

РАЗРАБОТКА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО ПОЛУПРЕПАРАТИВНОГО СПОСОБА РАЗДЕЛЕНИЯ 5- МЕТОКСИПСОРАЛЕНА, 8-МЕТОКСИПСОРАЛЕНА И 5,8- ДИМЕТОКСИПСОРАЛЕНА МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Чуркин М.И., Базарнова Н.Г., Царев В.Н.

Российская Федерация, Алтайский Государственный Университет,
Институт Химии и Химико-фармацевтических Технологий

Фурукумарины — класс кислородсодержащих гетероциклических соединений, в которых фурановый цикл конденсирован с бензольным циклом кумаринового ядра линейно или ангулярно. Соединения представляют собой кристаллические вещества, бесцветные или слегка желтоватого цвета. Хорошо растворимы в органических растворителях, но малорастворимы в воде. Главные природные источники фурукумаринов — растения семейств Зонтичные, Рутовые, Тутовые и Бобовые.

Некоторые фурукумарины являются фотоактивными соединениями – при поглощении кванта света они переходят в триплетное возбужденное электронное состояние [1], позволяющие им вступать в различные химические реакции. Благодаря этому свойству, фурукумарины способны повышать чувствительность кожи к ультрафиолетовым лучам, и поэтому применяются в ПУВА-терапии – лечение витилиго и псориаза.

Из огромного количества фурукумаринов, в фармацевтической практике применяется около 20 веществ. Наиболее востребованы в ПУВА-терапии следующие фурукумарины: 5-метоксипсорален (5-МОП, бергаптен) и 8-метоксипсорален (8-МОП, ксантотоксин), 5,8-диметоксипсорален (5,8-диМОП, изопимпинеллин).

Большинство препаратов, в состав которых входят исследуемые фурукумарины, содержат их сумму, а не индивидуальные компоненты. За счет использования смеси фурукумаринов возникает риск невоспроизводимости состава препарата и, как следствие, невозможность точной оценки необходимой дозировки и ожидаемого клинического действия. Также, например, 5-метоксипсорален рекомендуется применять как перорально, так и трансдермально, однако применение 8-метоксипсоралена перорально вызывает побочные действия в виде эритемы, зуда и тошноты. Значит, выделив их из суммы веществ, будет возможность применять отдельные компоненты соответствующим способом, избежав побочных действий.

Для определения фурукумаринов в лекарственном растительном сырье и лекарственных средствах растительного происхождения, согласно ГФ РФ [2], используют три метода: высокоэффективная жидкостная хроматография, спектрофотометрия в УФ-области, флуориметрия. В настоящее время в ГФ РФ [3] рекомендован для использования метод сверхкритической флюидной

хроматографии, однако описание методик отсутствует, соответственно, требуется их разработка.

Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) – разновидность хроматографии, в которой в качестве ключевого компонента подвижной фазы применяется вещество в сверх- или окологкритическом состоянии [4]. С точки зрения применения флюида в качестве подвижной фазы в хроматографии важны его плотность, коэффициенты диффузии и вязкость.

В качестве подвижной фазы в сверхкритической флюидной хроматографии чаще всего используется диоксид углерода с различными полярными модификаторами. Обычно в качестве добавок применяют органические растворители, смешивающиеся с диоксидом углерода (низшие спирты, циклические эфиры). В качестве неподвижной фазы в СФХ используют немодифицированные силикагели либо силикагели с привитыми к поверхности различными группами – полярными неароматическими, неполярными или ароматическими.

Актуальность данной работы заключается в разработке качественного и количественного определения фурукумаринов методом СФХ. Также данный метод позволит эффективно проводить разделение суммы фурукумаринов с целью получения индивидуальных соединений, на основе которых могут быть приготовлены препараты без сопутствующих побочных действий, проявляющиеся при использовании препаратов, изготовленных на основе суммы фурукумаринов.

Целью данной работы является разработка высокоэффективного полупрепаративного СФХ-метода разделения 5-метоксипсоралена, 8-метоксипсоралена и 5,8-диметоксипсоралена, который может быть использован для накопления индивидуальных фурукумаринов.

Из литературного обзора работ [5, 6], направленных на оптимизацию СФХ-методик разделения фурукумаринов, нами выбрано для исследования три сорбента: немодифицированный силикагель, силикагель с привитыми октадецильными группами и гибридный органо-неорганический сорбент, модифицированный пентафторфенильными группами.

В ходе исследования использовали сумму фурукумаринов, выделенных из препарата “Аммифурин” производства ЗАО «Вилар» в виде кристаллов и идентифицированных методом УФ-спектроскопии.

Состав подвижной фазы при исследовании: углекислый газ, находящийся в сверхкритическом состоянии, и изопропанол, используемый в качестве модификатора.

В результате скрининга выбранных сорбентов, нами выявлено, что достаточная селективность для накопления индивидуальных компонентов в рамках полупрепаративной методики достигнута с использованием немодифицированного силикагеля. Однако величины коэффициентов удерживания являются недостаточными для использования данного сорбента в препаративной методике.

При использовании в качестве сорбента немодифицированного силикагеля, были подобраны условия: давление – 150 бар, температура – 30°C, скорость потока – 4 мл/мин, содержание соразтворителя – 2%. Исследование проводили при различных длинах волн в диапазоне от 190 до 400 нм, выбрав в качестве основной длины волны $\lambda = 250$ нм.

Идентификацию пиков на хроматограмме проводили с использованием внешнего стандарта 8-метоксипсоралена (производства SigmaAldrich). Удалось определить по времени удерживания (t_r (8-МОП) = 4,68 мин), что средний пик соответствует 8-метоксипсоралену. Идентификацию двух других пиков проводили на хроматограммах, полученных при других длинах волн.

В результате было выявлено, что порядок элюирования метоксипсораленов с немодифицированным силикагелем следующий: t_r (5-МОП) = 4,05 мин < t_r (8-МОП) = 4,68 мин < t_r (5,8-диМОП) = 5,22 мин. Коэффициенты удерживания: $k_{5-МОП} = 4,06$; $k_{8-МОП} = 4,85$; $k_{5,8-диМОП} = 5,56$.

Получен ряд хроматограмм с различной концентрацией стандарта 8-метоксипсоралена и построен калибровочный график зависимости площади пика от концентрации, позволяющий определять содержание данного компонента в смеси. По полученном графику определена концентрация 8-метоксипсоралена в смеси фурукумаринов, содержащейся в полученных кристаллах – в растворе смеси метоксипсораленов с концентрацией 0,5 мг/мл содержится 0,02 мг/мл 8-метоксипсоралена.

Литература

1. Kitamura N., Kohtani S., Nakagaki R. Molecular aspects of furocoumarin reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis // J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev. 2005. Vol. 6, p. 168–185.
2. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том III. ОФС. «Количественное определение кумаринов в лекарственном растительном сырье и лекарственных средствах растительного происхождения». [Электронное издание]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
3. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том I. ОФС. 1.2.1.2.0006.15 «Сверхкритическая флюидная хроматография». [Электронное издание]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
4. Majewski W., Valery E., Ludeman-Hombourger O. Principle and applications of supercritical fluid chromatography // J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol., 2005. Vol. 28, p. 1233–1252.
5. Desmorteux C., Rothaupt M., West C., Lesellier E. Improved separation of furocoumarins of essential oils by supercritical fluid chromatography // Journal of Chromatography A, 2009. №1216, p. 7088–7095.
6. Pokrovskii O.I., Krutikova A.A., Ustinovich K.B. et al. Preparative separation of methoxy derivatives of psoralen using supercritical-fluid chromatography // Russian Journal of Physical Chemistry, 2013. №7, p. 901–915.