

УДК 543.544

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ТАБЛЕТОК И СИРОПА «КОДЕЛАК БРОНХО» МЕТОДАМИ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Г.Б. Голубицкий*, В.М. Иванов

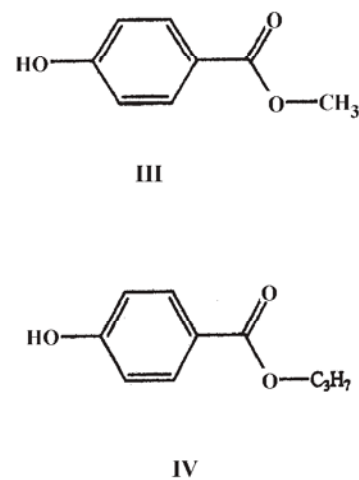
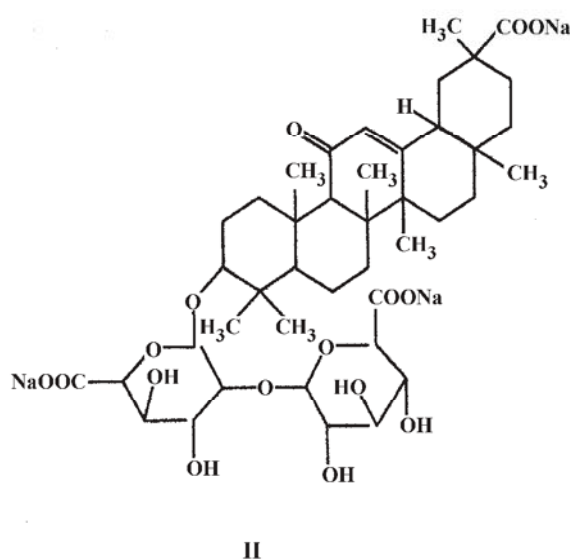
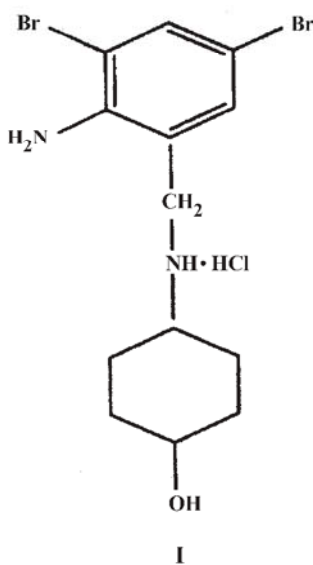
(кафедра аналитической химии; e-mail: sandro@analyt.chem.msu.ru)

Предложена методика количественного анализа нового оригинального лекарственного препарата – таблеток и сиропа «Коделак бронхо» методами высокоэффективной жидкостной хроматографии. Действующие вещества таблеток разделяются в течение шести минут при эффективном разрешении пиков всех компонентов. Проведен анализ опытно-экспериментальных образцов таблеток. Полученные результаты соответствуют требованиям нормативно-технической документации и технологическим нагрузкам. Для сиропа предложены два варианта анализа – в изократическом и градиентном режимах. Показано, что они практически равноценны по продолжительности и точности. При исследовании модельных растворов, содержащих все действующие и все вспомогательные вещества препарата, подтверждена достоверность получаемых результатов. Изократический вариант методики технически проще, поэтому он предложен для включения в проект фармакопейной статьи предприятия.

«Коделак бронхо» – многокомпонентный препарат от кашля в форме таблеток и сиропа, содержащий лекарственные вещества синтетического и растительного происхождения (схема). Основные действующие вещества препарата – гидрохлорид амброксола (I) и тринатриевая соль глицирризиновой кислоты (II). Кроме этого, таблетки содержат сухой экстракт термопсиса и ряд вспомогательных веществ и наполните-

ли. В качестве консервантов в сироп вводят нипагин (III) и нипазол (IV).

Параллельно с разработкой технологии получения таблеток и сиропа разрабатывали методики количественного определения. Поскольку препарат имеет достаточно сложный состав, трудно разработать методику для количественного определения всех его компонентов. Была поставлена реальная задача –



*ОАО «Фармстандарт-Лексредства».

разработать методику одновременного определения двух основных действующих компонентов (I, II) в таблетках и в сиропе, а также двух консервантов (III, IV) в сиропе.

Экспериментальная часть

Реагенты. Для приготовления подвижных фаз (ПФ), а также для растворения стандартных и испытуемых препаратов использовали ацетонитрил для градиентной хроматографии (“Sigma”, США) и сверхчистую воду с удельным сопротивлением 18,2 МОм/см, полученную на установке “Direct Q” (“Millipore”). В качестве стандартов определяемых лекарственных веществ использовали проверенные отделом контроля качества предприятия фармацевтические субстанции, соответствующие всем требованиям нормативной документации. Все остальные использованные реактивы имели квалификацию не ниже “ч.д.а.”

Аппаратура. Хроматографический анализ проводили на хроматографе “Waters Alliance 2695” с диодно-матричным детектором “Waters 2996”. Величина “мертвого” объема хроматографа составляет по паспорту менее 0,650 мл. Использовали колонку размером 150×4,6 мм и защитную предколонку размером 12,5×4,6 мм, заполненные обращенно-фазовым сорбентом “Zorbax SB C8” с размером частиц 3,5 мкм (“Agilent Technologies”, США), и термостатировали их при 40°C.

Для контроля pH элюентов использовали pH-метр-милливольтметр “pH-673M” со стеклянным индикаторным электродом и хлоридсеребряным электродом сравнения.

Приготовление растворов. Для проведения анализа тщательно растертые анализируемые таблетки (точная навеска ~0,275 г) помещали в мерную колбу емкостью 100 мл, добавляли 40 мл смеси $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (1:4 по объему), перемешивали 3 мин, доводили до метки этой же смесью растворителей и перемешивали. Для приготовления раствора стандартных образцов (PCO) около 0,100 г амброксола г/х и около 0,300 г тринатриевой соли глицирризиновой кислоты (точные навески) помещали в мерную колбу емкостью 100 мл, добавляли 40 мл той же смеси $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$, перемешивали до растворения веществ, доводили до метки этой же смесью растворителей и перемешивали (раствор А). Затем 5,0 мл раствора А помещали в мерную колбу емкостью 100 мл, доводили до метки той же смесью $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ и перемешивали. Модельные растворы для подтверждения до-

стоверности получаемых результатов готовили аналогично раствору PCO, но при разбавлении в мерные колбы добавляли от 4,0 до 6,0 мл раствора А и соответствующее количество плацебо – смеси всех компонентов препарата за исключением определяемых веществ.

Для проведения анализа 5,0 мл анализируемого сиропа помещали в мерную колбу емкостью 100 мл, добавляли 40 мл смеси $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (3:7 по объему), перемешивали в течение 3 мин, доводили до метки этой же смесью растворителей и перемешивали. Для приготовления PCO в мерную колбу емкостью 100 мл помещали ~0,100 г гидрохлорида амброксола, ~0,300 г тринатриевой соли глицирризиновой кислоты, ~0,038 г нипагина и ~0,013 г нипазола (точные навески), добавляли 40 мл той же смеси $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$, перемешивали до растворения веществ, доводили до метки этой же смесью растворителей и перемешивали (раствор А). Затем 10,0 мл раствора А помещали в мерную колбу емкостью 100 мл, доводили до метки той же смесью $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ и перемешивали. Для подтверждения достоверности получаемых результатов модельные растворы готовили аналогично раствору PCO, но при разбавлении в мерные колбы добавляли от 8,0 до 12,0 мл раствора А и соответствующее количество плацебо.

Все растворы для анализа таблеток и сиропа фильтровали через гидрофильный мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (предпочтительны фторопластовые фильтры, устойчивые в водно-ацетонитрильных растворах).

Проведение анализа. Хроматографировали испытуемый раствор таблеток и раствор PCO. В качестве ПФ использовали смесь (в соотношении 2:3) $\text{CH}_3\text{CN}-0,025 \text{ M KН}_2\text{PО}_4$ (pH 2,5) с расходом 1,0 мл/мин. Объем инжектируемых проб составил 20,0 мкл, детектирование проводили при 250 нм.

При анализе сиропа хроматографировали испытуемый раствор и раствор PCO. При анализе в изократическом режиме в качестве ПФ использовали смесь (в соотношении 3:7) $\text{CH}_3\text{CN}-0,025 \text{ M KН}_2\text{PО}_4$ (pH 2,5) с расходом 1,0 мл/мин. При использовании градиентного режима состав ПФ изменяли в соответствии с программой, представленной в табл. 1. Объем инжектируемых проб составил 20,0 мкл, детектирование проводили при 254 нм.

Расчет результатов. При анализе таблеток рассчитывали площади пиков определяемых компонентов и находили количество каждого компонента в анализируемых таблетках по формуле:

Таблица 1

Программа изменения состава ПФ при использовании градиентного режима

Время, мин	Состав ПФ, об. %	
	CH ₃ CN : 0,025 M KH ₂ PO ₄ (pH 2,5) = 3 : 2	0,025 M KH ₂ PO ₄ (pH 2,5)
0	30	70
16	90	10
17	90	10
18	30	70
21	30	70

$$X = (S_{и} \times m_{ст} \times m_c) / (S_{ст} \times m_{и}),$$

где $S_{и}$ и $S_{ст}$ – средние значения площадей пиков определяемых компонентов на хроматограммах испытуемого раствора и РСО соответственно; $m_{ст}$, m_c и $m_{и}$ – соответственно массы стандарта определяемого вещества в растворе РСО, средняя масса таблетки и масса навески растертых таблеток, взятой для приготовления испытуемого раствора (г).

При анализе сиропа рассчитывали площади пиков определяемых компонентов и находили количество каждого компонента (г) в одной дозе анализируемого сиропа (5 мл) по формуле:

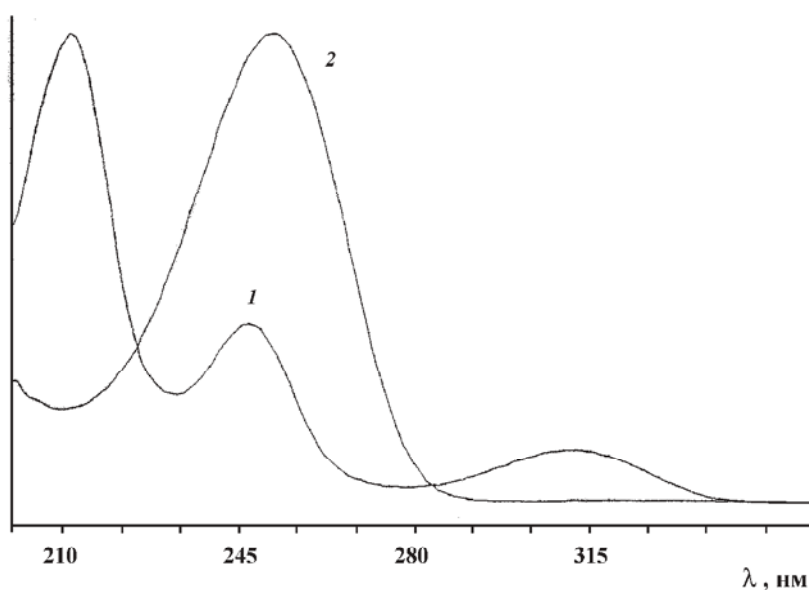
$$X = (S_{и} \times m_{ст}) / S_{ст},$$

где $S_{и}$ и $S_{ст}$ – средние значения площадей пиков определяемых компонентов на хроматограммах растворов испытуемого и РСО соответственно; $m_{ст}$ – масса стандарта определяемого вещества в растворе РСО (г).

Результаты и их обсуждение

Оптимальные условия анализа таблеток. На рисунке представлены спектры поглощения определяемых компонентов, полученные в режиме *on line* с помощью диодно-матричного детектора. По этим данным длину волны детектирования установили близкой к максимуму поглощения II и одному из максимумов поглощения I, равной 250 нм.

Для определения оптимальных условий разделения компонентов испытуемого раствора проводили экспресс-оптимизацию. Экспресс-оптимизация подразумевает исследование части факторов, влияющих на хроматографические параметры веществ [1]. Значения других факторов устанавливали, исходя из определяющих физико-химических свойств компонентов. Было установлено, что для получения оптимального удерживания глицирризиновой кислоты и удовлетворительной для целей количественного анализа формы ее пика необходимо устанавливать pH ПФ < 3 (вещество в молекулярной форме). При этом молекула амброксола переходит в протонированное состояние, ее удерживание снижается, но форма пика остается приемлемой. В то же время при этих условиях удается получить удовлетворительное разделение пиков определяемых и других компонентов.



Нормализованные спектры поглощения амброксола (1) и тринатриевой соли глицирризиновой кислоты (2)

Таблица 2

Влияние содержания CH_3CN на характеристики удерживания

$c(\text{CH}_3\text{CN})$, об. %	30	35	40	50
$t_{\text{глиц}}$, МИН	21,567	7,319	3,747	2,212
$t_{\text{амбр}}$, МИН	2,854	2,304	2,022	1,772
t_0 , МИН	1,347	–	–	–
$\ln k_{\text{глиц}}$	3,006672	1,787082	0,875469	–0,14503
$\ln k_{\text{амбр}}$	0,410121	–0,04395	–0,39304	–0,85567

Для определения необходимой концентрации в ПФ органического модификатора концентрацию CH_3CN изменяли от 30 до 50 об.%. Для определения времени выхода неударживаемого вещества получали хроматограммы воды. Полученные результаты представлены в табл. 2, где показано, что оптимальное разделение и минимальную продолжительность анализа обеспечивает концентрация CH_3CN 40 об.%. Время удерживания амброзола и глицирризината 2,022 и 3,747 мин соответственно.

Оптимальные условия анализа сиропа. Детектирование проводили при 254 нм. Ранее нами была разработана методика анализа многокомпонентного лекарственного препарата – сиропа “Коделак-фито” [2]. Этот препарат в качестве действующего вещества содержит фосфат кодеина. Для эффективного разделения пиков кодеина и пиков компонентов растительного происхождения нами было использовано свойство кодеина необратимо удерживаться некоторыми обращенно-фазовыми сорбентами при отсутствии соли в ПФ. Градиентное элюирование проводили с использованием смесей ацетонитрил–вода и ацетонитрил–фосфатный буферный раствор, причем второй состав ПФ вводили после элюирования всех ком-

понентов, кроме кодеина. В связи с отсутствием фосфата кодеина в составе сиропа “Коделак бронхо” и сравнительно меньшим содержанием растительных веществ было принято решение применить более простой вариант элюирования с введением фосфатного буферного раствора в самом начале анализа. При использовании исходного 0,025 М KH_2PO_4 (рН 4,7) был получен неудовлетворительный результат – неприемлемая для целей количественного анализа форма пика глицирризиновой кислоты. По-видимому, это связано с тем, что данный компонент содержится в ПФ с определенным рН, и для получения симметричного пика необходимо его перевод в молекулярную форму. После доведения кислотности фосфатного буферного раствора прибавлением H_3PO_4 до рН 2,5 это предположение было подтверждено: была получена удовлетворительная форма всех пиков, свидетельствующая об эффективном разделении. Поскольку при разделении компонентов в градиентном режиме изменение концентрации органического модификатора ПФ составило всего 36 об.%, было сделано предположение о возможности разделения и в изократическом режиме. Использование в качестве ПФ смеси CH_3CN -0,025 М KH_2PO_4 состава 3:7 (рН 2,5) позво-

Таблица 3

Метрологические характеристики методики определения гидрохлорида амброксола и тринатриевой соли глицирризиновой кислоты в таблетках “Коделак бронхо”

Компонент	$s_{\text{макс}}$, Г	$s_{\text{макс}}^2$	$\varepsilon_{\text{макс}}$, %	$\varepsilon_{\text{г ср}}$, %	$\Delta \varepsilon_{\text{г}}$, %	$\varepsilon_{\text{г макс}}$, %
Амброксола г/х	0,00007	$5,39 \times 10^{-9}$	3,15	–0,073	0,137	–1,05
Тринатриевая соль глицирризиновой кислоты	0,00018	$3,14 \times 10^{-8}$	5,08	–0,028	0,168	1,69

лило получить удовлетворительный результат разделения. Изократический вариант не имеет преимуществ по продолжительности анализа, но технически более прост, а поэтому и более предпочтителен.

Анализ модельных смесей. Было приготовлено 17 растворов, в которых содержание определяемых веществ составляло $\pm 20\%$ от значений, заявленных по рецептуре. Полученные растворы анализировали по методике, описанной в разделе "Проведение анализа", и рассчитывали результаты по методу «введено-найденно» с помощью электронных таблиц Excel. Результаты, полученные для таблеток и сиропа, представлены в табл. 3, 4. Сравнение величин средних относительных погрешностей определения компонентов ($e_{г\text{cp}}$) с соответствующими доверительными интервалами

Δe_r показывает, что систематическая погрешность отсутствует ($e_{г\text{cp}} < \Delta e_r$). Площади пиков определяемых веществ линейно зависят от их концентраций в указанном интервале (коэффициент корреляции $K_{\text{кор}} > 0,99$).

Анализ образцов. По предлагаемой методике проанализированы опытные образцы таблеток препарата (табл. 5). Результаты соответствуют требованиям нормативно-технической документации и технологическим нагрузкам. По предлагаемой методике с использованием изократического и градиентного вариантов проанализированы опытные образцы препарата в виде сиропа. Полученные результаты для изократического варианта представлены в табл. 6. Результаты градиентного варианта практически идентичны.

Таблица 4

Метрологические характеристики методики определения гидрохлорида амброксола, тринатриевой соли глицирризиновой кислоты, нипагина и нипазола в сиропе "Коделак бронхо"

Компонент	$S_{\text{макс}}$, Г	$S^2_{\text{макс}}$	$\varepsilon_{\text{макс}}$, %	$e_{г\text{cp}}$, %	Δe_r , %	$e_{г\text{макс}}$, %
Амброксола г/х	0,00011	$1,15 \times 10^{-8}$	5,76	-0,032	0,213	-1,53
Тринатриевая соль глицирризиновой кислоты	0,00022	$4,92 \times 10^{-8}$	3,04	-0,034	0,152	-1,48
Нипагин	0,00002	$5,96 \times 10^{-10}$	2,61	-0,005	0,142	1,75
Нипазол	0,00002	$3,70 \times 10^{-10}$	4,97	0,062	0,248	2,88

Таблица 5

Результаты анализа таблеток "Коделак бронхо" (3 опытно-экспериментальных образца)

Компонент	Норма по НД, г	Содержание в одной таблетке, г ($n = 9; P = 0,95$)				
		X_{cp}	S	SX_{cp}	Δx_{cp}	% , ε
Амброксола г/х	0,0185–0,0215	0,0196	0,0011	0,00037	0,0009	4,43
		0,0204	0,0009	0,00030	0,0007	3,49
		0,0201	0,0007	0,00023	0,0006	2,75
Тринатриевая соль глицирризиновой кислоты	0,0277–0,0323	0,0299	0,0013	0,00043	0,0010	3,43
		0,0287	0,0009	0,00030	0,0007	2,48
		0,0308	0,0011	0,00037	0,0009	2,82

Таблица 6

Результаты анализа сиропа “Коделак бронхо” (3 опытно-экспериментальных образца). Нормализованные спектры поглощения амброксола (1) и тринатриевой соли глицирризиновой кислоты (2)

Компонент	Содержание по нормативной документации, г	Содержание в 5 мл, г ($n = 9; P = 0,95$)				
		X_{cp}	S	SX_{cp}	Δx_{cp}	%, ε
Амброксола г/х	0,009–0,011	0,00975	0,00034	0,00011	0,00027	2,74
		0,00988	0,00028	0,00009	0,00022	2,23
		0,01012	0,00036	0,00012	0,00028	2,80
Тринатриевая соль глицирризиновой кислоты	0,0277–0,0323	0,03211	0,00122	0,00041	0,00096	2,99
		0,03020	0,00112	0,00037	0,00088	2,92
		0,02890	0,00098	0,00033	0,00077	2,67
Нипагин	0,0034–0,0041	0,00364	0,00012	0,00004	0,00009	2,59
		0,00354	0,00008	0,00003	0,00006	1,78
		0,00388	0,00014	0,00005	0,00011	2,84
Нипазол	0,0011–0,0014	0,00122	0,00006	0,00002	0,00005	3,87
		0,00118	0,00004	0,00001	0,00003	2,67
		0,00129	0,00009	0,00003	0,00007	5,49

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. М., 1989. С. 216.
2. Голубицкий Г.Б., Будко Е.В., Прохода Е.Ф., Покровский М.В., Захарова Е.В. Пат. РФ № 2267115.

Поступила в редакцию 01.06.07

QUANTITATIVE ANALYSE OF TABLETS AND SYRUP “CODELAC BRONKHO” BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHODS

G.B. Golubitskii, V.M. Ivanov

(Division of Analytical Chemistry)

A procedure was proposed for the quantitative analysis of the new original tablets and syrup “Codelac bronkho”. The components of the pills were separated in 6 minutes with effective peak resolution. The procedure was used for the analysis of a preproduction samples of the tablets. The results correspond to the normative documentation merits and the technological loadings. Model solutions containing all the active principles and additives of the drugs were analyzed, and the performance characteristics of both procedures were calculated. Two versions of analysis in isocratic and gradient modes were proposed for the syrup. Both procedures afford reliable analytical results; however, the isocratic version is technically simpler and more preferable for product control in commercial production.