

УДК 615.074:547.751/.752:547.944/.945:582.937

АНАЛІЗ ВІНКРИСТИНУ СУЛЬФАТУ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

І.Б.Демченко, А.М.Ковальова*, Н.В.Сидора*, А.М.Комісаренко*

Державна служба лікарських засобів і виробів медичного призначення

* Національний фармацевтичний університет,

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: press@ukrfa.kharkov.ua.

Ключові слова: кількісний аналіз; вінкрістину сульфат; ВЕРХ

Розроблені умови визначення вінкрістину сульфату в препараті для ін'єкцій методом ВЕРХ; умови хроматографування забезпечують високу ефективність піку вінкрістину сульфату, оптимальне значення коефіцієнту асиметрії піку і розділення вінкрістину сульфату зі спорідненими сполуками; розроблені умови визначення допоміжних речовин методом ГХ.

ANALYSIS OF VINCRISTINE SULFATIS FOR INJECTIONS

I.B.Demchenko, A.M.Kovalyova, N.V.Sidora, A.N.Komissarenko

The conditions of determination of vincristine sulfatis in preparation for injections by the method of HPLC have been working; the parameters of chromatography the high effective of peak of vincristine sulfatis, optimal significance of the coefficient assymmetric of the peak and division of vincristine sulfatis this related substances are provide; the conditions of identification of auxiliary compounds by the gas chromatography method have been devise.

АНАЛИЗ ВИНКРИСТИНА СУЛЬФАТА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ

И.Б.Демченко, А.М.Ковалева, Н.В.Сидора, А.Н.Комиссаренко

Разработаны условия определения вінкрістину сульфата в препарате для инъекций методом ВЭЖХ; параметры хроматографирования обеспечивают высокую эффективность пика вінкрістину сульфата, оптимальное значение коэффициента асимметрии пика, разделение вінкрістину сульфата с родственными соединениями; разработаны условия определения вспомогательных веществ методом ГХ.

Продовжуючи дослідження у напрямку стандартизації препаратів, що містять вінкрістин, нами були визначені параметри аналізу розчину для ін'єкцій 0,1% вінкрістину сульфату, розробленого відповідно до вимог ДФУ, I вид. та ДСТУ 64-7-2000 [1]. Для виробництва препарату використовується субстанція вінкрістину сульфату (виробництва фірми "Sunji & Co., Ltd", Китай), яка містить вінкрістину сульфату не менше 95,0 і не більше 104,0% [метил(3aR,4R,5S,5aR,10bR,13aR)-4-(ацетилокси)-3a-етил-9-((5S,7R,9S)-5-етил-5-гідрокси-9-(метоксикарбоніл)-1,4,5,6,7,8,9,10-октагідро-2H-3,7-метаноазоцикло-ундецинол[5,4-b]індол-9-іл)-6-форміл-5-гідрокси-8-метокси-3a,4,5,5a,6,11,12,13a-октагідро-1H-індолізино[8,1-cd]карбазол-5-карбоксилату сульфат].

Вінкрістин один з добре вивчених як у хімічному, так і в біологічному відношенні димерів індольних алкалоїдів, який міститься у катарантусу рожевому *Catharantus roseus* L. G. Don. (*Vinca rosea* L.) родини кутрові (барвінкові) — *Arosu-paseae* і виявляє ефективну цитостатичну дію.

Відомі ін'єкційні препарати вінкрістину сульфату містять як допоміжні речовини, в одному випадку, метилпарабен та пропілпарабен як стабілізатори (виробництва "Teva, Teva Pharmaceuti-

cal Industries Ltd." — Ізраїль); у другому — лактозу та окремо додається розчинник, який містить 0,9% розчин натрію хлориду, 0,9% бензиловий спирт та воду для ін'єкцій (виробництва "ЛЭНС-Фарм" — Росія). Проте ці препарати нестійкі і мають короткий строк зберігання.

Схема приготування розробленого нами вінкрістину сульфату розчину для ін'єкцій 0,1% полягає у тому, що в асептичних умовах натрію метабісульфат і лимонну кислоту послідовно поміщали у реактор і розчиняли у воді для ін'єкцій при ретельному перемішуванні. В окремій ємності розчиняли бензиловий спирт у пропіленгліколі і отриманий розчин передавали у реактор. Вміст реактора ретельно перемішували і доводили об'єм розчину у реакторі водою для ін'єкцій, фільтрували, розливали по 1 мл в ампули і запаювали. Розчин 0,1% вінкрістину сульфату для ін'єкцій — безбарвна або злегка жовтувата прозора рідина. Ампула має такий склад: вінкрістину сульфату — 0,0010 г (вміст основної речовини фірми "Sunji & Co., Ltd", Китай у перерахуванні на 100%); натрію метабісульфату — 0,0010 г (ДФУ, вид.1, с. 420); лимонної кислоти — 0,0006 г (ГОСТ 908-79 Е); спирту бензилового — 0,0100 г; (ГОСТ 8751-77 ч.д.а.); пропіленгліколю — 0,9000 г (ТФС 42У-

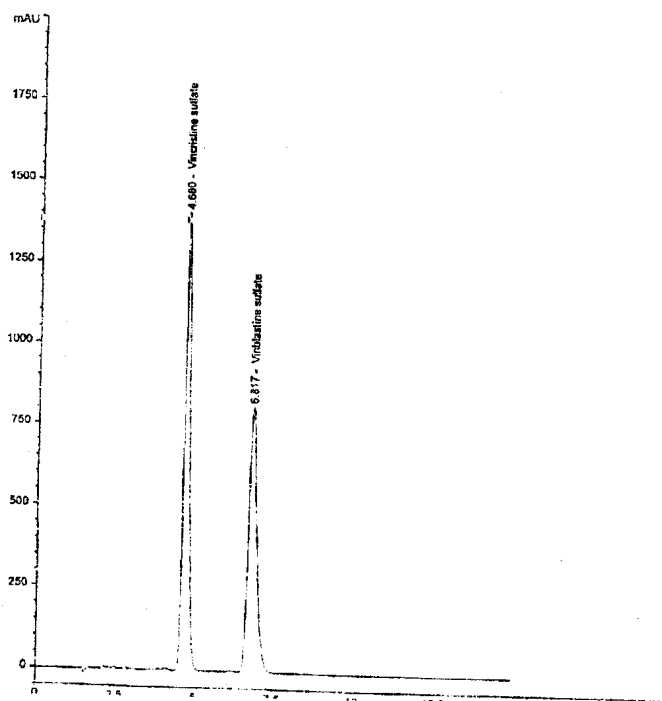


Рис. 1. Хроматограма розчину для перевірки розподільної здатності хроматографічної системи.

1594-86); води для ін'єкцій — до 1 мл (ФС 42-2620-89). Саме такий підбір допоміжних речовин створює умови для тривалого зберігання препарату, захищає його від руйнування [2].

Тому актуальним було завдання розробки аналітичних методів аналізу розробленого препарату.

Метою представленої роботи є розробка умов ідентифікації та кількісного визначення вінкрис-

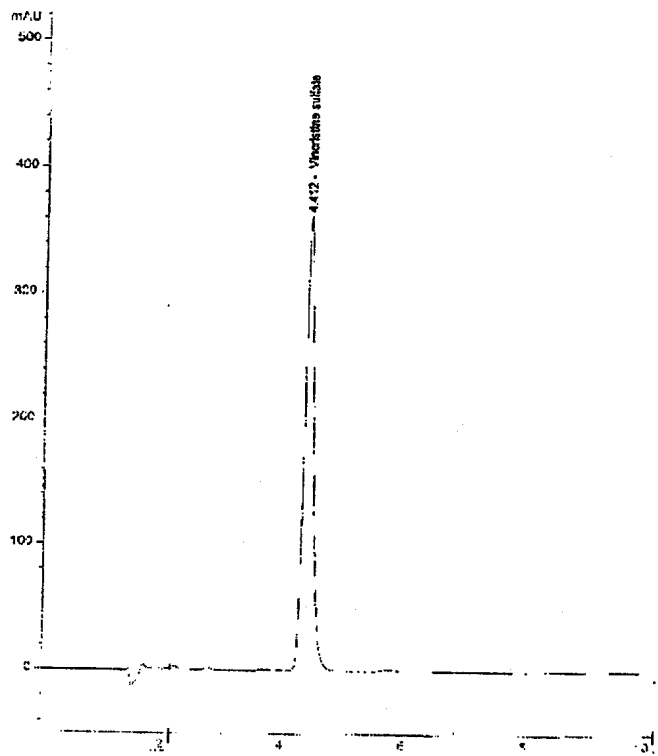


Рис. 2. Хроматограма випробовуваного розчину.

ну сульфату та допоміжних речовин в розробленій нами ін'єкційній формі.

Високочутливими та надійними методами аналізу індивідуальних біологічно активних речовин, їх сумішей, субстанцій, препаратів є вискоэффективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), а також газорідинна хроматографія (ГРХ) та газова хроматографія (ГХ), які широко застосовуються у наукових лабораторіях і в умовах фармацевтичних підприємств [3-5]. Методом ВЕРХ визначають вінкрисдин і вінбластин у присутності інших алкалоїдів (катарантину, серпентину, таберзоніну, віндоліну) в різних органах, в культурі клітин і тканин *Catharantus*; як внутрішні стандарти використовують вінбластин, папаверин та інші алкалоїди [6-11].

В результаті дослідження встановлено, що розроблені умови аналізу вінкрисдину сульфату в ін'єкційній формі придатні для ідентифікації та кількісного визначення вінкрисдину сульфату та допоміжних речовин.

Обрані умови хроматографування забезпечують повний поділ хроматографічних зон спирту бензилового, пропіленгліколю і 1,3-бутандіолу, який використовується як внутрішній стандарт. Час утримання основного піку вінкрисдину сульфату на хроматограмі випробовуваного розчину повинен співпадати з часом утримання піку вінкрисдину сульфату на хроматограмі розчину стандартного зразка, приготовленого для кількісного визначення, з точністю $\pm 2\%$. Піки з часом утримання менше 2,5 хв (системні піки і піки, що відносяться до розчину "плацебо") на хроматограмі випробовуваного розчину нами не враховані.

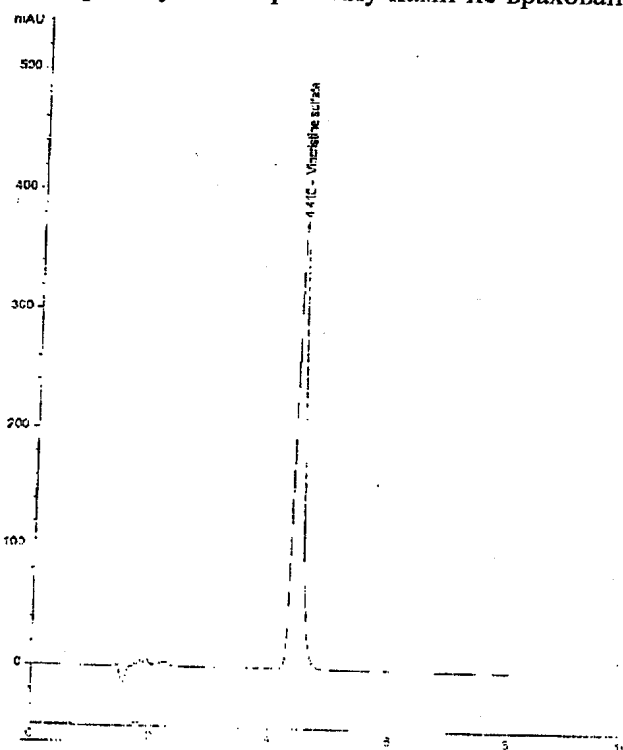


Рис. 3. Хроматограма розчину СЗ вінкрисдину сульфату при кількісному визначенні.

Таблиця 1

Результати визначення вінкристину сульфату в розчині для ін'єкцій (n=5, α=0,95)

Вміст вінкристину сульфату в розчині для ін'єкцій, мг/мл	Знайдено вінкристину сульфату в розчині для ін'єкцій, мг/мл	Метрологічні характеристики
1,010	1,002	$\bar{X} = 1,0138$ $S_x = 0,44 \cdot 10^{-4}$ $S_x^2 = 0,297 \cdot 10^{-2}$ $\Delta \bar{X} = \pm 0,83 \cdot 10^{-3}$ $\epsilon = \pm 0,82\%$
1,010	1,016	
1,010	1,018	
1,010	1,017	
1,010	1,016	

Таблиця 2

Результати кількісного визначення спирту бензилового (n=5, α=0,95)

Вміст спирту бензилового в розчині для ін'єкцій, г/мл	Знайдено спирту бензилового в розчині для ін'єкцій, г/мл	Метрологічні характеристики
0,01007	0,00994	$\bar{X} = 0,01007$ $S_x = 0,987 \cdot 10^{-8}$ $S_x^2 = 0,444 \cdot 10^{-4}$ $\Delta \bar{X} = \pm 0,124 \cdot 10^{-3}$ $\epsilon = \pm 1,23\%$
0,01007	0,01002	
0,01007	0,01008	
0,01007	0,01009	
0,01007	0,01021	

Для перевірки розподільної здатності системи в даний тест увели перевірку розділення піків вінкристину сульфату та вінбластину сульфату. Ступінь розділення їх піків повинен бути не менше 4,0 (рис. 1).

Спирт бензиловий і пропіленгліколь визначали методом газової хроматографії, їх ідентифікували з хроматограм, отриманих при кількісному їх визначенні: відносний час утримування піків повинен співпадати з відносним часом утримування піків цих компонентів на хроматограмі розчину порівняння, приготовленого для їх кількісного визначення, і становити близько 0,73 для спирту бензилового та близько 1,47 для пропіленгліколю. Час утримування 1,3-бутандіолу (внутрішній стандарт) приймали за одиницю.

На рис. 2 та 3 представлені хроматограми випробовуваного розчину і розчинів А стандартного

Таблиця 3

Результати кількісного визначення пропіленгліколю (n=5, α=0,95)

Вміст пропіленгліколю в розчині для ін'єкцій, г/мл	Знайдено пропіленгліколю в розчині для ін'єкцій, г/мл	Метрологічні характеристики
0,9005	0,8926	$\bar{X} = 0,90152$ $S_x = 0,482 \cdot 10^{-4}$ $S_x^2 = 0,311 \cdot 10^{-2}$ $\Delta \bar{X} = \pm 0,86 \cdot 10^{-2}$ $\epsilon = \pm 0,96\%$
0,9005	0,8982	
0,9005	0,9024	
0,9005	0,9029	
0,9005	0,9115	

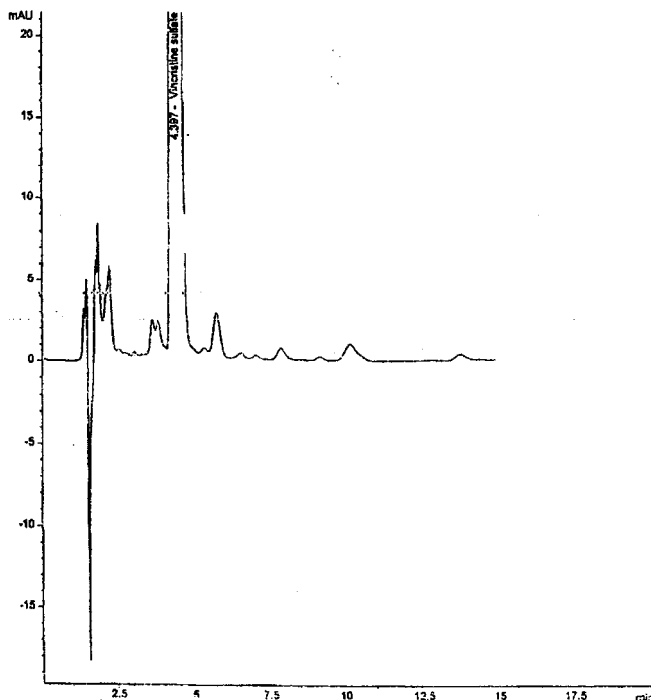


Рис. 4. Хроматограма випробовуваного розчину при визначенні супровідних домішок.

зразка (СЗ) вінкристину сульфату. Межі вмісту вінкристину сульфату в 1 мл препарату повинні знаходитися в інтервалі $\pm 10\%$ від зазначеного у складі і мати значення від 0,0009 до 0,0011 г/мл.

Достовірність результатів перевіряли методом математичної статистики, метрологічну характеристику визначення представлено у табл. 1.

Графік лінійної залежності площі піку вінкристину сульфату від його концентрації у розчині представлений на рис. 7.

Вміст спирту бензилового і пропіленгліколю у препараті проводили методом газорідинної хроматографії (рис. 4).

Допустимі межі вмісту спирту бензилового в 1 мл препарату повинні знаходитися в інтервалі $\pm 10\%$ та пропіленгліколю $\pm 5,6\%$ від зазначеного у складі.

Достовірність результатів перевіряли методом математичної статистики (табл. 2 та 3).

Вміст бензальдегіду у препараті обчислювали з хроматограм випробовуваного розчину, отриманого при кількісному визначенні спирту бензилового. Відносний час утримання бензальдегіду становить 1,54; час утримання 1,3-бутандіолу (внутрішній стандарт) приймали за одиницю. Вміст бензальдегіду у препараті не повинен перевищувати 0,05%. Межу вмісту бензальдегіду в препараті встановлено експериментально шляхом дослідження даної домішки протягом терміну зберігання препарату.

Визначення на прозорість, забарвлення, сульфати, цитрати та натрій проводили відповідно до

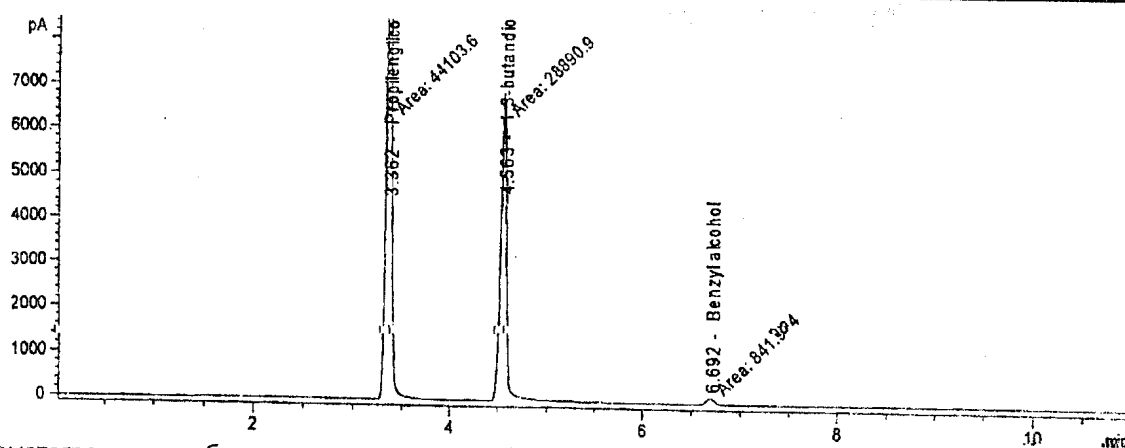


Рис. 5. Хроматограма випробовуваного розчину при кількісному визначенні.

ДФУ. Значення рН розчину, яке визначали потенціометрично за ДФУ, повинно бути в межах від 3,5 до 5,5. Об'єм заповнення ампули препаратом визначали відповідно до вимог ДФУ, який повинен бути не менше 1,0 мл.

Експериментальна частина

Для ідентифікації вінкристину сульфату використовували хроматограму, отриману на рідинному хроматографі при кількісному визначенні препарату. Для цього 5 мл препарату поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл, доводили об'єм розчину водою до позначки і перемішували (метод ВЕРХ відповідно до вимог ДФУ 1 вид. та на основі статті Європейської фармакопеї 01/2002:0749). По 20 мкл одержаного розчину, розчину порівняння А вінкристину сульфату і розчину для перевірки розподільної здатності хроматографічної системи поперемінно хроматографували на рідинному хроматографі з УФ-детектором, одержуючи не менше 5 хроматограм для кожного з розчинів у таких умовах. Визначення проводили на колонці "Eclipse XDB-C8" розміром 150x4,6 мм з розміром часток 5 мкм з використанням УФ-детектора. Як рухоми фазу використовували суміш — метанол-розчин діетиламіну (70:30), дегазовану будь-яким зручним способом; температура колонки — 20°C; швидкість рухоми фазу — 1,0 мл/хв; детектування проводили за довжини хвилі 297 нм. Вміст

вінкристину сульфату (X_1) у 1 мл препарату, г, обчислювали за формулою:

$$X_1 = \frac{S_1 \times m_0 \times 25 \times P \times (100 - W)}{S_2 \times 100 \times 5 \times 100 \times 100} = \frac{S_1 \times m_0 \times P \times (100 - W)}{S_2 \times 200000}$$

де: S_1 — середнє значення площі піку вінкристину сульфату, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

S_2 — середнє значення площі піку вінкристину сульфату, розраховане з хроматограми розчину порівняння А вінкристину сульфату;

m_0 — маса наважки стандартного зразка (СЗ) вінкристину сульфату, г;

P — вміст основної речовини вінкристину сульфату в СЗ вінкристину сульфату, %;

W — втрата в масі при висушуванні в СЗ вінкристину сульфату, %.

Вміст $C_{46}H_{59}N_4O_{14}S$ (вінкристину сульфату) у 1 мл препарату повинен складати від 0,0009 г до 0,0011 г.

Визначення супровідних домішок у препараті проводили методом ВЕРХ на рідинному хроматографі з УФ-детектором відповідно до вимог ДФУ.

Кількісне визначення спирту бензилового і пропіленгліколю. 5,0 мл препарату поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл, доводили об'єм розчину водою P до позначки і перемішували. 2 мл одержаного розчину поміщали у колбу з притертою пробкою ємністю 5 мл, додавали 2 мл розчину

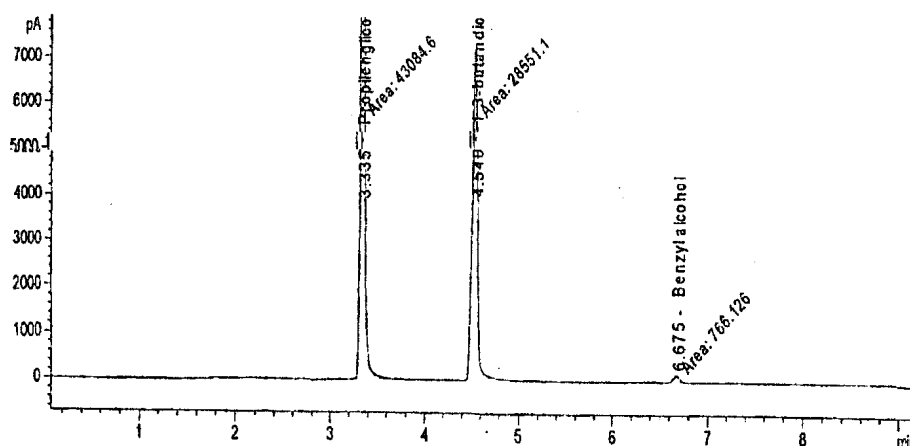
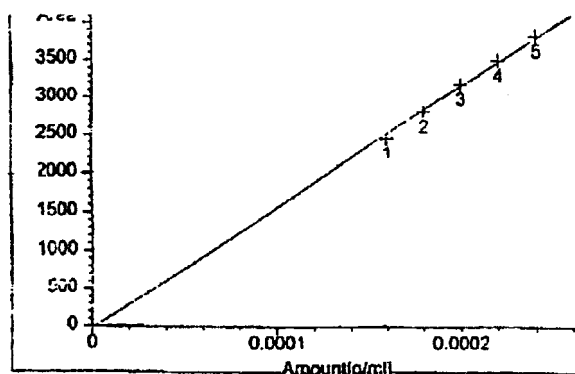


Рис. 6. Хроматограма розчину СЗ спирту бензилового і пропіленгліколю при кількісному визначенні.



Vincristin at exp. R²: 5.042
 DAD1 A, Sig=297,16 Ref=off
 Correlation: 0.99957
 Residual Std. Dev.: 45.00551
 Formula: y = mx + b
 m: 1.59446e7
 b: -24.69483
 x: Amount [g/ml]
 y: Area

Рис. 7. Графік залежності площі піку вінкрістину сульфату від його концентрації у розчині.

1,3-бутандіолу (внутрішній стандарт) і перемішували. По 1 мкл одержаного розчину і розчину порівняння СЗ спирту бензилового і пропіленгліколю поперемінно хроматографували на газовому хроматографі з полуменево-іонізаційним детектором, одержуючи не менше 5 хроматограм кожного розчину (рис. 5, 6).

Виконувались такі умови: колонка капілярна кварцова HP INNOWAX фірми "Hewlett Packard", США (каталожний номер HP19095 N-123) розміром 30 м x 0,53 мм; нерухома фаза — (поліетиленгліколь Р), товщина шару 1 мкм; температура термостату колонки програмується 170°C протягом 1 хв, підвищення температури зі швидкістю 10°C за хвилину до температури 180°C, витримували протягом 10 хв; — об'ємна швидкість газуносія (гелій для хроматографії Р) — 3 мл/хв; — температура випарника і детектора — 220°C; — розподіл потоку 1:10. Вміст спирту бензилового або пропіленгліколю (X_{2,3}) у 1 мл препарату, г, обчислювали за формулою:

$$X_{2,3} = \frac{B_1 \times m_0 \times 2 \times 25 \times 2}{B_0 \times 25 \times 2 \times 5 \times 2} = \frac{B_1 \times m_0}{B_0 \times 5}$$

де: B₁ — середнє значення відносин площ піків спирту бензилового або пропіленгліколю до площ піків 1,3-бутандіолу (внутрішній стандарт), розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

B₀ — середнє значення відносин площ піків спирту бензилового або пропіленгліколю до площ піків 1,3-бутандіолу (внутрішній стандарт), розраховане з хроматограм розчину порівняння спирту бензилового і пропіленгліколю;

m₀ — маса наважки спирту бензилового або пропіленгліколю у розчині порівняння спирту бензилового і пропіленгліколю, г.

Вміст С₇H₈O (спирту бензилового) у 1 мл препарату має бути від 0,009 до 0,011 г. Вміст С₃H₆(ОН)₂ (пропіленгліколю) у 1 мл препарату має бути від 0,850 до 0,950 г.

При розробці методики використовували газовий хроматограф фірми "Hewlett Packard", США.

Висновки

1. Розроблені умови хроматографування методом ВЕРХ забезпечують:

— високу ефективність піку вінкрістину сульфату;

— оптимальне значення коефіцієнту асиметрії піку і достатнє розділення вінкрістину сульфату зі спорідненими сполуками.

2. Підібрані умови для визначення методом ГХ допоміжних речовин.

3. Запропонована методика визначення вінкрістину сульфату дозволяє проводити його визначення з достатньою точністю.

Література

1. Демченко І.Б., Ковальова А.М. // Вісник фармації. — 2004. — №3 (39). — С. 13-16.
2. Патент 67600 А. Україна / С.М.Комісаренко, І.Б.Демченко, М.М.Тимченко та ін. // Бюл. №6. — Мін. освіти і науки. — 15.06.04.
3. Державна фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
4. European Pharmacopoeia 2002, Suppliment. — 4th Ed. Council of Europe. — Strasbourg: EDQM, 2001. — 2416 p.
5. Государственная фармакопея СССР: Вып.1. Общие методы анализа / МЗ СССР. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.
6. Волков С.К. // Хим.-фарм. журн. — 1996. — Т. 30, №3. — С. 58-62.
7. Bowman R.N., Gerber E., Terry M.E. // Pittsburgh Conf. Presents PITTCON'96, Chicago, III., March 3-8, 1996: Book Abstr. — [(Chicago (III.)), 1996. — 550 p.
8. Auriola S., Naaranlahti T., Kostianen R., Lapinjoki S.P. // Biomed. Environ. Mass Spectrom. — 1990 Jul. — 19 (7). — P. 400-404.
9. Renault J.H., Nuzillard J.M., Le Crouaerour G. et al. // J. Chromatogr. A. — 1999 Jul. — Vol. 23, №849 (2). — P. 421-431.
10. Pennanen S., Huhtikangas A. // Photochem. Photobiol. — 1990 May. — 51 (5). — P. 515-518.
11. Tikhomiroff C., Jolicoeur M. // J. Chromatogr. A. — 2002. — Vol. 955, №1. — P. 87-93.

Надійшла до редакції 15.07.2005 р.