

УДК 543.644.6

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАПСАИЦИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ НА МАЗЕВОЙ ОСНОВЕ МЕТОДОМ МИКРОЭМУЛЬСИОННОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Е.Б. Пашкова, А.В. Пирогов, Д.В. Юновидов, О.А. Шпигун

(кафедра аналитической химии; e-mail: e_pashkova@list.ru)

Предложен способ количественного определения капсаицина в лекарственных средствах на мазевой основе методом микроэмульсионной жидкостной хроматографии. За счет отсутствия стадий гомогенизации, экстрагирования органическими растворителями и фильтрования время подготовки пробы к анализу составило около 5 мин, что значительно меньше описанных в литературе вариантов (от 30 мин до 12 ч). Общее время анализа – около 20 мин. В случае применения монолитных колонок время анализа сокращается до 3 мин. Градуировочный график линеен в диапазоне от 0,02 до 240 мг/л. Предел обнаружения капсаицина составил 8 мкг/л.

Ключевые слова: микроэмульсионная жидкостная хроматография, капсаицин, лекарственные средства.

Капсаицин (рис. 1) (ванилиламид 8-метил-6-ноненовой кислоты) – вещество природного происхождения – оказывает сосудорасширяющее воздействие и используется в препаратах для лечения заболеваний опорно-двигательной системы. Капсаицин обладает высокой физиологической активностью и при его передозировке возникают побочные эффекты, поэтому задача определения этого вещества в лекарственных препаратах очень актуальна.

В работе [1] определяли содержание капсаицина и дигидрокапсаицина в воздухе с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Образцы воздуха пропускали через стекловолоконный фильтр, затем фильтр пропитывали раствором капсаицина в ацетонитриле и давали растворителю испариться. Фильтр выдерживали в течение 12 ч. После этого добавляли 2 мл ацетонитрила и экстрагировали в течение 10 мин на ультразвуковой бане. Использовали спектрофотометрическое детектирование при 281 нм. Разделение проводили на колонке “Waters Symmetry C 18” (3,9×150 мм) с диаметром частиц 5 мкм. Подвижная фаза – смесь (48:52) ацето-

нитрила и воды (отношение объемных процентов) со скоростью потока 1,3 мл/мин. Объем вводимой пробы составлял 25 мкл. Предел обнаружения дигидрокапсаицина составил 0,02 мкг. В работе [2] определяли содержание капсаицина в соусах и острых перцах методом ВЭЖХ. Для этого 15 г острого соуса или 2–3 г высушенного перца смешивали с этанолом до объема 50 мл. Колбу со смесью помещали на нагретую пластину, перемешивали и выдерживали при слабом кипении в течение 30 мин. Затем экстракт отфильтровывали и определяли содержание капсаицина методом ВЭЖХ с использованием колонки “C18” (25 см) и подвижной фазы с содержанием 50% ацетонитрила. Скорость потока составляла 1 мл/мин, температура разделения – 50°C. Детектирование осуществляли на СФ-детекторе с длиной волны 205 нм. Предел обнаружения 0,5 мкг/мл.

В работе [3] для определения капсаицина в растениях применяли мицеллярную электрокинетическую хроматографию. Оптимальное разделение пиков капсаицина и дигидрокапсаицина проведено за 11 мин при использовании смеси 15 мМ раствора дигидрофосфата натрия и 15 мМ раствора тетрабората натрия с добавкой 67,5 мМ додецилсульфата натрия и 15% метанола. Детектирование осуществляли при 214 нм.

Однако определение капсаицина в объектах с жировой матрицей, как правило, связано со сложной и длительной пробоподготовкой. В литературе не было найдено примеров определения капсаицина в лекар-

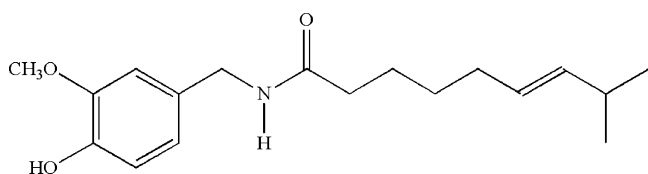


Рис. 1. Структурная формула капсаицина

ственных препаратах (мазевая или кремовая формы). Основной проблемой является количественное извлечение капсаицина из таких матриц и устранение мешающего влияния компонентов матрицы на хроматографическое определение. По-видимому, весьма перспективным путем решения этой задачи является использование метода микроэмульсионной жидкостной хроматографии (МЭЖХ). Использование микроэмульсий в качестве подвижной фазы позволяет одновременно определять гидрофильные и гидрофобные соединения, к тому же значительное содержание органической фазы дает возможность растворять смеси на гидрофобной основе. Вследствие этого возможно упрощение процесса пробоподготовки.

Микроэмульсии – это многокомпонентные жидкие коллоидные системы, характеризующиеся термодинамической устойчивостью. Они образуются самопроизвольно при смешивании двух жидкостей с ограниченной взаимной растворимостью (в простейшем случае при смешивании воды и углеводорода) в присутствии мицеллообразующих ПАВ. Структура такой микроэмульсии показана на рис. 2. Как правило, система содержит также не образующие мицелл ПАВ (спирт, амин, эфир или др.), так называемые ко-ПАВ (или со-ПАВ). Размер частиц дисперсной фазы составляет 10–100 нм.

Впервые микроэмульсии были применены в качестве подвижной фазы в жидкостной хроматографии высокого разрешения в 1986 г. [4]. Использование микроэмульсий в качестве подвижной фазы меняет характеристики разделения. Метод получил широкое распространение благодаря уникальной растворяющей силе микроэмульсий типа масло в воде для гидрофобных соединений, так как микроэмульсия содержит многочисленные включения с гидрофобной внутренней частью. Кроме того, она как подвижная фаза хорошо сочетается с обращенно-фазовыми колонками. Порядок элюирования соединений в данном методе часто

совпадает с их порядком элюирования для классической обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Экспериментальная часть

Аппаратура и реагенты. Работу выполняли на жидкостном хроматографе “Agilent 1100”, оснащенном бинарным градиентным насосом, дегазатором подвижной фазы, термостатом колонок, автосэмплером и диодно-матричным детектором (“Agilent Technologies”, США). Регистрацию хроматограмм осуществляли с помощью персонального компьютера и программного пакета ChemStation® (“Agilent Technologies”, США). В работе использовали хроматографические колонки “Grace Smart RP18” (150×4,6 мм), диаметр частиц 3 мкм и “Onyx Monolithic C18” (100×3 мм). Для отбора точных аликвот вещества использовали автоматические дозаторы объемом 10–100, 20–200 и 100–1000 мкл с пределом допускаемой погрешности измерения не более ±5% (“LABMATE”, Польша). Пробоподготовку осуществляли с помощью ультразвуковой термостатируемой ванны “САФИР” (Россия). Взвешивание точных навесок проводили на весах “Explorer Pro” (“Ohaus Corporation”, США), точность которых составляла 0,0001 г.

В работе использовали следующие реактивы: додецилсульфат натрия (содержание вещества не менее 98%, “Panreac”, Испания), *n*-гептан (“Panreac”, Испания), ацетонитрил (*gradient grade*, “Panreac”, Испания), *n*-бутанол (*HPLC grade*, “Panreac”, Испания), капсаицин синтетический (содержание вещества не менее 99%, “Sigma-Aldrich”, Германия), трифторуксусную кислоту (содержание вещества не менее 98%, “Panreac”, Испания), деионизированную воду с сопротивлением не менее 18,2 МОм.

В качестве объекта анализа использовали лекарственное средство “Финалгон” в мазевой форме (“Boehringer Ingelheim”, Германия).

Приготовление растворов. Для приготовления исходного раствора капсаицина в мерную колбу объемом 25 мл помещали навеску вещества. Добавляли 20 мл ацетонитрила и растворяли навеску в ультразвуковой бане. Раствор доводили до требуемого объема ацетонитрилом и перемешивали на ультразвуковой бане до полного растворения. Исходный концентрированный раствор хранили в холодильнике при 4°C в течение двух недель. Рабочие и градуировочные растворы готовили путем разбавления исходного концентрированного раствора дистиллированной водой и использовали непосредственно в день анализа.

В качестве подвижной фазы использовали микроэмульсии, содержащие 8% бутанола, 3,3% ДДСН,

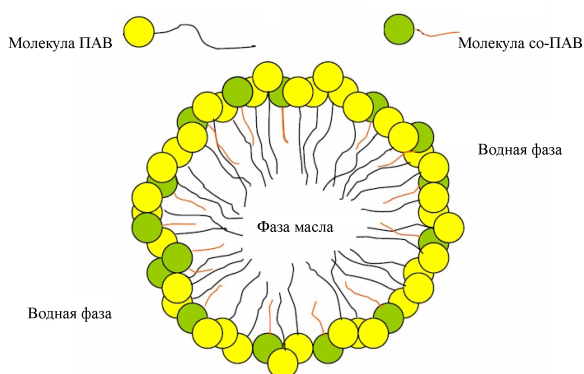


Рис. 2. Структура микроэмульсии типа масло в воде

1% гептана и 0,05% трифторуксусной кислоты. Для их приготовления навеску додецилсульфата натрия (ДДСН) растворяли в точно измеренном количестве дистиллированной воды на ультразвуковой бане. К раствору добавляли трифторуксусную кислоту, перемешивали, затем вводили необходимое количество гептана и снова перемешивали на ультразвуковой бане около 5 мин. К смеси добавляли *n*-бутанол и выдерживали на ультразвуковой бане при 45°C до образования микроэмульсии.

Пробоподготовка. Для приготовления пробы навеску исследуемого препарата массой около 20 мг помещали в пробирку, затем добавляли 5 мл микроэмульсии, использующейся в качестве подвижной фазы. Смесь перемешивали на ультразвуковой бане до полного растворения препарата (около 3 мин).

Результаты и их обсуждение

Выбор условий анализа. Хотя целью работы было определение капсаицина (максимум поглощения при 282 нм), спектрофотометрическое детектирование осуществляли при 210 нм, так как при этом возможно дополнительно определить все вещества, входящие в состав пробы (консерванты, рН-регуляторы и др.).

Влияние состава микроэмульсии на время удерживания капсаицина показано на рис. 3. Видно, что при увеличении концентраций бутанола, гексана и ДДСН элюирующая способность микроэмульсий возрастает. Оптимальное разделение всех компонентов пробы при отсутствии мешающего влияния примесей достигается при использовании микроэмульсии следующего состава: 8% бутанола, 3,3% ДДСН и 1% гептана. Применение микроэмульсии данного состава позволяет добиться разделения пиков основных компонентов и сократить время анализа, а также избежать мешающего влияния других компонентов пробы и примесей. Найдено, что площади пиков капсаицина линейно зависят от его концентрации в диапазоне от 0,02 до 240 мг/л (рис. 4). Время анализа составило 17 мин. За это время помимо капсаицина возможно определение и других компонентов, таких, как сорбиновая кислота, никобоксил и диэтоксипропиладипат. Типичная хроматограмма экстракта представлена на рис. 5. Полученное значение концентрации капсаицина в препарате “Финалгон” хорошо согласуется с паспортными данными. Найденная концентрация капсаицина составляет $4,1 \pm 0,2$ мг/г (согласно нормативным документам концентрация в образце составляет $4,0 \pm 0,1$ мг/г).

Важным аспектом является стабильность подвижной фазы. Образец исследуемой мази анализировали

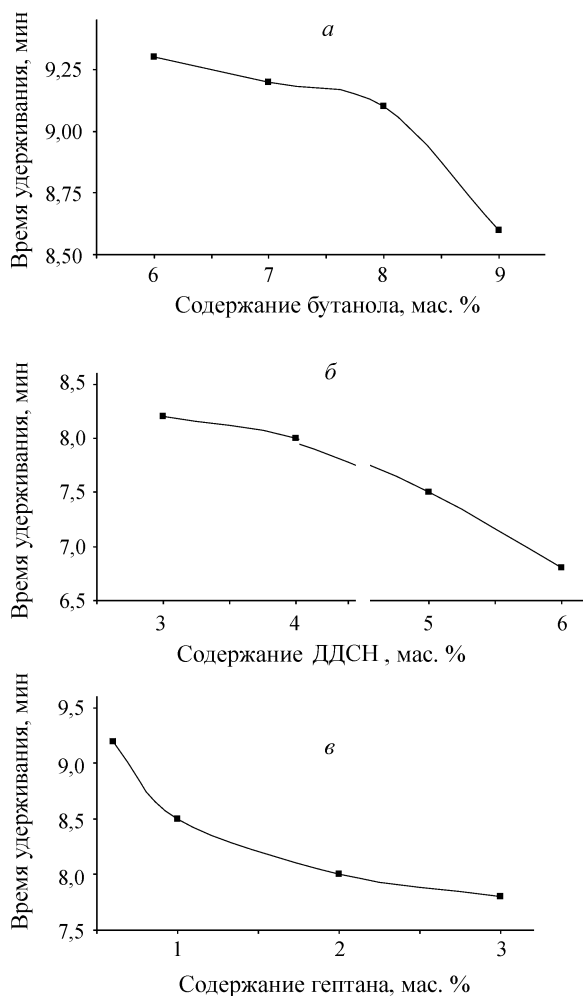


Рис. 3. Влияние концентрации бутанола (а), ДДСН (б) и гептана (в) на время удерживания капсаицина. Колонка “Grace Smart RP 18” (150×4,6 мм). Скорость потока 0,5 мл/мин, спектрофотометрическое детектирование при 210 нм. Условия анализа: а – содержание ДДСН 3,3%, гептана 1% и ТФК 0,05%; б – содержание бутанола 8%, гептана 1% и ТФК 0,05%; в – содержание бутанола 6%, ТФК 0,05% и ДДСН 3%

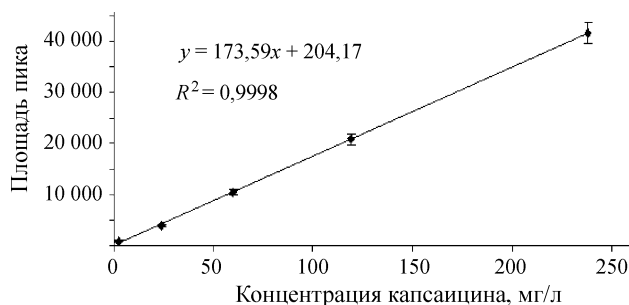


Рис. 4. Градуировочная зависимость для определения капсаицина

каждые 24 ч, при этом одну микроэмульсию хранили при комнатной температуре, а вторую – при 4°C. Было установлено, что в первом случае микроэмульсия стабильна в течение недели (стандартные откло-

нения для времени удерживания и площади пика капсаицина не превышали 1,3 и 4,2% соответственно). При хранении подвижной фазы при 4°C стандартные отклонения для времени удерживания и площади пика составляли 0,6 и 2,1%, а воспроизводимость результатов сохранялась в течение месяца. Основной проблемой при использовании микроэмульсий в качестве элюента является высокое давление в системе, связанное с высокой вязкостью используемой подвижной фазы. Это в значительной степени ограничивает скорость потока и соответственно лимитирует время анализа. Одним из путей решения данной проблемы является использование неподвижных фаз на основе монолитных сорбентов. Применение монолитной колонки дает возможность увеличить скорость потока в три раза, при этом давление в системе не превышает 80 бар. Как видно из рис. 6, за 2,5 мин достигается полное разделение всех компонентов пробы.

Как было описано выше, микроэмульсии обладают способностью растворять смеси на основе матриц с высоким содержанием жиров. Поэтому логичным представляется использовать эмульсию в качестве экстрагента для извлечения капсаицина из пробы. Было проведено сравнение трех экстрагентов: воды, *n*-бутанола и микроэмульсии. Результаты эксперимента представлены в таблице. Как видно, в случае микроэмульсии достигаются наилучшие результаты, к тому же время, необходимое для пробоподготовки, в данном случае минимально (5 мин).

Сравнение эффективности различных растворителей для извлечения капсаицина ($n = 3$, $P = 0,95$)

Экстрагент	Содержание капсаицина, мг/г
вода	$3,0 \pm 0,1$
бутанол-1	$9,1 \pm 0,2$
микроэмульсия (3,3% ДДСН; 1% гептана; 8% бутанола; 0,05% ТФК)	$10,0 \pm 0,2$

Таким образом, был разработан способ экспрессного (время анализа 17 мин) определения капсаицина в фармацевтических препаратах на жировой основе методом МЭЖХ при использовании в качестве подвижной фазы микроэмульсии состава: 8% бутанола, 3,3% ДДСН и 1% гептана. Диапазон линейности градуировочного графика от 2 до 240 мг/л. Предел обнаружения составляет 8 мкг/л. Изучено влияние состава микроэмульсий на удерживание капсаицина. Найдено, что увеличение концентрации основных компонентов микроэмульсии приводит к уменьшению времени удерживания капсаицина. Показаны преимущества использования монолитных неподвижных фаз: снижение рабочего давления в системе и значительное сокращение времени анализа. Предложен способ быстрого и количественного извлечения капсаицина

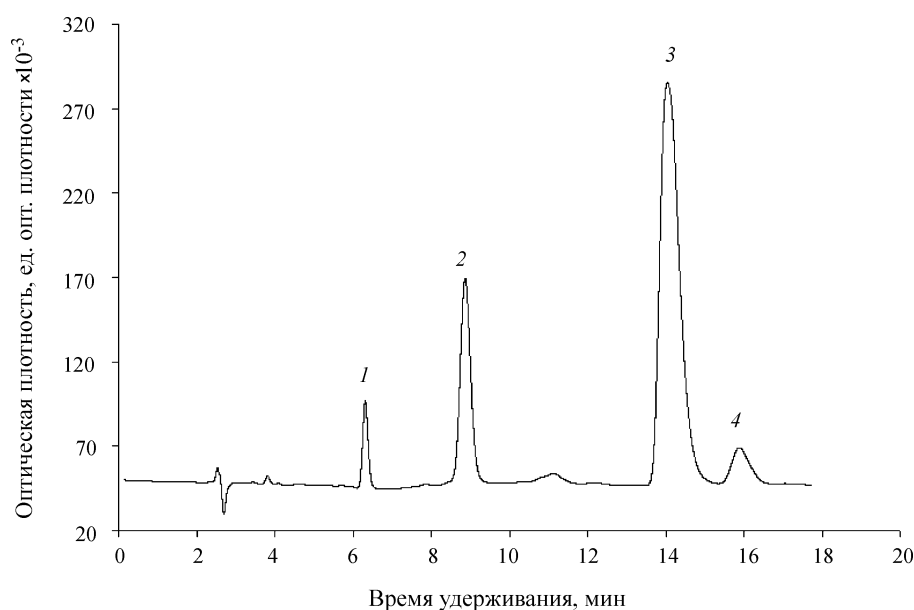


Рис. 5. Хроматограмма образца мази "Финалгон". Колонка "Grace Smart RP 18" (150×4,6 мм). Элюент: 8% бутанола, 3,3% ДДСН и 1% гептана. Скорость потока элюента 0,5 мл/мин. Спектрофотометрическое детектирование при 210 нм. Пики: 1 – сорбиновая кислота, 2 – капсаицин, 3 – никобоксил, 4 – диэтоксипропиладипат

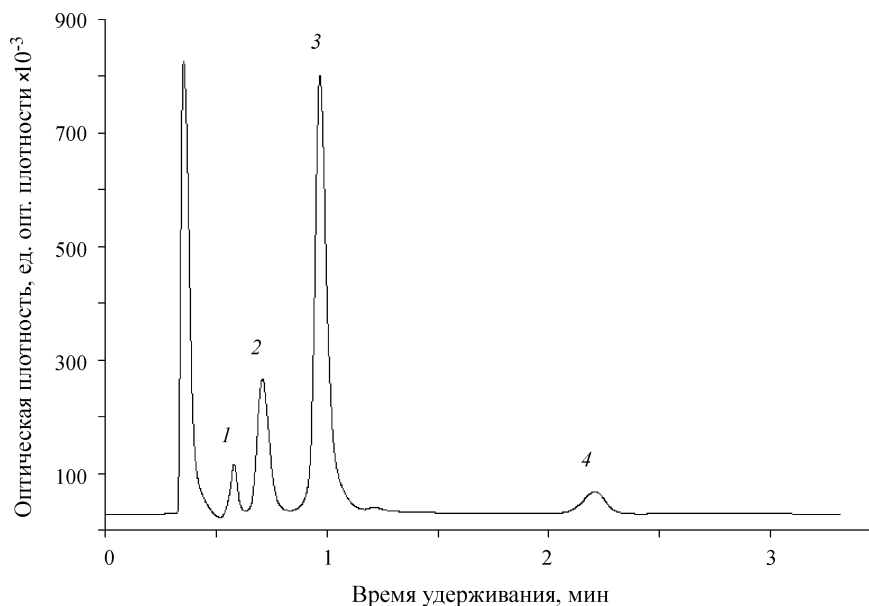


Рис. 6. Хроматограмма образца мази “Финалгон”. Колонка “*Onyx Monolithic*” 100×3 мм. Элюент: 8% бутанола, 3,3% ДДСН и 1% гептана. Скорость потока элюента 0,5 мл/мин. Спектрофотометрическое детектирование при 210 нм. Пики: 1 – сорбиновая кислота, 2 – капсаицин, 3 – никобоксил, 4 – диэтоксипропиладипат

из образцов на жировой основе путем растворения в микроэмульсии. Предложенный подход был использован при определении капсаицина в образце лекар-

ственного средства на мазевой основе “Финалгон”. Найденное содержание ($4,1 \pm 0,2$ мг/г) хорошо согласуется с паспортными данными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tucker D., Samuel P. // Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 2001. **62**. P. 45.
2. James D., Batchelor T., Bradley T. // J. Chem. Educ. 2000. **77**. P. 266.
3. Laskaridou-Monnerville A. // J. Chromatogr. A. 1999. **838** N 1-2. P. 293.
4. Hernandez – Torres M., Landy J., Dorsey J. // J. Anal. Chem. 1986. **58**. P. 744.

Поступила в редакцию 03.09.09

QUANTITATIVE DETERMINATION OF CAPSAICIN IN LINIMENTS BY MICROEMULSION LIQUID CHROMATOGRAPHY

Ye.B. Pashkova, A.V. Pirogov, D.V. Yunovidov, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry)

The technique of quantitative determination of capsaicin in liniments by microemulsion liquid chromatography method was proposed. Due to the absence of the homogenization, extraction and filtration stages, the procedure of sample pretreatment takes 5 minutes, what is much more rapid in comparison with the variants, described in the literature (from 30 minutes to 12 hours). The full time of the analysis (including the procedure of sample pretreatment) is 20 minutes. The graduation curve is linear in the range from 0,02 to 240 mg/l. the limit of determination of capsaicin was 8 mkg/l.

Key words: *microemulsion liquid chromatography, capsaicin, liniments.*

Сведения об авторах: Пашкова Елена Борисовна – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (e_pashkova@list.ru); Пирогов Андрей Владимирович – вед. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук; Юновидов Дмитрий Валерьевич – студент химического факультета МГУ; Шпигун Олег Алексеевич – профессор химического факультета МГУ, чл.-корр. РАН, докт. хим. наук (shpigun@analyt.chem.msu.ru).