

Л. І. Кучеренко, О. В. Хромильова, З. Б. Моряк, Г. І. Ткаченко

Підбір оптимальних умов аналізу штучної суміші ізоніазиду та тіотріазоліну методом високоефективної рідинної хроматографії

Запорізький державний медичний університет,
НВО «Фарматрон»

Ключові слова: тіотріазолін, ізоніазид, суміш, хроматографія.

Сьогодні велику увагу приділяють новим фізико-хімічним методам досліджень лікарських засобів, зокрема високоефективній рідинній хроматографії. Під час дослідження розробили методику поєднаного визначення вмісту ізоніазиду та тіотріазоліну у штучній суміші цим методом, а саме підбір рухомої та нерухомої фази. Це складне завдання, оскільки компоненти мають різну кислотно-основну природу: тіотріазолін – кислотний характер, ізоніазид – доволі сильна основа. Отримані хроматограми відповідають усім вимогам нормативної документації і будуть використані для розробки методів стандартизації для таблеток ІТ.

Подбор оптимальных условий анализа искусственной смеси изониазида и тиотриазолина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Л. И. Кучеренко, О. В. Хромильова, З. Б. Моряк, Г. И. Ткаченко

Сегодня большое внимание уделяют новым физико-химическим методам исследований лекарственных средств, в частности высокоэффективной жидкостной хроматографии. В ходе исследования разработана методика совместного определения содержания изониазида и тиотриазолина в искусственной смеси этим методом, а именно подбор подвижной и неподвижной фазы. Это непростая задача, поскольку компоненты имеют разную кислотно-основную природу: тиотриазолин – кислотный характер, изониазид – достаточно сильное основание. Полученные хроматограммы отвечают всем требованиям нормативной документации и будут использованы для разработки методов стандартизации для таблеток ИТ.

Ключевые слова: тиотриазолин, изониазид, смесь, хроматография.

Запорожский медицинский журнал. – 2014. – №2 (83). – С. 118–120

Choice of optimal conditions of Isoniazid and Thiotriazolin artificial mixture analysis by high-performance liquid chromatography method

L. I. Kucherenko, O. V. Khromylyova, Z. B. Moryak, H. I. Tkachenko

At present a great attention is paid to the novel physicochemical methods of drugs analysis, notably high-performance liquid chromatography. Our investigation resulted in the development of simultaneous detection of Isoniazid and Thiotriazolin content in artificial mixture by high-performance liquid chromatography method, notably choice of mobile and immobile phase. It is not easy because both components have different acid-base nature: Thiotriazolin has acid character and Isoniazid is rather strong base. Besides, during our research we chose optimal conditions of analysis: column, eluent, rate of mobile phase, analytical wavelength of detector and volume of input probe. Received chromatograms satisfy all requirements of standards and will be used for the development of standardization methods for «IT» tablets.

Key words: Thiotriazolin, Isoniazid, mixture, chromatography.

Zaporozhye medical journal 2014; №2 (83): 118–120

Щорічно у світі на туберкульоз хворіють 10 млн осіб, 3 млн помирають, із них 8 тис. хворих помирають щодня. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, у 1/3 населення Землі туберкульозна паличка вже знаходиться в організмі [9,10]. В Україні епідемія туберкульозу зареєстрована з 1995 р. [7], і вона прогресує, набуває широкі масштаби. За статистикою, у країні щодня реєструють 82 нових хворих на туберкульоз, 30 із них помирають [7]. Лікування туберкульозу є складним завданням, що потребує тривалого і комплексного підходу [4].

У зв'язку з високою токсичністю протитуберкульозних препаратів для зниження токсичності та зменшення побічних реакцій різних груп препаратів активно застосовують антиоксиданти. Результати багатьох експериментальних і клінічних досліджень показали: препарат тіотріазолін (морфоліній-3-метил-1,2,4-триазолін-5-тіоацетат) має високу антиоксидантну і мембраностабілізуючу активність [3]. У результаті досліджень встановили ефективність створення

комбінованого лікарського препарату, який містить ізоніазид (препарат І ряду для лікування туберкульозу) і тіотріазолін (антиоксидант).

Мета роботи

Розробка методики спільного визначення вмісту ізоніазиду та тіотріазоліну у штучній суміші методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [1,2,5,6,8], зокрема підбір рухомої і нерухомої фази.

Це складне завдання, оскільки компоненти мають різну кислотно-основну природу: тіотріазолін – кислотний характер, ізоніазид – доволі сильна основа.

Матеріали і методи дослідження

Для нового комбінованого лікарського засобу, що містить ізоніазид і тіотріазолін, необхідно розробити оптимальні методи стандартизації. Для цього ми виготовили штучну суміш, яка містить ізоніазид і тіотріазолін у співвідношенні 4:1. Вивчили можливість поєднаного визначення діючих речовин у різних рухомих і нерухомих фазах.

Результати та їх обговорення

Дослідження виконали на модельній суміші ізоніазиду та тіотріазоліну у співвідношенні 4:1, котра близька за складом до суміші з оптимальним терапевтичним ефектом. За основу взяли відому методику аналізу тіотріазоліну на зворотній фазі з використанням кислого фосфатного буфера (РНЗ) при довжині хвилі 220 нм. У цих умовах тіотріазолін існує у вигляді вільної кислоти (час утримання – майже 8 хв) (рис. 1), а ізоніазид – у вигляді солі і виходить майже у мертвого об'єму колонки, що не дозволяє коректно виконувати його кількісний аналіз (рис. 2).

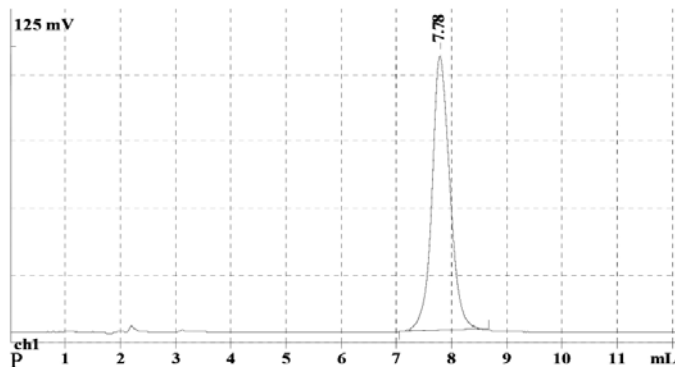


Рис. 1. 0,4 мг/мл тіотріазоліну у воді. Елюент: 10% метанолу – 90% фосфатного буфера. Фаза – С18.

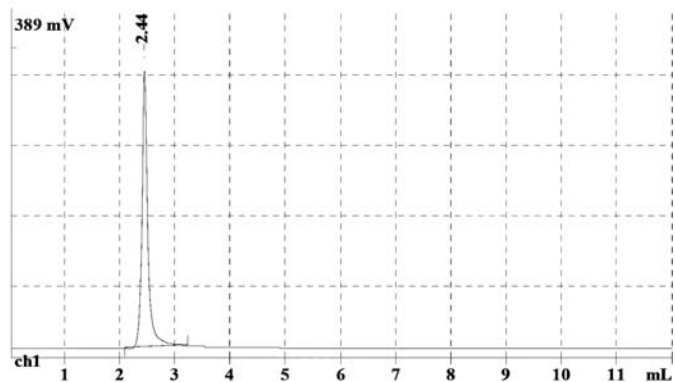


Рис. 2. 0,4 мг/мл ізоніазиду у воді. Елюент: 10% метанолу – 90% фосфатного буфера. Фаза – С18.

Надалі пошук умов здійснення аналізу виконали при варіюванні рН і заміні фосфатного сольового буфера на органічні кислоти (оцтову і мурашину) і буферні суміші на їхній основі. Однак буфери на основі органічних кислот мають занадто високе індивідуальне поглинання при довжині хвилі 220 нм, що знижує чутливість аналізу і не відповідає нашим вимогам (рис. 3).

Далі як рухому фазу використовували 0,1% водний розчин кислоти мурашиної, що дало можливість (у порівнянні з фосфатним буфером) незначно подовжити час утримання ізоніазиду і дуже сильно – тіотріазоліну, при цьому значно подовжується час аналізу. При подальшому збільшенні рН (із використанням елюентів на базі форміатного буфера) подовжується час утримання ізоніазиду і зменшується час утримання тіотріазоліну, але при цьому значно погіршується форма піків за рахунок співіснування протонованих і вільних форм аналітів (рис. 4).

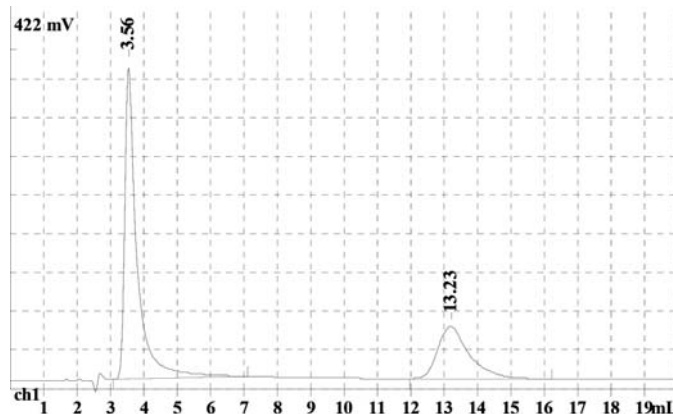


Рис. 3. 0,4 мг/мл тіотріазоліну і 0,4 мг/мл ізоніазиду в воді. Елюент: 5% метанолу – 95% 0,1% розчину НСООН. Фаза – С18.

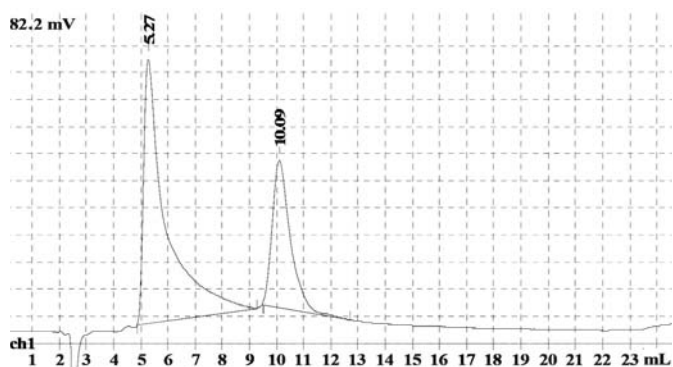


Рис. 4. 0,4 мг/мл тіотріазоліну і 0,4 мг/мл ізоніазиду в елюенті. Елюент: 10% метанолу – 90% форміатного буфера (рН~3.4). Фаза – С18.

Необхідне для поєднаного визначення ізоніазиду та тіотріазоліну збільшення часу утримання ізоніазиду можна досягти при додаванні іон-парного реагенту (наприклад, додецилсульфоната натрію) в елюент, що містить 10% метанолу і 90% фосфатного буфера. На жаль, використання цього елюента необоротно модифікує зворотню фазу і робить її непридатною для роботи з іншими елюентами, тому такий аналіз потребує виділення окремої колонки, а отже пов'язаний з певним витратами і є економічно не вигідним.

Альтернативним варіантом є використання полярної ціанованої нерухомої фази і кислих буферних розчинів. У цих умовах для водних розчинів мурашиної або оцтової кислот при достатньо низьких рН (<3,5) спостерігають поліпшення форми піків, зменшення їхньої ширини. У порівнянні з попередніми аналізами незначно збільшується час утримання ізоніазиду (але досить для відділення від піка інжекції на мертвому об'ємі) й істотно зменшується час утримання тіотріазоліну, що значно скорочує загальний час аналізу (рис. 5).

Отже, вважаємо перспективним для поєднаного визначення ізоніазиду та тіотріазоліну використання ціанованої нерухомої і кислотої (рН<3) рухомої фази. Для подальшого збільшення чутливості аналізу (головним чином, для збільшення часу виходу ізоніазиду) доцільно вивчити можливість використання трифторотцтової кислоти як рН регулятора.

Надалі зменшували рН<3 шляхом додавання кислоти трифторотцтової, що призвело до задовільного розділення

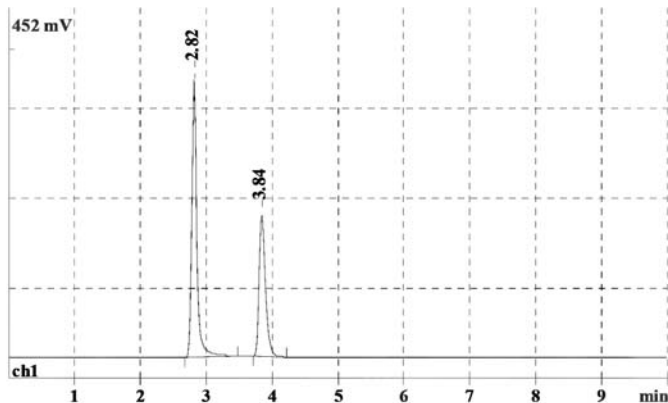


Рис. 5. 0,4 мг/мл тіотріазоліну і 0,4 мг/мл ізоніазиду в елюенті. Елюент: 1% розчин АсОН у воді. CN-фаза.

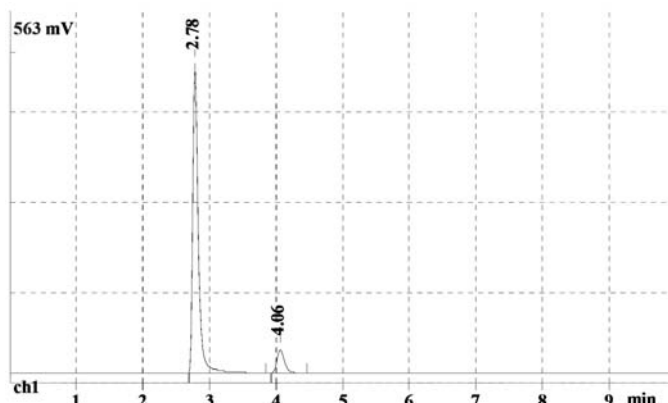


Рис. 6. 0,02 мг/мл тіотріазоліну і 0,08 мг/мл ізоніазиду в елюенті. Елюент: 0,05% розчин CF_3COOH у воді. CN-фаза, 220 нм.

ізоніазиду і тіотріазоліну та одночасного зменшення півширини піків у порівнянні з рухливими фазами з вищим рН.

Після цього дібрали оптимальні умови виконання аналізу: колонка, елюент, швидкість рухомої фази й аналітична довжина хвилі детектора, об'єм введеної проби.

Умови здійснення аналізу:

- Колонка: ProntoSil 120-5-CN, 250 × 4,0 mm, діаметр часток – 5 мкм;

- Елюент: 0,05% розчин трифтороцтової кислоти у воді;

- Швидкість рухомої фази – 1 мл/хв.;

- Аналітична довжина хвилі детектора – 220 нм;

- Об'єм проби – 20 мкл.

Зразок хроматограми наведено на рис. 6.

Висновки

Під час досліджень із розробки методики аналізу ізоніазиду та тіотріазоліну в суміші методом ВЕРХ вирішили складне завдання із добору рухомої і нерухомої фази для діючих речовин, котрі мають різну кислотно-основну природу: тіотріазолін – кислотний характер, ізоніазид – доволі сильна основа.

Крім того, визначили оптимальні умови для здійснення аналізу: колонка, елюент, швидкість рухомої фази та аналітична довжина хвилі детектора, об'єм введеної проби. Отримані хроматограми відповідають усім вимогам нормативної документації.

Список літератури

1. Георгиевский Г.В. Разработка комплекса физико-химических методик, обеспечивающих создание и контроль качества оригинальных отечественных препаратов, производных 1,2,4 – триазола / Г.В. Георгиевский // Запорожский медицинский журнал. – 2011. – Т. 13. – № 1. – С. 58–69.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.
3. Мазур И.А. Тиотриазолин / И.А. Мазур, Н.А. Волошин, И.С. Чекман. – Запорожье : Львов : Наутилус, 2005. – 156 с.
4. Норейко Б.В. Химиотерапия туберкулеза / Б.В. Норейко // Новости медицины и фармации. – 2008. – № 19. – С. 261.
5. Сапрыкин Л.В. Практика и методические основы высокоэффективной жидкостной хроматографии : учебное пособие / Л.В. Сапрыкин. – Краснодар, 2006. – 151 с.
6. Шатц В.Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография / В.Д. Шатц. – Рига : Зинатне, 1988 – 390 с.
7. Фещенко Ю.И. Ситуация с туберкулезом в Украине / Ю.И. Фещенко // Доктор. – 2002. – № 4. – С. 11–14.
8. Adamovics J.A. Chromatographic analysis of pharmaceuticals / J.A. Adamovics. – New York : Marsel Dekker, 1997.
9. Global tuberculosis control: WHO Report 2002. – Geneva, 2002. – 295 p.
10. Tuberculosis recurrences. Reinfection plays a role in a population whose clinical/epidemiological characteristics do not favor reinfection / D.G. deViedma, M. Marin, S. Hernangomez [et al.] // Arch. Intern. Med. – 2002. – Vol. 162. – № 16. – P. 1873–1879.

Відомості про авторів:

Кучеренко Л.І., д. фарм. н., доцент, зав. каф. фармацевтичної хімії, Запорізький державний медичний університет, E-mail: farm_chem@bigmir.net.

Хромильова О.В., асистент каф. фармацевтичної хімії, Запорізький державний медичний університет.

Моряк З.Б., к. фарм. н., доцент, каф. фармацевтичної хімії, Запорізький державний медичний університет.

Ткаченко Г.І., к. фарм. н., старший викладач каф. фармацевтичної хімії, Запорізький державний медичний університет.

References

1. Heorhievs'kii, G.V. (2011) Razrabotka kompleksa fiziko-himicheskikh metodik, obespechivayushhikh sozdanie i kontrol' kachestva original'nykh otechestvennykh preparatov, proizvodnykh 1,2,4 – triazola [The development of the complex of physicochemical techniques providing creation and quality control of original domestic drugs, derivatives of 1,2,4-triazole]. *Zaporozhskii meditsynskii zhurnal*, 13(1), 58–69 [in Ukrainian].
2. (2001, 2004) Derzhavna Farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopeia of Ukraine]. Kharkov : RIREH. [in Ukrainian].
3. Mazur, I. A., Voloshyn, N. A. & Chekman, I. S (2005) *Tiotriazolin [Thiotriazolin]*. Zaporozh'ye, Lvov: Nautilus. [in Ukrainian].
4. Norejko, B. V. (2008) Khimioterapiya tuberkuloza [Chemotherapy of tuberculosis] *Novosti meditsyny i farmatsii*, 19, 261. [in Ukrainian].
5. Saprykin, L.V. (2006) *Praktika i metodicheskie osnovy vysokoe'fektivnoj zhidkostnoj khromatografii [Practice and methodological grounds of high-performance liquid chromatography]*. Krasnodar. [in Russian].
6. Shate, V.D. (1988) *Vysokoe'fektivnaya zhidkostnaya khromatografiya [High-performance liquid chromatography]*. Riga: Zinatne. [in Latvian].
7. Feshhenko, Yu. I. (2002) Situacia s tuberkulozom v Ukraine [Tuberculosis situation in Ukraine.] *Doktor*, 4, 11–14. [in Ukrainian].
8. Adamovics, J. (1997). *Chromatographic analysis of pharmaceuticals* (2.ed. ed.). New York, N.Y.: Dekker.
9. (2002) *Global tuberculosis control: WHO Report 2002*. Geneva.
10. Viedma, D. G. (2002). Tuberculosis Recurrences: Reinfection Plays a Role in a Population Whose Clinical/Epidemiological Characteristics Do Not Favor Reinfection. *Archives of Internal Medicine*, 162(16), 1873-1879.

Поступила в редакцию 25.02.2014 г.