

Симонян Е.В., Абрамовских О.А., Юмагужина А.Т., Абрамовских К.А.

## Разработка оптимальных условий хроматографирования для анализа кислоты никотиновой

Кафедра химии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Южно – уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения, г. Челябинск

Simonyan E.V., Abramovskikh O.S., Iumaguzhina A.T., Abramovskikh K.A.,

## Development of optimum chromatographic conditions of nicotinic acid analysis

### Резюме

Цель работы: разработать оптимальные условия хроматографирования для анализа кислоты никотиновой в новых лекарственных формах (суппозиториях в сочетании с экстрактом прополиса). Основные результаты: Проведен выбор оптимальных условий хроматографирования, рассчитаны основные параметры пригодности хроматографической системы. Установлено, что с увеличением значения pH увеличивается коэффициент асимметрии на фоне снижения эффективности разделения. При этом величина pH не оказывает существенного воздействия на время удерживания и коэффициент емкости. Проведена валидация методики. Основные выводы: Предложена методика количественного определения кислоты никотиновой методом обращенно – фазовой ВЭЖХ. В качестве подвижной фазы (ПФ) рекомендовано использовать смесь ацетонитрил – кислота ортофосфорная 0,5%. Скорость подачи элюента – 100 мкл/мин, длина волны детектирования – 260 нм.

**Ключевые слова:** кислота никотиновая, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация

### Summary

Objective: To develop optimum chromatographic conditions for analysis of nicotinic acid in new dosage forms (suppositories, combined with extract of propolis). Main results: the election of the optimal conditions for chromatography, to calculate the main parameters of fitness hromtograficheskoy system. It was found that an increase in pH increases the coefficient of asymmetry due to lower separation efficiency. The value of pH has no significant effect on the retention times and capacity coefficient. Spend validation techniques. Key findings: The technique of quantitative determination of nicotinic acid by reversed - phase HPLC. The mobile phase (PF) is recommended to use a mixture of acetonitrile - 0.5% phosphoric acid. eluent flow rate - 100 l / min, detection wavelength - 260 nm.

**Keywords:** nicotinic acid, high performance liquid chromatography, validation

### Введение

Одной из задач современной медицины и фармации является поиск новых эффективных и безопасных лекарственных средств, обладающих комплексным действием. Данное направление может быть перспективным в ряду производных карбоновых кислот, среди которых следует выделить кислоту никотиновую. Никотиновая кислота улучшает мозговой и периферический кровоток, ее широкий фармакологический спектр действия предполагает исследования по созданию новых лекарственных форм [3]. Поэтому остается актуальным вопрос о современных методах анализа кислоты никотиновой.

### Материалы и методы

Исследования проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Аквилон» с УФ – детектором, снабженным колонкой «Луна C18». Разработку методики количественного определения кислоты никотиновой осуществляли на суппозиториях с предложенным составом: кислоты никотиновой – 0,5; экстракта прополиса – 0,4 мл; ПЭГ 4000 – 1,0; кремфор RH – 40 – 12,5; лутрол F- 68 – 7,5; эмульгатор Т- 2 – 0,1 [4, 6].

В качестве меры удерживания исследуемых компонентов в хроматографических системах, отличающихся составом подвижных фаз, применяли: коэффициенты емкости ( $k'$ ), эффективность разделения – критерий  $R_s$ ,

отклонение профиля хроматографической зоны анализируемого вещества от формы гауссовой кривой оценивали с помощью коэффициента асимметрии  $As$ . Эффективное разделение компонентов пробы регистрировали при  $R_s \geq 1$ ;  $0,5 < k' < 20$ ;  $0,7 < As < 1,5$  [2, 5].

Выбор элюента базировался на изучении процесса взаимодействия сорбат – сорбент с учетом коэффициента гидрофобности молекул по Шатцу, который рассчитывали по формуле: , где  $ph$  – число атомов углерода в молекуле,  $pf$  – число полярных групп. Так, для кислоты никотиновой этот показатель оказался равным 0,34. Это свидетельствует о низкогидрофобности молекулы и позволяет предположить преобладание межмолекулярного взаимодействия «кислота никотиновая – неподвижная фаза». Уменьшение этого процесса может быть достигнуто введением в подвижную фазу органического растворителя – ацетонитрила или изопропанола, которые способны усилить специфическое взаимодействие «сорбат – элюент». Нами были использованы ПФ с содержанием органического компонента в различных мольных соотношениях.

### Результаты и обсуждение

Введение в водную ПФ изопропанола вызывает формирование восходящих кривых. В результате меняется время выхода кислоты никотиновой. Кривые зависимости  $1/k' = f(Mm)$  при элюировании ПФ с добавками ацетонитрила характеризуются преимущественно выпуклым характером для сорбатов. Установлено, что при содержании ацетонитрила около до 6 М, а также больше

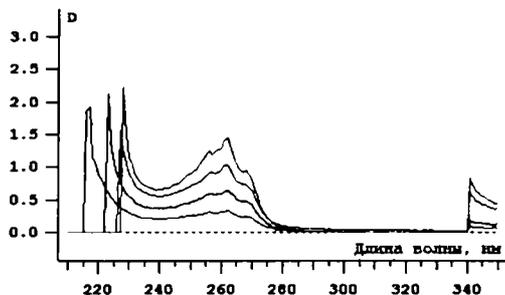


Рисунок 1. УФ – спектры поглощения кислоты никотиновой различной концентрации

10 моль, преобладают взаимодействия сорбат – сорбент, вызывающие формирование размытых пиков. Таким образом, на основании проведенных предварительных исследований установлено, что оптимальное соотношение подвижной фазы – ацетонитрил – вода в соотношении 30:70. Кислота никотиновая имеет неустойчивый характер спектра поглощения (рисунок 1).

В связи с этим при разработке методики хроматографического определения первым этапом был выбор длины волны детектирования. В качестве аналитических длин волн использовали 218, 220, 225, 230 и 260 нм. Было установлено, что использование в качестве аналитических длин волн в области 218 – 230 нм оказалось необоснованным. Пики получались нечеткие, размытые, с большой величиной асимметрии (рисунок 2 – 5).

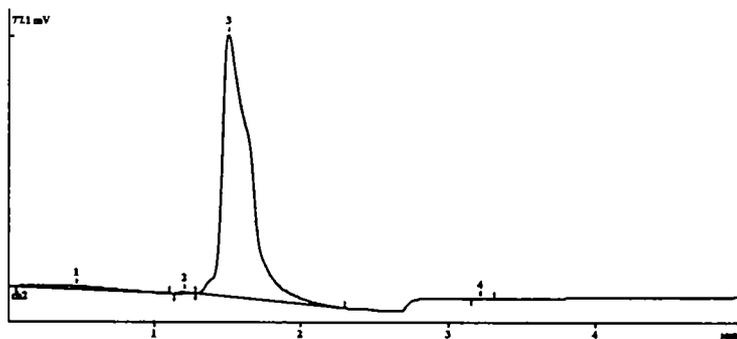


Рисунок 2. Хроматограмма кислоты никотиновой при 218 нм

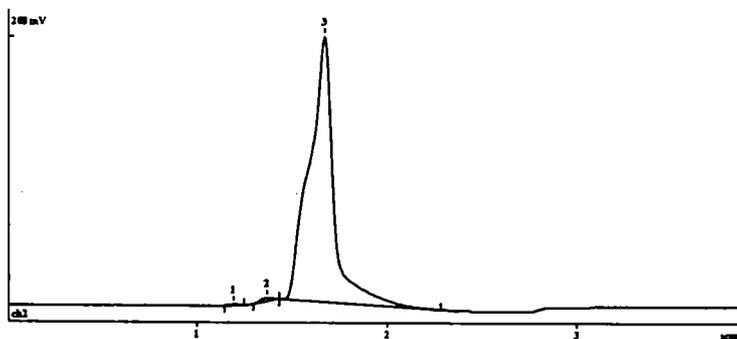


Рисунок 3. Хроматограмма кислоты никотиновой при 220 нм

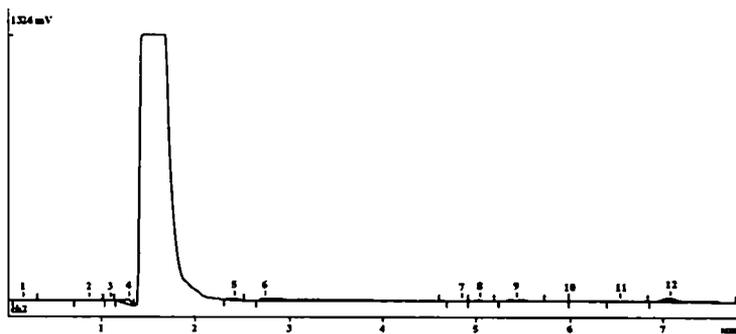


Рисунок 4. Хроматограмма кислоты никотиновой при 225 нм

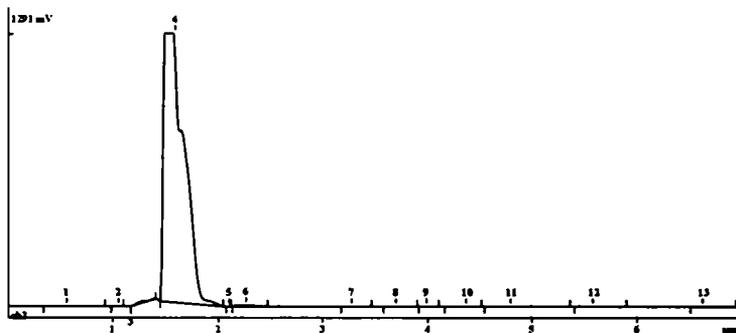


Рисунок 5. Хроматограмма кислоты никотиновой при 230 нм

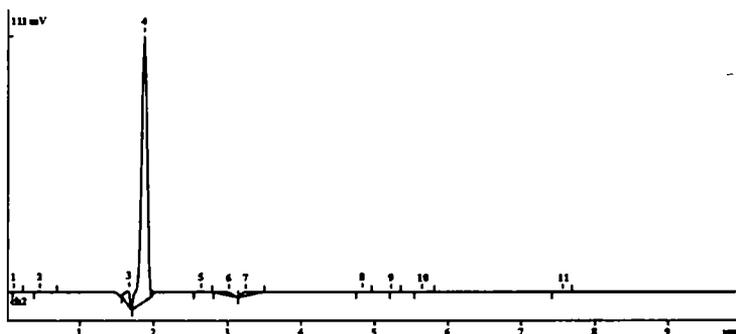


Рисунок 6. Четкий пик кислоты никотиновой с временем удерживания 1,8 минуты.

Эти изменения доказывают нестабильность максимума светопоглощения при проведении спектрофотометрического определения. При использовании в качестве аналитической длины волны 260 нм, получили достаточно четкий пик кислоты никотиновой с временем удерживания 1,8 минуты (рисунок 6).

Для выбора оптимальных условий изучили влияние рН на хроматографический процесс. Результаты представлены в таблице 1.

Установлено, что с увеличением значения рН увеличивается коэффициент асимметрии на фоне снижения эффективности разделения. При этом величина рН не оказывает существенного воздействия на время удерживания и коэффициент емкости [1, 6].

Таким образом, нами была апробирована методика количественного определения кислоты никотиновой ме-

тодом ВЭЖХ для суппозитория, используя в качестве ПФ системы растворителей: ацетонитрил – кислота ортофосфорная 0,5%. Скорость подачи элюента составила 100 мкл/мин, длина волны детектирования – 260 нм.

Определение проводили по методике:

Приготовление раствора РСО кислоты никотиновой.

Около 0,5 (точная навеска) кислоты никотиновой помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 30 мл горячей депротенизированной воды, охлаждали, прибавляли 1 мл кислоты ортофосфорной, доводили водой до метки и перемешивали. Фильтровали через фторопластовый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Приготовление раствора испытуемого образца суппозитория с кислотой никотиновой и экстрактом прополиса.

**Таблица 1. Параметры хроматографической системы для определения кислоты никотиновой в зависимости от величины pH**

pH	Время удерживания, сек. $t_R$	Коэффициент емкости, $k'$	Эффективность, N	Фактор асимметрии, $A_s$
4,0	108	2,6	74649	1,47
5,0	105	2,4	74267	1,87
6,0	107	2,6	73281	1,88
8,0	108	2,6	73974	1,87
9,0	114	2,5	72876	1,94
10,0	114	2,6	72761	1,92

**Таблица 2. Результаты количественного определения кислоты никотиновой в суппозиториях методом ВЭЖХ**

Найдено кислоты никотиновой, г (состав 1)	Валидационная оценка
0,4934	$SD = 1,44 \cdot 10^{-3}$
0,4956	$RSD = 0,59 \cdot 10^{-3}$
0,4965	$\Delta X = 1,51 \cdot 10^{-3}$
0,4939	$\epsilon = 0,305\%$
0,4945	
0,4926	

Около 3 г (точная навеска) измельченной суппозиторной массы помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 30 мл горячей депротенизированной воды, взбалтывали 20 минут, прибавляли 1 мл кислоты ортофосфорной, а затем доводили водой до метки, перемешивали и фильтровали, отбрасывая первые порции фильтрата. Полученный раствор подвергали повторной фильтрации через фторопластовый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Результаты количественного определения представлены в таблице 2.

Определение правильности методики осуществляли на трех концентрациях (70, 100, 130%). Нами были приготовлены суппозитории с содержанием кислоты никотиновой 0,3500, 0,5000 и 0,6500 г (таблица 3).

Полученный средний процент восстановления в трех проводимых концентрациях в трех повторностях

укладывается в допустимые пределы приемлемости  $100 \pm 5\%$  и для кислоты никотиновой и для пиридоксина гидрохлорида.

Для установления достоверности методики использовали вариант «введено-найденно» на пяти значениях концентраций (Таблица 4).

Прецизионность и сходимость методики проводили на спектрофотометре СФ 56 в разные дни одним и тем же специалистом на одной пробе в шести повторностях. Результаты отражены в таблице 5.

### Выводы

1. Предложен метод ВЭЖХ для количественной оценки кислоты никотиновой в суппозиториях в присутствии экстракта прополиса.

2. Подобраны оптимальные условия хроматографи-

**Таблица 3. Результаты количественного анализа суппозитория с различным содержанием кислоты никотиновой.**

Проба	Значение измеряемой величины в модельной смеси, г	Значение, найденное экспериментально	
		Абсолютная величина, г	Процент восстановления, %
<i>(содержание кислоты никотиновой, г)</i>			
1.1	0,3500	0,3447	98,49
1.2	0,3500	0,3461	98,89
1.3	0,3500	0,3458	98,80
1.4	0,5000	0,4946	98,92
1.5	0,5000	0,4961	99,22
1.6	0,5000	0,4952	99,04
1.7	0,6500	0,6438	99,05
1.8	0,6500	0,6441	99,09
1.9	0,6500	0,6439	99,06
Средний процент восстановления, %			98,95

Таблица 4. Результаты количественного определения кислоты никотиновой методом добавок

Содержание действующего вещества, г	Добавлено кислоты никотиновой, г	Содержание, г		Ошибка	
		Расчетная, г	Найденная, г	Абсолютная, %	Относительная, %
(содержание кислоты никотиновой, г)					
0,4944	0,0100	0,5044	0,4996	-0,0048	0,95%
0,4944	0,0200	0,5144	0,5098	-0,0046	0,89%
0,4944	0,0300	0,5244	0,5186	-0,0058	1,1%
0,4944	0,0400	0,5344	0,5301	-0,0043	0,80%
0,4944	0,0500	0,5444	0,5399	-0,0045	0,83

Таблица 5. Результаты количественного определения кислоты никотиновой в разные дни

Дата испытания	(содержание кислоты никотиновой, г)					
	Истинное значение определяемой величины 0,5000 г					
	Образец №	Результаты определения, %	Стандартное отклонение S	Относительное стандартное отклонение RSD, %	Критерий Стьюдента	
1-ый день	1	0,4934				таб.
	2	0,4956				
	3	0,4965				
	4	0,4939				
	5	0,4945				
	6	0,4926				
	среднее	0,4944	$1,44 \cdot 10^{-3}$	0,059	1,59	2,57
2-ой день	1	0,4956				
	2	0,4969				
	3	0,4955				
	4	0,4967				
	5	0,4968				
	6	0,4962				
	среднее	0,4963	$0,61 \cdot 10^{-3}$	0,025	2,47	2,57

рования и рассчитаны основные хроматографические параметры системы.

3. Предложенная методика апробирована для суппозиторий и проведена валидационная оценка метода по показателям правильность, достоверность, прецизионность и сходимость. ■

*Симонян Е.В., заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, доцент, кандидат фармацевтических наук, г.*

*Челябинск; Абрамовских О. С., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и КЛД ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, доктор медицинских наук, г. Челябинск; Юмагузина А. Т., очный аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и КЛД ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Абрамовских К.А., Студентка лечебного факультета ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, г. Челябинск; Автор, ответственный за перепечатку - Симонян Елена Владимировна, тел: 8-919-358-14-36, E-mail: elenasimonian@yandex.ru*

## Литература:

1. Арбатский А. П. Определение витаминных в кормовых и пищевых продуктах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А. П. Арбатский, Г. Н. Афоньпин, В. М. Востоков // Журн. аналит. химии. 2004. - № 12. - С. 1304 - 1307
2. Марютина Т. А. Жидкостная хроматография со свободной неподвижной фазой. Новый подход к созданию градиента концентраций в неподвижной фазе / Т. А. Марютина, М. А. Ракчеев // Журн. аналит. химии. 2005. - Т. 60, № 4. - С. 404-411
3. Леутский К.М. Никотиновая кислота. Витамин РР / К. М. Леутский. - Львов: Изд-во Львовского ун-та, 1980. 156с.
4. Ректальные суппозитории с никотиновой кислотой и экстрактом прополиса (патент). № 2537242; заявл. 07.05.13; опубли. 27.12.14, Бюл. 36.

5. Яшин А. И. Анализ пищевых продуктов и напитков методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и ионной хроматографии с электрохимическими детекторами / Я. И. Яшин, А. Я. Яшин // Журн. аналит. химии. 2004. – Т. 59, № 12. – С. 1237-1244
6. Шикова Ю.В. Лиходеев В.А. Алтынбаев А.М. [и др.] Структурно-механические и биофармацевтические исследования суппозиториев с оксиметилурацилом // Здоровоохранение Башкортостана. – 2002. - №2. – с. 68-70.