.29 ± 0.05	0.02

Выводы

Установлено, что при определении антибиотиков группы фторхинолонов методом обращено-фазовой ВЭЖХ с флуориметрическим детектором модификация подвижной фазы γ -циклодекстрином приводит к снижению предела обнаружения до 9 раз. Показана возможность определения ципрофлоксацина в присутствии антибиотиков тетрациклинового и хинолонового рядов. Время удерживания ципрофлоксацина составляет всего 2 мин, что позволяет сократить анализ исследуемых объектов. Предлагаемым способом установлено содержание ципрофлоксацина в трех лекарственных препаратах.

Список литературы

1. Ramos M., Aranda A., Garcia E., Reuvers T., Hooghuis H. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection // J. Chromatogr. B. 2003. Vol. 789, № 2. P. 373–381.
2. Dincel A., Yildirim F., Caglayan F., Bozkyrt A. Determination of ciprofloxacin in human gingival crevicular fluid by high-performance liquid chromatography // Acta Chromatogr. 2015. № 15. P. 308–314.
3. Imre S., Dogaru M. T., Vari C. E., Muntean T., Kelemen L. Validation of an HPLC method for the determination of ciprofloxacin in human plasma // J. Pharm. Biomed. Anal. 2003. Vol. 33, № 1. P. 125–130.



4. Zotou A., Miltiadou N. Sensitive LC determination of ciprofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids with fluorescence detection // J. Pharm. Biomed. Anal. 2002. Vol. 28, № 3–4. P. 559–568.
5. Штыков С. Н. Химический анализ в нанореакторах : основные понятия и применение // Журн. аналит. химии. 2002. Т. 57, № 10. С. 1018–1028.
6. Студ Д. В., Эмвуд Д. Л. Супрамолекулярная хи-

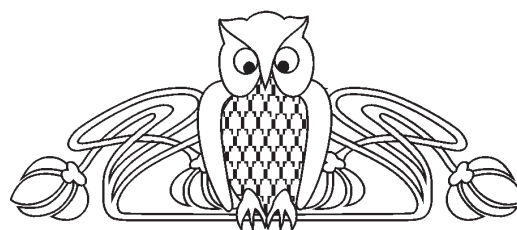
- мия : в 2 т. Т. 1. М. : Академкнига, 2007. С. 372–379.
7. Штыков С. Н., Смирнова Т. Д., Былинкин Ю. Г., Калашникова Н. В., Жемеричкин Д. А. Определение ципрофлоксацина и энрофлоксацина методом сенсibilизированной флуоресценции европия в присутствии второго лиганда и мицелл анионных ПАВ // Журн. аналит. химии. 2007. Т. 62, № 2. С. 153–157.

УДК 543-412:546.171.6:544.127

СИНТЕЗ И СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФЕНИЛАЗОНАФТОЛОВ

М. З. Т. Аль-Саиди^{1, 2}, С. Н. Штыков¹

¹Саратовский государственный университет
²AL-Mustansiriyah University, College of Science,
Department of Chemistry, Iraq
E-mail: m19z73@yahoo.com
E-mail: shtykovsn@mail.ru



Описан синтез восьми фенилазонафтолов, содержащих гидроксид-, карбокси-, сульфо- и альдегидные группы. Приведены данные об их элементном составе, результатах термогравиметрического, ЯМР-спектроскопического исследования и электронные спектры поглощения в этаноле.

Ключевые слова: фенилазонафтолы, синтез, спектральные свойства.

Synthesis and Spectroscopic Study of Some Phenylazonaphthols

M. Z. T. Al-Saidi, S. N. Shtykov

Synthesis of eight phenylazonaphthols containing hydroxyl-, carboxy-, sulpho- and aldehyde groups was described. The data concerning elemental, thermogravimetric analysis, NMR-spectra and electronic absorption spectra in ethanol were described.

Key words: phenylazonaphthols, synthesis, spectral properties.

Введение

Согласно мировым оценкам, азосоединения составляют около 70% всех выпускаемых в мире красителей, что обусловлено легкостью их синтеза, большим разнообразием структур и цветовой гаммы, яркостью и устойчивостью окраски [1–3]. Синтетические азосоединения широко используются в настоящее время в пищевой, текстильной, полимерной, фармацевтической, косметической, судостроительной, автомобильной промышленности, химии, биологии, медицине, нелинейной оптике и аналитической химии в качестве красителей, пигментов, лекарственных препаратов, комплексообразующих реагентов, молекулярных зондов, фотохромных

веществ, элементов хранения информации, в фотодинамической терапии, цифровой электронике и т.д. [3–8].

Одним из отличительных свойств азосоединений, влияющих на их окраску и химическое поведение, является азохинонгидразонная таутомерия, впервые обнаруженная еще в середине XIX века [9]. Постоянный интерес к таутомерии азосоединений в аналитической химии вызван разной окраской таутомеров, их разным содержанием в твердых препаратах и растворах и разной реакционной способностью по отношению к ионам металлов [9, 10].

Анализ литературы показал, что у одних азосоединений электронные спектры поглощения таутомеров сильно перекрываются, что затрудняет изучение таутомерного равновесия, а у некоторых – азо- и хинонгидразонным таутомерам соответствуют практически индивидуальные полосы [9–13]. Для объяснения таких отличий необходимы систематические исследования факторов и путей направленного воздействия на таутомерное равновесие соединений, что имеет не только теоретическое, но и важное практическое значение, поскольку позволяет регулировать содержание в растворе комплексообразующей формы органического реагента и определять конечный аналитический эффект.

Известно, что соотношение концентраций таутомерных форм в растворе зависит от строения молекулы, природы и положения в ней заместителей, концентрации самого вещества,