

# Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2008

А. С. Осипов<sup>1</sup>, Е. Б. Нечаева<sup>1</sup>, Н. Б. Демина<sup>2</sup>,  
В. А. Кеменова<sup>3</sup>, Е. В. Великая<sup>2</sup>

## ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КОЛОНОК ОТЕЧЕСТВЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА ДЛЯ АНАЛИЗА ПРЕПАРАТОВ ОРГАНИЧЕСКИХ НИТРАТОВ

<sup>1</sup> Институт стандартизации лекарственных средств ФГУ НЦ ЭСМП, Москва;

<sup>2</sup> ГОУ ВПО Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова, Москва;

<sup>3</sup> НИЦ БМТ ВИЛАР, Москва

В работе представлены результаты изучения возможности применения хроматографических колонок российских производителей, имеющих значительно меньшую стоимость, чем их импортные аналоги, для анализа лекарственных препаратов из группы органических нитратов. Показано, что колонки с сорбентами типа С 18 (Диасфер 110С18, Диасорб 13016Т, Диасфер 110С16) так же, как и колонки с нитрильными группами (Диасфер 110 нитрил, Диасфер 110С10СН) могут успешно применяться для этих целей.

Лекарственные препараты, содержащие органические нитраты, нашли применение в медицинской практике для лечения и профилактики стенокардии, лечения острой и хронической сердечной недостаточности [1, 2]. Наибольшее распространение получили препараты, содержащие следующие действующие вещества: тринитрат глицерина (нитроглицерин, НГ), изосорбида динитрат (ИСДН) и изосорбида 5-моонитрат (ИСМН). Их применяют в различных лекарственных формах: инъекционных растворах, таблетках, капсулах, аэрозолях для сублингвального применения, в виде мазей и аппликационных лекарственных форм. Нитроглицерин входит в состав капель для приема внутрь сложного состава, содержащих также настойки валерианы, ландыша, красавки [2].

Контроль качества лекарственных препаратов, содержащих органические нитраты, по показателям “однородность дозирования”, “растворение”, а также исследование кинетики высвобождения действующих веществ из пролонгированных лекарственных форм методом высокоэффективной жидкостной хроматографии связан с большим объемом аналитической работы. В этих условиях снижение себестоимости исследований имеет немаловажное значение.

Целью данной работы явилось исследование возможности применения хроматографических колонок отечественного производства, имеющих значительно меньшую стоимость, чем их импортные аналоги (в 2 – 2,5 раза), для анализа лекарственных препаратов из группы органических нитратов.

Изучение монографий зарубежных Фармакопеев показало, что для анализа препаратов данной группы нашли преимущественно применение колонки, содержащие сорбент октадецилсилил силикагель (фаза С18) (табл. 1) [3 – 5]. В Британской Фармакопее кроме типа колонок приводятся также их марки. Так, для анализа таблеток и сублингвального спрея нитроглицерина ре-

комендовано использовать колонки Nucleosil ODS или Nucleosil C18 250 × 4,6 мм, 5 мкм, для таблеток ИСДН — Lichrosorb NH<sub>2</sub> 250 × 4,6 мм, 10 мкм и для таблеток ИСМН — Spherisorb ODS2 250 × 4,6 мм, 5 мкм в условиях нормально-фазовой хроматографии.

Для анализа субстанции и лекарственных форм нитроглицерина в зарубежных Фармакопеех описано применение подвижных фаз, состоящих из смеси воды и метанола или воды и ацетонитрила. Для анализа ИСДН и ИСМН применяются более разнообразные по составу подвижные фазы. Так, в Фармакопее США в соответствующих статьях на препараты ИСДН применяются подвижные фазы, состоящие из буферного раствора и органического растворителя в соотношении от 45:55 до 52:48. В качестве последнего используют метанол или ацетонитрил. Для создания буфера (рН 4,7) применяют аммония ацетат и ледяную кислоту, аммония сульфат (рН 3,0) и калия дигидрофосфат (50 мМ, без корректировки значения рН). В Европейской и Британской Фармакопеех для анализа ИСМН и ИСДН в качестве подвижной фазы применяют смесь абсолютного этанола с 2,2,4-триметилпентаном в соотношении 15:85 или смесь метанола и воды в соотношении 30:70.

На основании вышесказанного для оптимального подбора хроматографических условий определения органических нитратов было апробировано несколько видов колонок отечественного производства, содержащих сорбенты типа С18 и с нитрильными группами. В качестве подвижной фазы использовали смеси ацетонитрила с фосфатным буфером со значением рН в интервале от 3,0 до 7,0 и соотношениях, указанных в табл. 2.

Выбор условий проведения анализа осуществляли на хроматографе “Agilent”, серия 1100 с диодно-матричным детектором DAD G 1315 B (Agilent Technologies, США) и изократическом хроматографе с детектором SPD-10A (Shimadzu, Япония) и программным обеспечением “МультиХром”, версия 1,52h (Амперсенд, Россия). Хроматографические параметры пика ИСДН были рассчитаны с использованием расчетных формул Фармакопеи США.

В работе применяли следующие колонки: Диасфер (БиоХимМак, Россия), Диасорб (Элсико, Россия), Luna и Kromasil (Phenomenex, США).

Использовали стандартные образцы органических нитратов Европейской Фармакопеи. Подготовка стандартных образцов заключалась в их растворении в смеси ацетонитрила и воды в соотношении 4:6. Содержание действующих веществ в стандартах: НГ — 10 %, ИСДН — 40 % и ИСМН — 88,9 %.

Объектами исследования являлись:

— раствор нитроглицерина 1 мг/мл — концентрат для приготовления инфузий в ампулах, производства ЗАО Медико-технологический холдинг “МТХ” (I);

— “Карниланд”, капли для приема внутрь — комплексный препарат, содержащий НГ и другие компоненты, производства ФГУП “Межбольничная аптека” МЦ УДП РФ (II);

— таблетки ИСДН пролонгированного действия 0,06 г опытная партия производства ЗАО “Фармапэк” (III).

Подготовка проб:

(1) 2 мл препарата I доводили до объема 10 мл подвижной фазой;

(2) 5 мл препарата II доводили до объема 10 мл подвижной фазой;

(3) точную навеску порошка измельченных таблеток III (0,4 г) растворяли в мерной колбе объемом 100 мл в смеси ацетонитрила с водой (1:1) и выдерживали на ультразвуковой бане 15 мин.

Все пробы и растворы стандартных образцов перед введением в хроматограф фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм (БиоХимМак, Россия).

### Результаты и их обсуждение

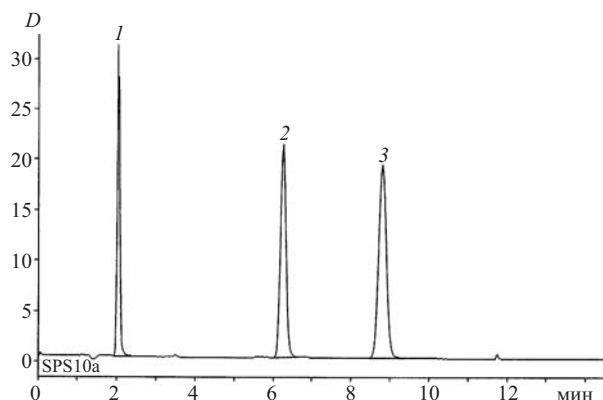
По данным литературы детектирование органических нитратов осуществляют при 210 нм (подвижные фазы с ацетонитрилом) или при 220 – 230 нм (подвижные фазы с метанолом). Проведенные нами исследования показали, что увеличение волны при детектировании с 210 до 225 нм уменьшает отклик детектора на органические нитраты в 2 – 2,5 раза, в связи с чем детектирование в более низковолновой области предпочтительнее.

На рис. 1 приведена хроматограмма разделения модельной смеси стандартных образцов органических

Таблица 1

Условия анализа препаратов НГ, ИСДН, ИСМН по USP, EP и BP

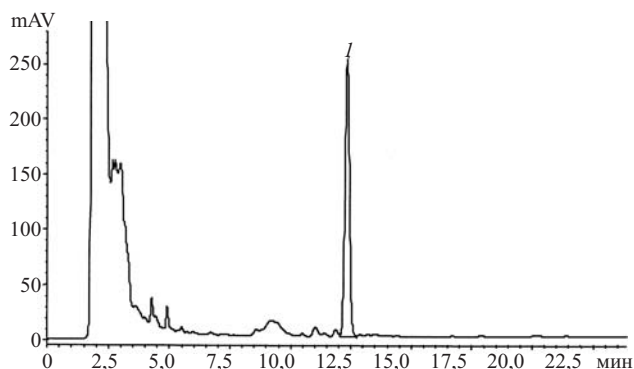
Лекарственное вещество	Субстанция или лекарственная форма	Фармакопея	Условия анализа		
			Подвижная фаза	Длина волны при детектировании, нм	Сорбент
НГ	Субстанция	USP	Метанол – вода, 1:1	220	C 18
	Сублингвальный спрей	EP, BP	Ацетонитрил – вода, 1:1	210	C 18 (Nucleosil C 18)
	Трансдермальные пластыри	“-“	“-“	“-“	“-“
	Сублингвальные таблетки	“-“	Ацетонитрил – вода, 40:60	“-“	C 18 (Nucleosil ODS)
ИСДН	Субстанция	USP	Буфер ацетата аммония с ледяной кислотой pH 4,7 – метанол, 45:55	220	C 18
	“-“	EP, BP	Этанол – триметилпентан, 15:85	230	Аминопропилсилил силикагель (Lichrosorb NH <sub>2</sub> )
	Таблетки	“-“	<b>Количественный анализ</b> Этанол – триметилпентан, 15:85	215	Аминопропилсилил силикагель (Lichrosorb NH <sub>2</sub> )
			<b>Высвобождение</b> Метанол – вода, 1:1	222	Hypersil ODS
	“-“	USP	<b>Количественный анализ</b> Буфер ацетата аммония с ледяной кислотой pH 4,7 – метанол, 45:55	220	C 18
			<b>Высвобождение</b> Сульфат аммония pH 3,0 – метанол, 1:1	220	C 18
	Капсулы, таблетки	USP	<b>Количественный анализ</b> Буфер ацетата аммония с ледяной кислотой pH 4,7 – метанол, 45:55	220	C 18
			<b>Высвобождение</b> Дигидрофосфат калия – ацетонитрил, 52:48	224	C 18
ИСМН	Субстанция	EP, BP	Этанол – триметилпентан, 15:85	230	Аминопропилсилил силикагель (Lichrosorb NH <sub>2</sub> )
	Таблетки	“-“	Метанол – вода, 30:70	220	C 18 (Spherisorb ODS 2)
	Таблетки пролонгированные	“-“	“-“	“-“	“-“



**Рис. 1.** Хроматограмма разделения смеси органических нитратов. Условия анализа: колонка — Диасфер 110 С18 150 × 4,6 мм, 5 мкм; скорость потока — 1,0 мл/мин; подвижная фаза — ацетонитрил — 25 мМ фосфат (рН 6,5) 50:50; детектирование при 210 нм. 1 — изосорбида динитрат, 2 — изосорбида динитрат, 3 — нитроглицерин

нитратов на колонке с сорбентом Диасфер 110 С18. Элюирование компонентов анализируемой смеси осуществляется в соответствии с числом нитрогрупп, содержащихся в молекуле анализируемого соединения. Разделение компонентов смеси на колонках Диасорб 130С16Т, Диасфер 110 С16 и колонках с нитрильными сорбентами имело аналогичный порядок элюирования, что может быть использовано при проверке пригодности хроматографической системы при выполнении измерений.

Препарат I анализировали на колонке Диасфер 110 С16 150 × 4 мм, 5 мкм. Условия анализа: подвижная фаза ацетонитрил – вода (1:1), скорость потока — 0,8 мл/мин. При данных условиях хроматографирования параметры пика нитроглицерина были сходны с параметрами пика РСО нитроглицерина, полученными на колонке с сорбентом Диасфер 110 С18 и представленного на рис. 1.



**Рис. 2.** Хроматограмма лекарственного препарата “Карниланд”. Условия анализа: колонка (250 × 4 мм), заполненная сорбентом Диасфер 110 С16 (5 мкм); подвижная фаза — смесь ацетонитрила с водой (1:1); скорость потока 0,8 мл/мин; детектирование при 210 нм. 1 — нитроглицерин

Хроматограмма лекарственного препарата II, полученная на колонках с сорбентом Диасфер 110 С16 250 × 4 мм приведена на рис. 2. Несмотря на то, что концентрация нитроглицерина в препарате составляет всего 0,04 %, он достаточно четко детектируется на фоне компонентов настоек валерианы и ландыша. Таким образом, нитроглицерин уверенно определяется на использованных типах колонок, как в растворе, так и в многокомпонентных лекарственных препаратах.

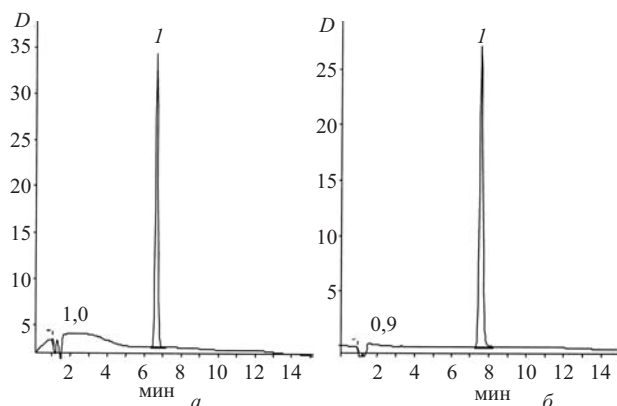
Хроматографирование ИСДН было изучено более детально, поскольку исследуемый образец — таблетки ИСДН пролонгированные — разработаны ЗАО “Фармапэк” и выпущены опытной серией. Для пролонгирования высвобождения ИСДН в состав таблеток введен интерполимерный комплекс (ИПК) полиметакриловой кислоты и полиэтиленгликоля [6, 7]. Природа интерполимерных комплексов, стабилизированных кооперативным взаимодействием полимерных компонентов, обуславливает их высокую чувствительность к изменяющимся факторам внешней среды, в частности, к

Таблица 2

**Условия анализа и хроматографические параметры определения ИСДН**

Условия анализа			Хроматографические параметры			
Колонка	подвижная фаза	скорость потока, мл/мин	t, мин	K'	ТТ/м	Фактор асимметрии
Luna C18(2) 150 × 4,6 мм, 5 мкм	ацетонитрил – 50 мМ фосфатный буфер (рН 3), 40:60	1	12,73	9,94	72554	1,12
	ацетонитрил – 50 мМ фосфатный буфер (рН 7), 40:60	1	12,93	10,64	72281	1,08
	ацетонитрил – 50 мМ фосфатный буфер (рН 7), 50:50	1	6,57	4,57	69182	1,15
Kromasil C18 150 × 4,6 мм, 5 мкм	ацетонитрил – 50 мМ фосфатный буфер (рН 6,5), 50:50	1	6,22	5,12	68388	1,13
	ацетонитрил – 50 мМ фосфатный буфер (рН 7), 50:50	1	7,55	6,90	65365	1,15
Диасорб 130С16Т 150 × 4,0 мм, 6 мкм	ацетонитрил – 50 мМ фосфатный буфер (рН 6,5), 50:50	0,8	5,57	3,69	59005	0,99
Диасфер 110С10СN 250 × 4,0 мм, 5 мкм	ацетонитрил – 50 мМ фосфатный буфер (рН 6,5), 50:50	0,8	9,62	5,17	67898	0,97
Диасфер 110 нитрил 250 × 4,0 мм, 5 мкм	ацетонитрил – 50 мМ фосфатный буфер (рН 6,5), 50:50	0,8	6,67	2,74	58118	1,19

**Примечание:** t, мин — время удерживания в мин; K' — коэффициент емкости; ТТ/м — число теоретических тарелок на 1 м.

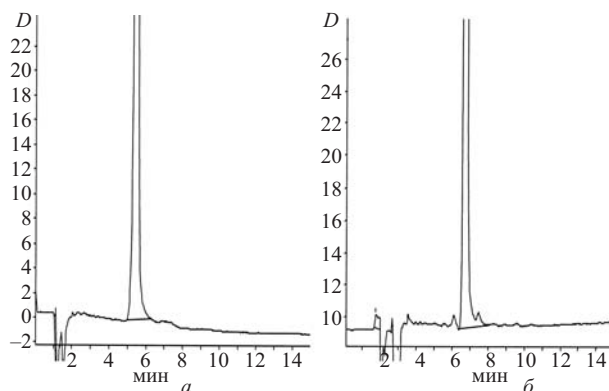


**Рис. 3.** Хроматограммы таблеток ИСДН пролонгированного действия, полученные с применением колонок (а) — Диасфер 110С18 5 мкм, 150 × 4,6 мм, (б) — Luna 18(2), 5 мкм, 150 × 4,6 мм. Условия анализа: колонка, подвижная фаза — смесь ацетонитрила с 25 мМ  $K_2HPO_4$  (рН 6,5) 50:50; скорость потока 1,0 мл/мин; детектирование при 210 нм. 1 — изосорбид динитрат

изменению рН. Так, ИПК, используемый в составе пролонгированных таблеток ИСДН, стабилизирован водородными связями и переходит от слабо набухающего продукта (содержание воды около 40 %) к неограниченно набухающему в интервале рН 4,5–5,0, причем переход происходит резко. Поэтому введение ИПК в лекарственную форму эффективно тормозит транспорт лекарственного вещества из лекарственной формы в условиях, моделирующих желудок, и обеспечивает высвобождение лекарственного вещества в условиях, моделирующих кишечник.

При разработке условий анализа лекарственной формы учитывали наличие в образце полимерного комплекса с рН-зависимой растворимостью. В связи с этим аналитические исследования были направлены на возможность использования нейтральных и щелочных сред, позволяющих полностью растворить навеску растертых таблеток и предотвратить возможную концентрацию полимерных молекул внутри колонок на поверхности частиц сорбента. Поскольку силикагели Диасфер и Диасорб неустойчивы в щелочной среде, использовали подвижную фазу со значением рН 6,5. Условия анализа ИСДН представлены в табл. 2.

Из данных, представленных в таблице, видно, что изменение рН от 3,0 до 7,0 не оказывало значительного влияния на время удерживания ИСДН, однако применение нейтральных буферных растворов повышало отклик детектора на ИСДН на 10–15 %. Хроматографические параметры пиков ИСДН, полученные на оте-



**Рис. 4.** Фрагмент хроматограммы субстанции ИСДН. Условия хроматографии аналогичны приведенным на рис. 2. а — анализ ИСДН на колонке Диасорб 130С16Т 150 × 4,0 мм 6 мкм, б — анализ ИСДН на колонке Диасфер 110 нитрил 250 × 4,0 мм 5 мкм

чественных колонках с сорбентами типа С18 и с нитрильными группами, близки к параметрам пиков, полученных на колонках известного зарубежного изготовителя Phenomenex (США) при использовании аналогичных по составу подвижных фаз (рис. 3).

При сравнении данных рис. 4 (а, б) обращает на себя внимание тот факт, что применение колонок Диасфер 110нитрил, обладающих высокой селективностью к исследуемому соединению, улучшает разрешение при анализе, в результате чего их можно считать перспективными для разработки анализа минорных примесей.

В заключение следует отметить, что с помощью метода ВЭЖХ во всех проанализированных лекарственных препаратах было подтверждено заявленное изготовителями содержание действующих веществ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ю. Б. Белоусов, В. С. Моисеев, В. К. Лепяхин, *Клиническая фармакология и фармакотерапия*, Универсум, Москва (1993), сс. 67–75.
2. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства (пособие для врачей)*, Т. 1, Москва (2000), сс. 376–383.
3. The United States Pharmacopoeia XXVII ed.
4. British Pharmacopoeia 2004.
5. The Pharmacopoeia of Japan 2000.
6. Е. В. Великая, В. А. Семенова, Н. Б. Демина, *Тез. докл. XI Российского национального конгресса "Человек и лекарство"*, Москва (2004), с. 771.
7. Н. Б. Демина, В. А. Семенова, Е. В. Великая, В. Л. Багирова, *Хим.-фарм. журн.*, **37**(5), 13–19 (2003).

Поступила 08.06.06

## ORGANIC NITRATE DERIVATIVE ANALYSIS WITH DOMESTIC CHROMATOGRAPHIC COLUMNS

A. S. Osipov<sup>1</sup>, E. B. Nechaeva<sup>1</sup>, N. B. Demina<sup>2</sup>, V. A. Kemenova<sup>3</sup>, and E. V. Velikaya<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Sechenov Medical Academy, Moscow, Russia,

<sup>3</sup> Scientific Center for Biomedical Technologies, State Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR), Moscow, Russia

The possibility of using domestic chromatographic columns for organic nitrate derivative drug analysis was studied. A considerable advantage of these columns is in their cost, which is rather low in comparison with the imported analogues. The research results proved that columns with sorbents of C18 type (Dyaspher 110S18, Dyasorb 13016T, Dyaspher 110S16) as well as columns with nitrite groups (Dyaspher 110nitrit, Dyaspher 110C10CN) can be successfully used for the above mentioned purposes.