УДК 615.33:543(072)

РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ АНАЛИЗА АЗИТРОМИЦИНА И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИ ОЦЕНКЕ КАЧЕСТВА И СТАБИЛЬНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ЛОКАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

Т.А. БРЕДИХИНА[1]
Т.А. ПАНКРУШЕВА[2]

[1]Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко

[2]Курский государственный медицинский университет

e-mail: bredichina-tat@yandex.ru

Предложена методика идентификации азитромицина в субстанции и разработанных лекарственных формах локального действия (вагинальные суппозитории, изготовленные на основах витепсол и бутирол, гель на основе метилцеллюлозы) с помощью хроматографии в тонком слое сорбента. Определены наиболее оптимальные системы хроматографирования и условия экстракции антибиотика из лекарственных форм. ТСХ-методика использована при стандартизации и установлении сроков годности для суппозиториев и геля с азитромицином.

Ключевые слова: азитромицин, суппозитории, гели, тонкослойная хроматография, качественный анализ, стабильность.

Азитромицин – антибиотик макролидного ряда, является полусинтетическим производным эритромицина. В клинической практике применяется уже более 30 лет и рекомендуется, в том числе, для лечения различных инфекций, передаваемых половым путем [5, 6]. Выпускается в лекарственных формах для энтерального и парентерального применения и имеет более 20 торговых названий [3]. При лечении гинекологических и урологических заболеваний широко используются лекарственные препараты местного действия. В связи с изложенным, нами были разработаны новые лекарственные формы азитромицина – суппозитории и гели, предназначенные для лечения инфекционных урогенитальных и кожных заболеваний.

Целью настоящего исследования явилось определение качества и стабильности суппозиториев и гелей азитромицина методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

При разработке методики хроматографии в тонком слое сорбента использовали субстанцию азитромицина, соответствующую требованиям фармакопейной статьи ГФ XII изд. (ФС 42-0213-07), органические растворители различной полярности квалификации «чда». Исследовали серийные образцы разработанных препаратов – 1% гель азитромицина на основе метилцеллюлозы и вагинальные суппозитории на основах бутирол и витепсол с дозировкой азитромицина 200 мг. Показатели качества всех вспомогательных веществ, используемых для получения опытных образцов, отвечали нормативным требованиям.

Хроматографические исследования проводили в стеклянной N-камере прямоугольного сечения по высоте, которую предварительно насыщали парами подвижной фазы в течение 30 мин при постоянной температуре. Хроматографировали восходящим способом на пластинах «Sorbfil» ПТСХ-П-В-УФ 100х100 мм для ВЭТСХ (ЗАО «Сорбполимер», РФ). Тип сорбента – силикагель с добавлением люминесцентного индикатора. Высота подъема фронта элюента – 80 мм.

На этапе пробоподготовки для извлечения азитромицина из лекарственных препаратов использовали метод двойной экстракции, которую проводили следующим образом: для суппозиториев – одну свечу массой 1,5 г тщательно измельчали, навеску измельченного суппозитория массой 0,3 г помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляли 15 мл воды очищенной и нагревали на водяной бане до полного расплавления, энергично взбалтывая в течение 5 мин, затем охлаждали до застывания основы и сливали жидкую часть в мерную колбу на 50 мл. Экстракцию проводили три раза, водные вытяжки объединяли, фильтровали и доводили объем водой очищенной до метки. Для гелей – навеску лекарственной формы массой 4 г помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, приливали около 40 мл воды очищенной с температурой 40°С, встряхивали в течение 5 мин до полного растворения геля и доводили объем водой очищенной до 50 мл.

Извлечение азитромицина из водной фазы в органическую для суппозиториев и гелей проводили по три раза, используя делительную воронку и расходуя каждый раз по 10 мл хлороформа, после чего вытяжки объединяли, фильтровали через бумажный фильтр

«синяя лента» или фильтр типа «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата, и упаривали до объема 10 мл (испытуемый раствор).

Параллельно путем последовательных разбавлений готовили растворы рабочего стандартного образца (РСО) азитромицина с концентрацией 0,1% (раствор А), 0,05% (раствор В), 0,02% (раствор С). В работе использовали только свежеприготовленные растворы. С учетом требований к пробоподготовке и растворимости анализируемого вещества в качестве растворителя был выбран хлороформ [4, 7].

На линию старта, расположенную на расстоянии 10 мм от нижнего края пластины, с помощью микрошприца наносили последовательно через 15 мм по 10 мкл испытуемого раствора азитромицина, извлеченного из лекарственных форм, растворов А, В и С, соответственно эквивалентным 10, 5 и 2 мкг РСО азитромицина. Пластину с нанесенными пробами высушивали и хроматографировали восходящим методом. Пятна на полученных хроматограммах открывали при просматривании в УФ свете при длине волны 254 нм, сравнивая при этом значения Rf исследуемых образцов и РСО. Пригодность хроматографической системы оценивали по следующим параметрам: на хроматограмме раствора С азитромицина отчетливо видно пятно.

Статистическую обработку результатов исследований проводили согласно ГФ XI изд. С использованием пакета компьютерных программ Microsoft Excel 2002 (номер продукта 54521-701-3227086-17559). Оценку значимости различий проводили по t-критерию Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$ [2].

Азитромицин растворим в неполярных и универсальных растворителях (хлороформ, ацетонитрил, спирт 96%), практически нерастворим в воде, т.е. обладает выраженными гидрофобными свойствами. Расчетное значение критерия гидрофобности Шатца H = 29 [4]. Для подбора оптимального состава подвижной фазы (ПФ) изучали хроматографическую подвижность субстанции азитромицина в индивидуальных и комбинированных растворителях различной полярности, а также в системах с различным содержанием кислотного и щелочного модификаторов (кислота уксусная и аммиака раствор концентрированный 25%). На линию старта хроматографической пластины с помощью микрошприца в одну точку наносили 10 мкл 0,5% раствора азитромицина (50 мкг). Элюирование проводили восходящим способом при наклонном положении хроматографических пластинок, располагая их под углом около 70° к горизонтали. Полученные хроматограммы высушивали в токе воздуха при комнатной температуре, проявляли в УФ свете и рассчитывали значения Rf. Результаты хроматографирования азитромицина в индивидуальных растворителях представлены в табл. 1.

Таблица 1

Подвижность азитромицина при хроматографировании в индивидуальных растворителях на пластинах «Sorbfil»

Группы растворителей по Снайдеру	Растворитель	Rf	Диэлектрическая проницаемость
I	гексан	0,03	1,88
II	пропанол-2	0,27	19,13
	этанол	0,37	24,55
IV	ледяная уксусная кислота	0,10	6,30
V	1,2-дихлорэтан	0,09	10,38
VI	этилацетат	0,06	6,02
	ацетон	0,36	20,54
	ацетонитрил	0,23	35,94
VIII	хлороформ	0,09	4,72

При исследовании хроматографической подвижности субстанции азитромицина в индивидуальных гидрофобных и гидрофильных органических растворителях на пластинах «Sorbfil» была выявлена следующая закономерность: с увеличением полярности элюента увеличивается хроматографическая подвижность азитромицина. Это может быть обусловлено более прочными связями между активными центрами силикагеля и адсорбционным слоем, образованным полярными растворителями, в сравнении с неполярными, вследствие чего происходит снижение способности молекул азитромицина вытеснять адсорбированные полярные молекулы ПФ с поверхности адсорбента.

Далее был подобран состав подвижной фазы путем смешивания растворителей из начала и конца элюотропного ряда в различных соотношениях. Полярность комбинированных элюентов оценивали по значению диэлектрической проницаемости и объемной доли индивидуальных растворителей, входящих в состав ПФ. При этом установлено, что оптимальная подвижность азитромицина наблюдается в бинарных системах хлороформ – ацетон (1:5) – Rf = 0,58 и хлороформ – этанол (1:1) – Rf = 0,51, для которых среднеприближенное значение диэлектрической проницаемости составило 17,9 и 14,6 соответственно.

В дальнейшем эксперименте было исследовано влияние щелочного (аммиака раствор концентрированный 25%) и кислотного (кислота уксусная) реагентов на изменение величины Rf азитромицина в указанных системах. При этом установлено, что в присутствии раствора аммиака происходит увеличение хроматографической подвижности азитромицина, а введение в состав ПФ кислоты уксусной ведет к ее уменьшению для обеих систем. Результаты хроматографирования в системах с различным содержанием кислотного и щелочного реагентов, как среднее пяти параллельных определений, представлены в табл. 2.

Таблица 2

Подвижность азитромицина при хроматографировании в комбинированных элюентах на пластинах «Sorbfil» в присутствии кислотного и щелочного модификаторов ($\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$, n = 5)

Система элюирования	Доля модификатора в ПФ					
	без добавления модификатора	аммиака раствор концентрированный 25%			кислота уксусная	
		0,25	0,5	1	0,25	0,5
	Rf					
Хлороформ – ацетон (1:5)	0,58±0,01	0,69±0,02	0,83±0,03	0,89±0,03	0,54±0,02	0,40±0,01
Хлороформ – этанол (1:1)	0,51±0,01	0,64±0,03	0,79±0,02	0,85±0,03	0,45±0,02	0,34±0,01

Азитромицин содержит два основных радикала и относится к слабым основаниям [1, 8]. Однако наличие в молекуле не только основных, но и кислотных центров обусловливает его способность к ионизации как в кислой, так и в щелочной среде. Положительное влияние щелочного модификатора может быть обусловлено одновременной диссоциацией гидроксильных групп сорбата и свободных ОН-групп силикагеля, что ведет к снижению удерживания азитромицина. С учетом параметров эффективности в качестве ПФ были выбраны системы хлороформ – ацетон – аммиак концентрированный (1:5:0,5) и хлороформ – этанол – аммиак концентрированный (1:1:0,5). Значения коэффициентов подвижности Rf субстанции азитромицина в указанных системах составили 0,83±0,02 и 0,79±0,02, соответственно. Чувствительность методики определения – 2 мкг азитромицина. Статистически обработанные результаты ТСХ-исследования в оптимальных системах растворителей приведены в табл. 3.

Таблица 3

Метрологические характеристики качественного анализа субстанции азитромицина с использованием метода тонкослойной хроматографии

Система растворителей	Rf	Метрологические характеристики			
		$\bar{x}$	S	S_x	$\Delta \bar{x}$
Хлороформ – ацетон – аммиак концентрированный (1:5:0,5)	0,83±0,02	0,83	0,0122	0,0055	0,0153
Хлороформ – этанол – аммиак концентрированный (1:1:0,5)	0,79±0,02	0,79	0,0150	0,0067	0,0186

На основании проведенных опытов обоснован выбор растворителей и условия элюирования для идентификации азитромицина методом ТСХ.

В задачи следующего этапа входило изучение возможности использования разработанной методики хроматографирования для анализа подлинности азитромицина в

суппозиториях и гелях и выбор оптимальных условий его проведения: кратность экстракции действующего вещества из лекарственной формы и состав экстрагентов, объем пробы и др. По результатам предварительных исследований была разработана методика получения извлечения из суппозиториев и гелей для ТСХ-анализа с использованием метода двойной экстракции.

При проведении качественного анализа азитромицина в суппозиториях и гелях по разработанной методике наблюдали соответствие значений Rf исследуемых образцов хроматографической подвижности РСО. Дополнительные пятна не обнаружены, следовательно, продукты взаимодействия между компонентами препаратов не образуются, азитромицин совместим с ингредиентами основ и не подвергается деструкции в процессе изготовления.

На хроматограммах, полученных при исследовании извлечений из суппозиториев и гелей плацебо, не содержащих активного ингредиента и изготовленных на тех же основах, что и опытные образцы лекарственных форм, неидентифицируемые пятна обнаружены не были, что свидетельствует о правильном выборе условий экстракции действующего вещества.

Важным критерием оценки качества лекарственных препаратов является их стабильность в процессе хранения. Изучение стабильности проводили методом естественного хранения, в условиях холодильника при температуре (4±1)°С. Для упаковки суппозиториев использовали контурно-ячейковую упаковку из поливинилхлорида и алюминиевой фольги, а для гелей – металлические тубы с лаковым покрытием.

Показатели качества, в том числе определение значения Rf азитромицина в оптимальных системах растворителей, оценивали в день приготовления и через промежутки времени, равные 6 мес хранения: по истечении 6, 12, 18 и 24 мес. Полученные результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты ТСХ-анализа лекарственных форм с азитромицином
($\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$, n = 5, p < 0,05)*

Срок хранения, мес.	Объекты исследования		
	суппозитории на основе витепсол	суппозитории на основе бутирол	гель на основе метилцеллюлозы
Значение Rf в системе элюирования хлороформ – ацетон – аммиак концентрированный (1:5:0,5)			
0** (контроль)	0,83±0,02	0,83±0,02	0,83±0,02
6	0,82±0,01	0,83±0,01	0,83±0,01
12	0,82±0,01	0,83±0,02	0,83±0,02
18	0,83±0,02	0,82±0,01	0,82±0,01
24	0,82±0,01	0,84±0,01	0,83±0,02
Значение Rf в системе элюирования хлороформ – этанол – аммиак концентрированный (1:1:0,5)			
0** (контроль)	0,79±0,02	0,79±0,02	0,79±0,02
6	0,79±0,01	0,79±0,02	0,79±0,02
12	0,78±0,01	0,79±0,01	0,80±0,01
18	0,78±0,02	0,78±0,01	0,78±0,01
24	0,80±0,01	0,79±0,01	0,78±0,01

Примечание: *- p – достоверность различий по отношению к контролю;
**- 0 – свежеприготовленные лекарственные формы.

Соответствие величины Rf исследуемых образцов и РСО азитромицина при отсутствии дополнительных пятен свидетельствовало о том, что качество исследуемых препаратов в процессе хранения не изменилось.

Таким образом, на основании проведенного исследования осуществлен выбор растворителей и условий элюирования для идентификации азитромицина методом ТСХ, а также предложена методика экстракции антибиотика из суппозиториев и гелей для проведения ТСХ-анализа. Разработанная ТСХ-методика использована для определения показателей качества суппозиториев и гелей с азитромицином, на основании которого подтверждена их стабильность и установлен срок хранения 2 года (срок наблюдения).

Литература

1. Государственная фармакопея РФ XII изд. – Ч. 1. – М : Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.
2. Государственная фармакопея СССР XI изд. – Вып. 1. – М.: Медицина, 1987. – 369 с.
3. Регистр лекарственных средств России : Энциклопедия лекарств [Электронный ресурс] / http://www.rlsnet.ru.
4. Спутник хроматографиста : методы жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков, И.А.Востров, С.В.Федоров и др. – Воронеж : Водолей, 2004. – 528 с.
5. Страчунский, Л.С. Макролиды в современной клинической практике /Л.С.Страчунский, С.Н.Козлов. – Смоленск : Русич, 1998. – 302 с.
6. Bignell, C. Azithromycin in the treatment of infection with Neisseria gonorrhoeae / C.Bignell, J. Garley // Sex Transm Infect. – 2010. – V. 86, № 6. – P. 422-426.
7. Sadek, P.S. Troubleshooting HPLC Systems : A Bench Manual / P.S. Sadek. – NY, USA : J.Wiley & Sons, 2000. – 306 p.
8. USP Pharmacists Pharmacopeia. – II ed. – Rockville. The United State Pharmacopeial. Lnc., 2008. – 1519 p.

THE DEVELOPMENT OF CHROMATOGRAPHYCAL METHODIC OF AZITHROMYCIN ANALYSIS AND ITS USE IN THE ASSESSMENT OF QUALITY AND STABILIZATION OF LOCAL ACTION MEDICINAL FORMS

T.A. BREDIKHINA [1]
T.A .PANKRUSHEVA [2]

[1] *Voronezh State Medical Academy*

[2] *Kursk State Medical University*

e-mail: bredichina-tat@yandex.ru

The method of azithromycin identification in substance and developed medicinal forms of local action (vaginal suppositories made on the basis of vitepsol and butirol; gel made on the basis of methylcellulose) with the help of thin-layer chromatography in sorbent is suggested. The most optimal systems of chromatography and the conditions of antibiotic extraction from the medicinal forms are determined. The TLS-method is used in the standardization and establishment of expiry dates for pull-dates for suppositories and gels with azithromycin.

Key words: azithromycin, suppositories, gels, thin-layer chromatography, quality analysis, stabilization.