



УДК 615.07.457.454.1 : 543.422.3

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ИЗУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОСТИ ГЛАЗНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ АЗИТРОМИЦИНА

Р. М. ГУСОВ**Е. Н. ВЕРГЕЙЧИК****Б. А. ГУСОВА**

*Пятигорский
медико-фармацевтический
институт, филиал
Волгоградского государственного
медицинского университета*

e-mail: 61312@mail.ru

В работе сообщается о результатах исследований возможности использования метода спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии для изучения стабильности разработанных глазных капель и геля азитромицина.

Ключевые слова: азитромицин, глазные капли, глазной гель, спектрофотометрия, тонкослойная хроматография.

Количественное определение азитромицина в лекарственных формах обычно проводится методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [0, 2]. Данный метод в настоящее время широко применяется для качественного и количественного анализа лекарственных средств [3]. Однако для экспресс – анализа, проведение которого необходимо при выполнении биофармацевтических исследований, требуется более доступный метод как с точки зрения наличия подготовки персонала, так и экономической точки зрения, поскольку метод ВЭЖХ, как правило, требует сложного дорогостоящего аппаратного обеспечения, а также наличие высокоочищенных реактивов.

Целью данной работы явилось определение возможности использования метода спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии (ТСХ) для изучения стабильности разработанных нами лекарственных форм азитромицина.

Материалы и методы. Метод спектрофотометрии. В работе использовался спектрофотометр СФ – 2000 (ОКБ «СПЕКТР»). Растворы для изучения спектральных характеристик азитромицина готовили следующим образом: навеску азитромицина, массой около 0,2500, помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл спирта этилового и перемешивали, затем доводили объем раствора до метки тем же растворителем (раствор А).

Для измерения спектральных кривых готовили растворы азитромицина следующим образом: в мерные колбы, вместимостью 25 мл, помещали по 5 мл раствора А и доводили объем каждого раствора до метки соответствующим растворителем: в первой колбе – спиртом этиловым 95%, во второй – хлороформом, в третьей – 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты, в четвертой – 0,1 М раствором натрия гидроксида. Далее проводили измерение оптической плотности полученных растворов в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовался соответствующий растворитель. Детектирование проводилось в УФ – области.

Метод тонкослойной хроматографии. В работе использовали хроматографические пластинки «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ». В качестве проявителя применяли реактив Драгендорфа. На хроматографические пластинки наносили растворенный в 95% спирте этиловом образец субстанции азитромицина, а также спиртовой раствор образца субстанции, подвергнутого термической деструкции, которую проводили путем нагревания в термостате при температуре $105 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 5 суток.

Для проведения анализа навеску азитромицина, массой около 0,1 г, растворяли в 10 мл этилового спирта (раствор А). Навеску субстанции, подвергнутой термической деструкции, массой около 0,1 г, растворяли в 10 мл этилового спирта (раствор Б). На линию старта хроматографической пластинки в виде полосы длиной 1 см поршневыми микрошприцем «Агат» наносили по 20 мкл растворов А и Б. Пластинки высушивали при комнатной температуре и хроматографировали восходящим методом в камере, насыщенной парами системы растворителей. Когда фронт растворителя проходил до линии финиша, пластинки вынимали и высушивали под тягой до полного удаления паров подвижной фазы. Затем хроматограмму проявляли реактивом Драгендорфа и рассчитывали значения R_f для проявляющихся пятен.

Результаты и их обсуждение. Возможность и границы использования метода спектрофотометрии в УФ – области определяются характером спектра поглощения и значением удельного показателя поглощения. В свою очередь эти характеристики зависят от ряда условий: значения pH среды и природы растворителя. Поэтому были изучены спектры поглощения азитромицина в различных растворителях и при различном значении pH.

Учитывая растворимость азитромицина, в качестве растворителей были выбраны хлороформ и этиловый спирт 95%. Для изучения влияния pH на характер спектра поглощения использовали 0,1М растворы хлористоводородной кислоты и натрия гидроксида. Исследуемые растворы готовили по выше описанной методике.

Полученные в результате эксперимента спектры поглощения представлены на следующем рисунке.

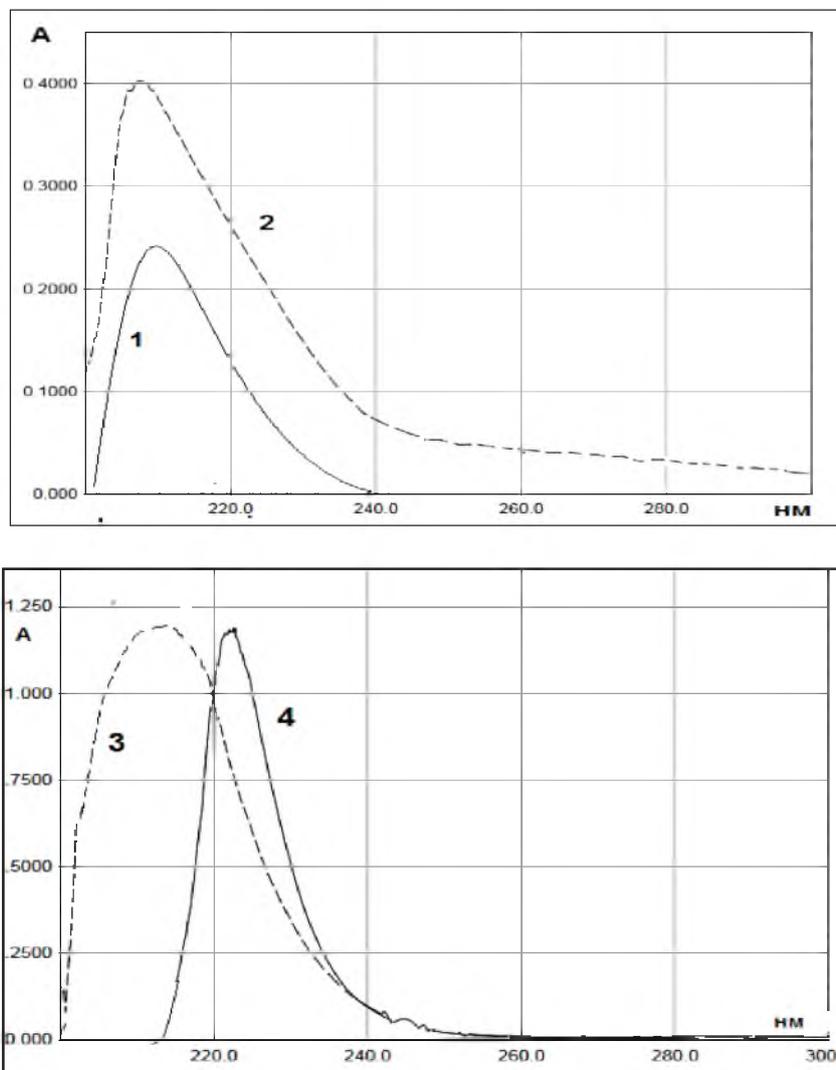


Рис. 1. Спектры поглощения азитромицина в различных растворителях:
 1 – в хлороформе; 2 – в растворе хлористоводородной кислоты 0,1 М,
 3 – в спирте этиловом 96%; 4 – в растворе натрия гидроксида 0,1 М

Из рисунка видно, что во всех изучаемых растворителях азитромицин характеризуется одним максимумом светопоглощения.

По результатам был рассчитан удельный показатель светопоглощения. Спектральные характеристики азитромицина в различных растворителях в обобщенном виде представлены в следующей таблице 1.

Таблица 1

Спектральные характеристики азитромицина в различных растворителях

Растворитель	λ max, нм	E 1% 1см
0,1 М раствор натрия гидроксида	222±2	2,52
0,1 М раствор хлористоводородной кислоты	207±2	5,69
Хлороформ	250±2	0,45
Спирт этиловый 96 %	210±2	8,18



По величине показателя поглощения возможно оценить пределы количественного определения азитромицина. Учитывая оптимальные значения оптической плотности (0,2-0,8) и значения удельных показателей поглощения, можно сделать вывод о том, что границы аналитической области определения азитромицина находятся в интервале концентраций от 0,01% до 0,4% или от 0,0001 г/мл до 0,0004 г/мл. Что касается использования хлороформа в качестве растворителя, нецелесообразность его использования является очевидной.

Кроме того, как видно из таблицы, максимумы поглощения азитромицина находятся в коротковолновой области, что является одной из причин, по которым использование этого метода может приводить к значительной погрешности, т.к. в этой области возможно наличие поглощения вспомогательных веществ, в том числе основы лекарственной формы. Из этого следует вывод о нецелесообразности использования метода непосредственной спектрофотометрии.

В связи с этим для количественного определения стабильности азитромицина была разработана методика, основанная на использовании метода экстракционной фотометрии, описание которой будет приведено в следующих публикациях.

Для более точного определения стабильности азитромицина в разработанных глазном геле и каплях был использован метод тонкослойной хроматографии. Исследование проводилось в соответствии с требованиями ОФС 42-0094-09. Для выбора условий хроматографирования нами были апробированы методики, описанные в литературе для идентификации азитромицина [4, 5, 6]. Пригодность методики определялась по возможности выявления пятен продуктов деструкции наряду с пятном азитромицина.

Для выбора оптимальной системы растворителей, позволяющей достоверно разделить азитромицин и продукты его деструкции, были проведены предварительные исследования. Методика хроматографического определения указана выше. В таблице 2 приведены результаты хроматографирования в различных системах растворителей.

Таблица 2

Результаты хроматографического разделения азитромицина и продуктов его деструкции

№	Состав системы растворителей	Величина Rf		
		Раствор А	Раствор Б	
		Основное пятно	Основное пятно	Дополнительные пятна
1	Гексан-этилацетат – диэтиламин (43:14:6)	0,46±0,02	0,46±0,02	–
2	Хлороформ – этиловый спирт – аммиак (18: 42: 0,6)	0,44±0,01	0,44±0,01	0,28±0,03 0,74±0,01
3	Хлороформ – этиловый спирт – диэтиламин (18: 42: 0,6)	0,44±0,05	0,44±0,05	0,09±0,02 0,29±0,05 0,34±0,01
4	Хлороформ – метиловый спирт – аммиак (57: 2,8: 0,6)	0,38±0,04	0,38±0,04	0,04±0,05 0,11±0,03 0,21±0,02
5	Хлороформ – метиловый спирт – (25:25)	0,27±0,03	0,27±0,03	–
6	Этилацетат – гексан – аммиак (46: 7: 7)	0,36±0,03	0,36±0,03	0,06±0,01 0,13±0,05

Из данных, приведенных в таблице, следует, что наиболее четкие пятна и разделяющую способность показала система №3, имеющая следующий состав: хлороформ – этиловый спирт – диэтиламин в соотношении 18:42:0,6. Данная система была выбрана для дальнейшего использования в работе. Схема хроматограммы, иллюстрирующая пятно азитромицина и пятна продуктов его деструкции, представлена на следующем рисунке.

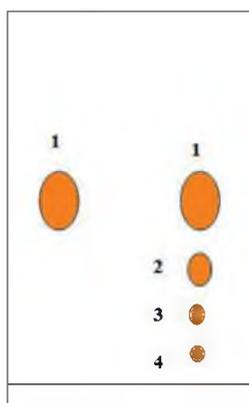


Рис. 2. Схема хроматограммы, иллюстрирующая разделение зон сорбции азитромицина и продуктов его деструкции; 1– пятна азитромицина, 2, 3, 4 – пятна продуктов деструкции

Из рисунка видно, что в образце, подверженном термической деструкции, наряду с пятном азитромицина наблюдаются три пятна продуктов его деструкции. Наиболее интенсивным является пятно со значением коэффициента R_f , равным 0,34. Это пятно может служить первым индикатором процесса разложения антибиотика.

Возможность обнаружения продуктов деструкции была нами изучена в различных количествах азитромицина. Для этого на пластинку наносили по 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30 мкл растворов А и Б. Пластинки хроматографировали в системе № 3 в соответствии с вышеописанными условиями. Данные, полученные в результате проведения эксперимента, представлены в следующей таблице 3.

Таблица 3

Результаты обнаружения продуктов деструкции в лекарственных формах азитромицина

Нанесено мкл	Величина R_f Раствор А	Величина R_f Раствор Б	
		Основное пятно	Дополнительное пятно
1	----	----	----
2	$0,49 \pm 0,03$	$0,49 \pm 0,03$	----
5	$0,50 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,05$
10	$0,51 \pm 0,05$	$0,51 \pm 0,05$	$0,34 \pm 0,03$
15	$0,49 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,02$	$0,32 \pm 0,01$
20	$0,50 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,03$
25	$0,51 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,02$
30	$0,52 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,05$

Из данных таблицы следует, что пятна продуктов деструкции азитромицина обнаруживаются при нанесении на пластинку 5 мкл раствора Б. Следовательно, для выявления пятен продуктов деструкции азитромицина на пластинку необходимо наносить количество хлороформного извлечения из лекарственной формы, равное 5 мкл.

Приведенные выше результаты позволили экспериментально обосновать выбор методики, дающей наилучшие результаты хроматографического разделения пятна азитромицина с пятнами продуктов его деструкции.

В результате проведенных исследований в качестве оптимальной была предложена следующая методика: хроматографическую камеру заполняли 60 мл системы растворителей хлороформ – этиловый спирт – диэтиламин (18:42:0,6) затем оставляли на 30 минут для насыщения камеры парами.

На линию старта хроматографической пластинки шприцем «Агат» с использованием термостатирующего устройства, поддерживающего температуру, равную 70°C , наносили 5 мкл хлороформного извлечения из лекарственной формы. Затем пластинку помещали в камеру и выдерживали в течение двух часов для прохождения фронта растворителя до линии финиша. Пластинку вынимали и высушивали под тягой. После чего опрыскивали реактивом Драгендорфа для проявления пятен.



Выводы. Проведенные исследования показали невозможность использования метода непосредственной спектрофотометрии для определения стабильности азитромицина. В связи с чем была предложена методика определения стабильности азитромицина в разработанных нами глазных каплях и геле методом тонкослойной хроматографии, обладающая достаточной чувствительностью для определения пятен продуктов деструкции азитромицина.

Литература

1. Development of a Simple RP-HPLC-UV Method for Determination of Azithromycin in Bulk and Pharmaceutical Dosage forms as an Alternative to the USP Method. / T.I. Ghari [et al.] // Iran J. Pharm Res. – 2013. – Vol. 6. – № 12. – P. 57-63.
2. Azithromycin / A. H. Bakheit [et al.] // Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol – 2014. – Vol. 39. – № 3. – P. 1-40.
3. Яшин, Я. И. Основные тенденции развития хроматографии после 110-летия со дня ее открытия М.С.Цветом / Е. С. Яшин, А. Я. Яшин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2014. – Т. 14.– № 2. – С. 203-213.
4. Establishment of a fast chemical identification system for screening of counterfeit drugs of macrolide antibiotics / W.B. Zou [et al.] // J. of Pharm. And Biomed. Analys. – 2006. – Vol. 40. – № 1. – P. 68-74.
5. TLC-densitometric determination of azithromycin in pharmaceutical preparations / A. K. Wiczen [et al.] // J. Planar. Chromatogr. – 2008. – Vol. 21. – № 3. – P. 177-181.
6. Salting-Out Thin-Layer Chromatography of Some Macrolide Antibiotics / T.B. Tosti [et al.] // J. Planar. Chromatogr. – 2005. – Vol. 21. – № 5. – P. 415-418.

SOME ASPECTS OF THE STUDY OF STABILITY EYE DOSAGE FORMS OF AZITHROMYCIN

R.M. GUSOV

E.N. VYARHEJCHYK

B.A. GUSOVA

*Pyiatigorsky Medical and
Pharmaceutical Institute, a branch
of the Ministry of Health Medical
University VolgGМУ*

e-mail: 61312@mail.ru

In this paper we report the results of investigations into the possibility of using the method of spectrophotometry and thin layer chromatography to study the stability of the developed eye drops and gel azithromycin.

Key words: azithromycin eye drops, ophthalmic gel, spectrophotometry, thin layer chromatography.