

## Альтернативный метод оценки содержания примесей в антимикробных препаратах

С. И. Кулешова, Т. И. Пшеничных, Е. П. Симонова

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

Статья поступила 08.07.2016 г. Принята к печати 21.11.2016 г.

**Резюме:** Показана возможность проведения испытания методом хроматографии в тонком слое сорбента с последующей оценкой ТСХ-хроматограмм с помощью спектроденситометра для определения примесей в таблетках ципрофлоксацина. При использовании хроматографических пластинок НРТLC silica gel 60F<sub>254</sub>, подвижной фазы дихлорметан:метанол:аммиак:ацетонитрил (30:40:20:10) получены хроматограммы, позволяющие количественно оценить содержание этилендиаминового аналога ципрофлоксацина в лекарственной форме «таблетки». Полученные результаты статистически согласуются с данными, определенными валидированной методикой. Предложенный метод дает возможность подтверждать результаты определения идентифицированной примеси при получении значений, не соответствующих заявленным нормам.

**Ключевые слова:** ципрофлоксацин; этилендиаминовый аналог ципрофлоксацина; хроматография в тонком слое сорбента; метод спектроденситометрии; ТСХ-хроматограммы.

**Библиографическое описание:** Кулешова СИ, Пшеничных ТИ, Симонова ЕП. Альтернативный метод оценки содержания примесей в антимикробных препаратах. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2016; (4): 15–19.

Проблеме оценки качества препарата по содержанию родственных примесей в лекарственных средствах (ЛС) уделяется большое внимание в отечественных и международных руководствах и стандартах [1–4]. Учитывая, что наличие возможных примесей в лекарственных препаратах может оказывать негативное воздействие, в том числе тератогенное, мутагенное, канцерогенное, на принимающих такие препараты больных, методы, используемые для определения содержания примесей конкретных ЛС, должны обеспечивать достоверность получаемых результатов. Наиболее распространенными методами определения специфических примесей в ЛС в настоящее время являются хроматографические методы: хроматография в тонком слое сорбента (ТСХ) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В антимикробных ЛС в качестве основного метода определения примесей действующих веществ ведущими фармакопеями рекомендован метод ВЭЖХ [5, 6]. Тем не менее, разработка альтернативных методов позволит обеспечить дополнительную оценку результатов, получаемых рутинным методом, что особенно важно при получении значений по содержанию специфических примесей, выходящих за нормируемые пределы спецификации; кроме того, дополнительные методы могут использоваться при аттестации фармакопейных стандартных образцов для более полной оценки степени их чистоты.

**Цель работы** — проанализировать возможность определения идентифицированных примесей ципрофлоксацина методом ТСХ с количественной ТСХ-хроматограммой методом спектроденситометрии.

Метод ТСХ в настоящее время является одним из широко распространенных методов оценки качества ЛС, он экспрессивен и более экономичен, чем метод

ВЭЖХ. Прямые спектрофотометрические измерения опытных веществ непосредственно на пластинках позволяют определять их количества.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны субстанция ципрофлоксацина, производства Аарти Драгс Лимитед, Индия и таблетки ципрофлоксацина, «Ципробай®», 250 мг», производства «Байер Шеринг Фарма АГ», Германия.

Ципрофлоксацин (1-циклопропид-6-фтор-4-оксо-7-(пиперазин-1-ил)-1,4-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты) — высокоактивное соединение, обладающее широким спектром антибактериального действия. Препараты ципрофлоксацина характеризуются высоким клиническим эффектом и прочно вошли в медицинскую практику. Основным продуктом деградации ципрофлоксацина является его этилендиаминовый аналог (примесь С по Европейской фармакопее), нормируемый в субстанциях и в таблетках, при этом допустимое количество этой примеси в таблетках выше, чем в субстанциях: «не более 0,5 %» и «не более 0,2 %» соответственно [5–7].

Аналогичные нормы приведены в большинстве нормативных документов на зарегистрированные в Российской Федерации ЛС ципрофлоксацина. Кроме этилендиаминового аналога в субстанции ципрофлоксацина нормируются следующие идентифицированные примеси: фторхинолоновой кислоты (примесь А) и дефторципрофлоксацина (примесь В), декарбоксиципрофлоксацина (примесь Е) и 7-хлор-6-пиперазинил аналога ципрофлоксацина (примесь D). Фторхинолоновая кислота определяется методом ТСХ, остальные соединения — методом ВЭЖХ, норма для всех известных примесей приведена: «не более 0,2 %» [5–7].

Для идентификации примесей и расчета их количественного содержания использовали стандартные образцы ципрофлоксацина гидрохлорида USP RS, этилендиаминового аналога ципрофлоксацина USP RS.

Испытуемые растворы и растворы сравнения готовили в воде. Все растворы помещали в мерные колбы темного стекла и использовали свежеприготовленными. Навески таблеток, субстанции и стандартного образца ципрофлоксацина гидрохлорида разводили до концентрации ципрофлоксацина 1,50 мг/мл, раствор стандартного образца примеси С — 0,075 мг/мл. Для оценки разделительной способности готовили раствор, содержащий ципрофлоксацин (0,5 мкг/мл) и этилендиаминовый аналог (0,05 мкг/мл).

Порошок таблеток предварительно тщательно растирали, точную навеску, эквивалентную 150 мг ципрофлоксацина, помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, суспендировали в воде в течение 15 мин на ультразвуковой бане, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,20 мкм (Einmal-filter/Disposable syringe filter Chromafil® АО-20.25) и разводили водой до необходимой концентрации.

В качестве подвижной фазы использовали смесь дихлорметан : метанол : аммиак : ацетонитрил (30:40:20:10). В качестве стационарной фазы использовали высокоэффективные хроматографические пластинки НРТLC silica gel 60F<sub>254</sub> (Merck, кат. 1.05548.0001) размером 20 × 20 см. После нанесения растворов хроматографическую пластинку, высушенную на воздухе в течение 10 мин, выдерживали в парах 28 % раствора аммиака в течение 30 мин, для этого пластинку помещали в хроматографическую камеру, на дно которой установили два стеклянных химических стакана по 30 мл аммиака в каждом (использовать пластинку НРТLC NH<sub>2</sub> F<sub>254</sub> S с привитой NH<sub>2</sub> группой оказалось невозможным, зоны адсорбции испытуемых соединений размыты, пятна примесей не идентифицировались).

Затем хроматографическую пластинку помещали в насыщенную в течение 60 мин камеру с подвижной фазой. Когда фронт растворителя достигал 3/4 от линии старта, ее вынимали из камеры и подсушивали на воздухе в течение 10–15 мин. Полученные хроматограммы просматривали в УФ-свете при длинах волн 254 и 366 нм в УФ-кабинете для ТСХ с системой документированных данных «САМАГ». Количественное определение примесей проводили с помощью спектроденситометра «TLC Scanner 4» с программным обеспечением winCATS фирмы «САМАГ». Испытуемые растворы наносились автоматически на приборе Linomat 5.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты хроматографирования растворов 1 и 2 (таблетки) — 150 мкг и 1,5 мкг ципрофлоксацина нанесено на хроматографическую пластинку, растворов 3, 4 (субстанция) — 150 мкг и 1,5 мкг ципрофлоксацина, растворов 5, 6, 7 (стандартный образец ципрофлоксацина гидрохлорида) — 1,5 мкг, 0,3 мкг, 0,15 мкг ципрофлоксацина соответственно, раствора 8 (стандартный образец этилендиаминового аналога, примесь С) — 0,075 мкг примеси и раствор 9

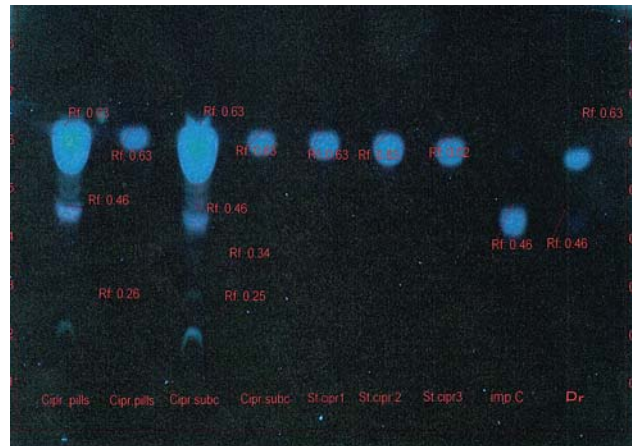


Рис. 1. Хроматограммы растворов 1 и 2 таблеток ципрофлоксацина, растворов 3, 4 субстанции ципрофлоксацина гидрохлорида, растворов 5, 6, 7 стандартного образца ципрофлоксацина гидрохлорида 1,5 мкг, 0,3 мкг, 0,15 мкг соответственно, раствора 8 стандартного образца этилендиаминового аналога ципрофлоксацина и раствора 9 для проверки разделительной способности 75 мкг ципрофлоксацина и 0,75 мкг примеси С

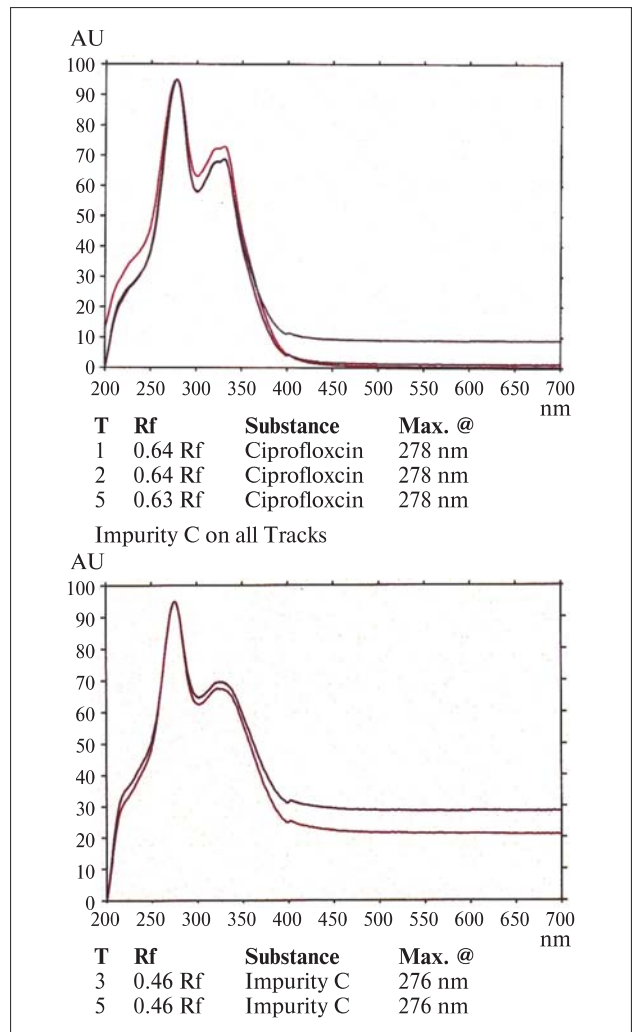


Рис. 2. Спектры поглощения зон адсорбции ципрофлоксацина и этилендиаминового аналога ципрофлоксацина для определения длины волны в максимуме поглощения

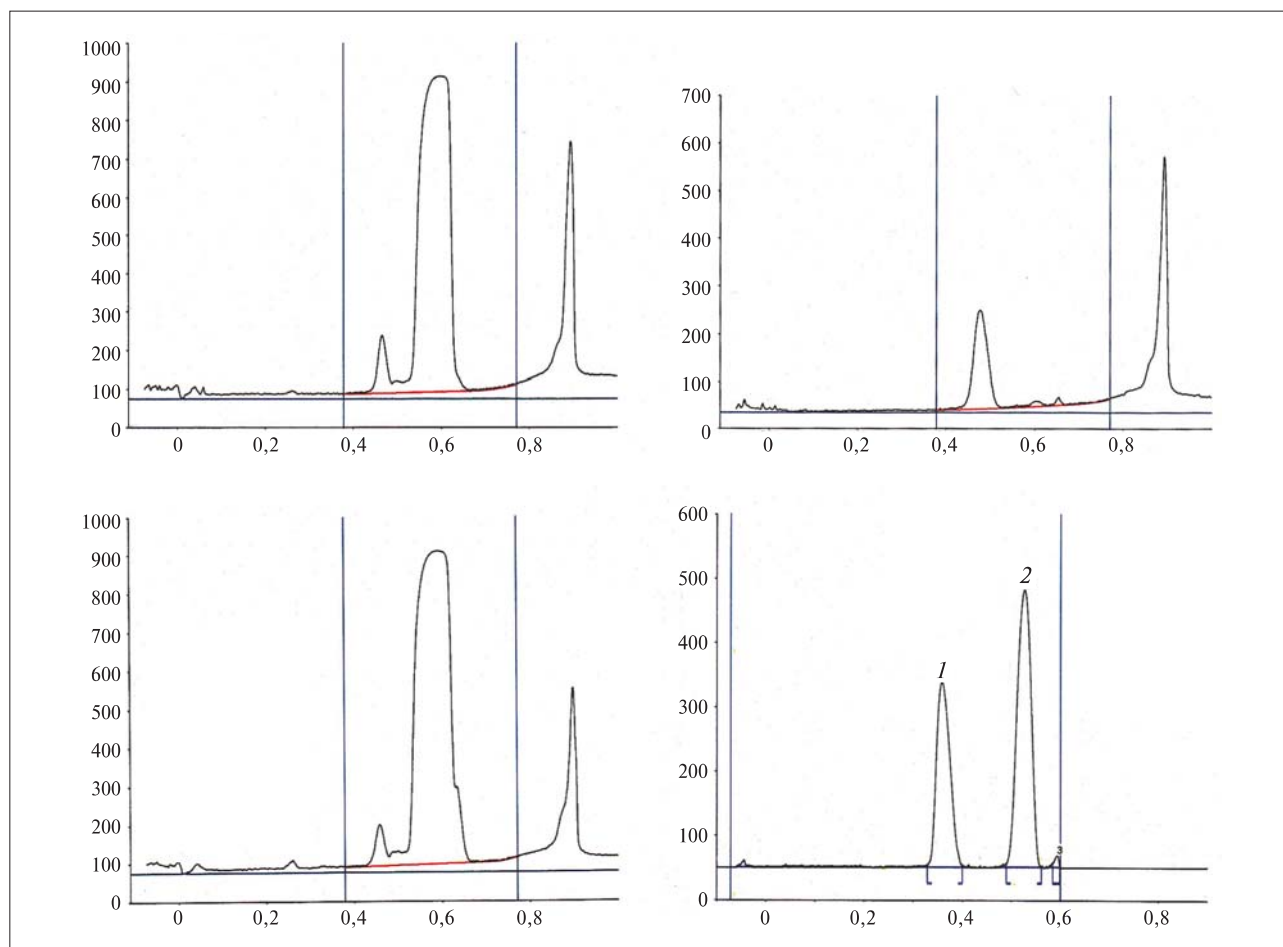


Рис. 3. Спектры поглощения зон адсорбции на хроматограммах: 1) раствора 1 таблеток ципрофлоксацина, 2) раствора 3 субстанции ципрофлоксацина гидрохлорида, 3) раствора 8 стандартного образца этилендиаминового аналога ципрофлоксацина, 4) раствора 9 для проверки разделительной способности

для проверки разделительной способности — 75 мкг ципрофлоксацина и 0,75 мкг примеси С представлены на рисунке 1. Этилендиаминовый аналог нанесен на пластинку в количестве, соответствующем их предельному содержанию в таблетках. При просмотре в УФ-свете при длине волны 365 нм на хроматограмме раствора 1 и раствора 3 обнаружены четко различимые зоны адсорбции этилендиаминового аналога, которые характеризуются подвижностью со значением  $R_f$  — 0,46, соответствующим  $R_f$  примеси С на хроматограмме раствора 8.

Кроме примеси С на хроматограммах растворов таблеток и растворов субстанции наблюдаются пятна примесей с  $R_f$  — 0,26,  $R_f$  — 0,33, идентифицировать которые не представляется возможным ввиду отсутствия веществ-свидетелей.

Оценку разделительной способности оценивали по параметру  $R_{st}$  как менее зависимому от колебаний условий проведения испытаний. Показатель  $R_{st}$  рассчитывали по отношению  $R_f$  примеси С к  $R_f$  ципрофлоксацина. Среднее значение из пяти независимых определений на хроматограммах, полученных в разные дни, составило 0,72 (RSD — 1,24 %).

Предел обнаружения этилендиаминового аналога в приведенных условиях хроматографирования ус-

тановлен на уровне 0,15 мкг или 0,1 % от концентрации ципрофлоксацина в исследуемых растворах.

Содержание примесей при визуальной детекции можно определить только полуколичественно путем сравнения величин и интенсивности окрашивания зон адсорбции. Поэтому следующий этап нашей работы заключался в снятии спектров отражения на приборе «TLC Scanner 4» в максимуме поглощения ципрофлоксацина в воде 278 нм. Определение максимума поглощения ципрофлоксацина и его примеси С представлено на рисунке 2. Показано, что

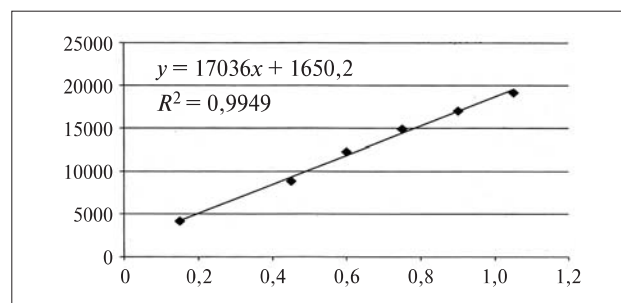


Рис. 4. Графическое представление линейности. Ось абсцисс — количество этилендиаминового аналога в зонах адсорбции, мкг. Ось ординат — площади пиков этилендиаминового аналога

максимум поглощения зон адсорбции как ципрофлоксацина, так и его этилендиаминового аналога близки и отличаются незначительно, для основного соединения максимум поглощения при длине волны 278 нм, для примеси — 276 нм. Типичные спектры поглощения представлены на рисунке 3. Анализ полученных спектров показал, что пик примеси С четко идентифицируется при сканировании хроматограмм испытуемых растворов (1) и (3) и сопоставим по положению с аналогичным пиком на хроматограмме раствора стандартного образца этилендиаминового аналога. Содержание примеси С рассчитывали только в таблетках ципрофлоксацина по общепринятой формуле с учетом площадей пиков и концентраций испытуемых растворов и раствора стандартного образца примеси. Определение количественного содержания данной примеси в субстанции ципрофлоксацина не представилось возможным из-за недостаточного количества экспериментальных данных. Предварительно проведена оценка линейности методики путем установки зависимости между содержанием примеси С в зонах адсорбции и площадями пиков, рассчитанных по спектрам поглощения. Установлено, что коэффициент корреляции 0,9949 в диапазоне от 0,15 мкг до 1,5 мкг, что соответствует от 0,1 % до 0,7 %. Графическое представление линейности — на рисунке 4.

Количественной оценкой ТСХ-хроматограмм получены следующие результаты: 0,19 % среднее из трех определений (0,16 %; 0,18 %; 0,22 %), стандартное отклонение 0,031 при уровне значимости 0,05.

## ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.  
 Кулешова Светлана Ивановна. Начальник лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств, канд. биол. наук.  
 Пшеничных Татьяна Ивановна. Эксперт 2-й категории лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.  
 Симонова Елена Павловна. Ведущий эксперт лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств.

## АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Кулешова Светлана Ивановна; Kuleshova@expmed.ru

## ALTERNATIVE METHOD FOR DETERMINING IMPURITIES IN ANTIMICROBIAL MEDICINES

S. I. Kuleshova, T. I. Pshenichnykh, E. P. Simonova

Federal State Budgetary Institution  
 «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»  
 of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

**Abstract:** The article investigates the possibility of using thin-layer chromatography and spectrodensitometer analysis of TLC-chromatograms to determine impurities in ciprofloxacin tablets. HPTLC silica gel 60F<sub>254</sub> chromatographic plates and the mobile phase dichloromethane:methanol:ammonia:acetonitrile (30:40:20:10) were used to obtain chromatograms that enabled quantitative determination of ciprofloxacin ethylenediamine analogue in the tablet dosage form. The results of testing were consistent with the data obtained by a validated method. The proposed method makes it possible to determine an identified impurity if the data obtained from tests do not comply with the specification.

**Key words:** ciprofloxacin; ciprofloxacin ethylenediamine analogue; thin-layer chromatography (TLC); spectrodensitometry; TLC-chromatograms.

**For citation:** Kuleshova SI, Pshenichnykh TI, Simonova EP. Alternative method for determining impurities in antimicrobial medicines. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2016; (4): 15–19.

Полученные результаты сравнили с данными, определенными ранее методом ВЭЖХ с использованием валидированной методики: среднее значение 0,20 % (0,18 %; 0,20 %; 0,22 %) стандартное отклонение 0,028 при уровне значимости 0,05. При проверке различий средних величин с помощью двухвыборочного t-критерия Стьюдента сопоставимость полученных результатов подтверждена [8].

Таким образом, метод спектроденситометрии для оценки ТСХ-хроматограмм позволяет количественно оценить содержание идентифицированных примесей, в частности этилендиаминового аналога, полученные результаты согласуются с экспериментальными данными, определенными валидированной методикой.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 1–3. М.; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml>.
2. ICH, Q3B(R). Impurities in Drug Products (Nov. 2003).
3. FDA, Guidance for Industry — ANDAs: Impurities in Drug Substances (Rockville, MD, Jan. 2005).
4. ICH, Q3A(R). Impurities in New Drug Substances (Feb. 2003).
5. European Pharmacopoeia. 8th ed.
6. United States Pharmacopoeia. USP 40-NF 35. Nov 1 2016, May 1 2017. Available from: <http://www.usp.org/usp-nf/development-process/publication-comment-schedule>.
7. British Pharmacopoeia; 2016. Available from: <http://pharmacopoeia.com/BP2016>.
8. Рекомендации по межгосударственной стандартизации «Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки». РМГ 61–2003. М.; 2010.

## REFERENCES

1. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th edition. V. 1–3. Moscow; 2015. Available from: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
2. ICH, Q3B(R). Impurities in Drug Products (Nov. 2003).
3. FDA, Guidance for Industry — ANDAs: Impurities in Drug Substances (Rockville, MD, Jan. 2005).
4. ICH, Q3A(R). Impurities in New Drug Substances (Feb. 2003).
5. European Pharmacopoeia. 8th ed.
6. United States Pharmacopoeia. USP 40-NF 35. Nov 1 2016, May 1 2017. Available from: <http://www.usp.org/usp-nf/development-process/publication-comment-schedule>.
7. British Pharmacopoeia; 2016. Available from: <http://pharmacopoeia.com/BP2016>.
8. Recommendations on interstate standardization «Indicators of precision, accuracy, preciseness of the quantitative chemical analysis techniques. Evaluation methods». RMG 61–2003. Moscow; 2010 (in Russian).

## AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

*Kuleshova SI.* Head of the Laboratory of antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products Quality. Candidate of Biological Sciences.

*Pshenichnykh TI.* 2nd professional category expert of the Laboratory of antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products Quality.

*Simonova EP.* Leading expert of the Laboratory of antibiotics of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products Quality.