УДК 543.42.062; 615.03

1 – Министерство здравоохранения Республики Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении», 220037, Республика Беларусь, г. Минск, Товарищеский переулок, 2а

2 – Белорусский государственный технологический университет, 220006, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Свердлова, 13а

1 – The Ministry of Health of the Republic of Belarus, Republican Unitary Enterprise «Centre for Expertise and Testing in Health Care», 2a, Tovarishesky Lane, Minsk, 220037, Republic of Belarus

2 – Belarusian State Technological University, 13a, Sverdlova str., Minsk, 220006, Republic of Belarus

*** адресат для переписки:**
E-mail: katedubodelova@tut.by
Тел.: (+37529) 501 43 61

КОМПЛЕКСНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.Ю. Рымашевская[1], Е.В. Дубоделова[2]*, В.В. Горжанов[2]

Резюме. Исследована возможность комплексного количественного определения пиридоксина гидрохлорида, тиамина гидрохлорида, цианокобаламина, лидокаина гидрохлорида, бензилового спирта в лекарственном средстве «Витагамма, раствор для внутримышечного введения в ампулах по 2 мл в упаковке №5×2» методом ВЭЖХ. Рекомендовано использование 0,1 М раствора ортофосфата натрия с величиной pH, равной 5, в качестве буферного раствора и введение ион-парного агента – 0,001 М натрия пентансульфаната. Осуществлен выбор условий для хроматографического определения действующих веществ: градиент концентрации органического растворителя (ацетонитрил) – от 2 до 60%; хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse Plus C8, 3,0×150 мм, 3,5 мкм; температура колонки – 30 °С; скорость подвижной фазы – 0,6 мл/мин; длина волны спектрофотометрического детектора – 245 нм; объем пробы – 20 мкл.

Ключевые слова: мультивитаминные комплексы, водорастворимые витамины, высокоэффективная жидкостная хроматография, буферный раствор, ион-парный агент, методика выполнения измерений.

DETERMINATION OF WATER-SOLUBLE VITAMINS USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

A.U. Rumascheuskaia[1], K.V. Dubodelova[2]*, V.V. Gorzhanov[2]

Abstract. This paper considers the possibility to comprehensive quantification of pyridoxine hydrochloride, thiamine hydrochloride, cyanocobalamin, lidocaine hydrochloride, benzyl alcohol are selected of "Vitagamma solution for intramuscular injection in ampoules of 2 ml per pack №5×2" drug by HPLC method. The expediency of using 0.1 M sodium orthophosphate solution with pH level equal to 5 as a buffer solution and introduction of 0.001 M sodium pentansulfonat as an ion pair agent is proved. The conditions for chromatographic determination of active ingredients in the drug are selected: a gradient of concentration of the organic solvent (acetonitrile) from 2 to 60%; chromatographic column ZORBAX Eclipse Plus C8, 3.0×150 mm, 3.5-Micron; column temperature 30 °C; mobile phase velocity of 0.6 ml/min; spectrophotometric detector wavelength of 245 nm; sample volume of 20 ul.

Keywords: multivitamin complexes, water-soluble vitamins, high-performance liquid chromatography, buffer solution, ion pair agent, measurement method.

ВВЕДЕНИЕ

Контроль качества лекарственных средств является важной составляющей системы обеспечения безопасности при производстве фармацевтической продукции. Одним из главных показателей, по которым контролируется качество лекарственных средств (ЛС), является количественное содержание в них действующих веществ.

В качестве объекта исследований были выбраны мультивитаминные комплексы. Они представляют собой комплексные препараты, включающие необходимые каждому человеку ежедневно водо- и жирорастворимые витамины. Важной характеристикой мультивитаминных комплексов является наличие в их составе ингредиентов в соответствующих, рекомендованных дозировках, поскольку они предназначены для безрецептурного отпуска. Также важна полнота перечня элементов, входящих в состав комплекса.

В настоящих исследованиях анализ мультивитаминных комплексов проводился на примере ЛС «Витагамма, раствор для внутримышечного введения в ампулах по 2 мл в упаковке №5×2», производитель СО-АО «Ферейн» (далее – ЛС «Витагамма»), который применяется при неврологических заболеваниях, обусловленных доказанным дефицитом витаминов B_1, B_6 и B_{12}, и в качестве вспомогательного средства для симптоматической терапии заболеваний нервной системы различного происхождения [1].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Согласно техническим нормативным правовым актам (ФСП 1779-13) на ЛС «Витагамма» для определения действующих веществ рекомендовано проводить четыре анализа методом высокоэффективной

жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Это обусловлено использованием разных буферных растворов, необходимых для разделения компонентов с подбором для каждого анализа условий хроматографирования. Поэтому процедура определения является длительной и дорогостоящей, что обусловило поиск способов комплексного определения всех действующих веществ в ЛС.

Для этого была проведена разработка и валидация методики комплексного определения количественного содержания действующих веществ в ЛС «Витагамма». Состав данного ЛС приведен в таблице 1.

Таблица 1.

Состав лекарственного средства «Витагамма» на 1 ампулу

Название компонента ЛС	Количество компонента, мг	ТНПА
Тиамина гидрохлорид (B_1), DSM Nutritional Products Ltd., Швейцария / DSM Nutritional Products GmbH, Германия	100,0	НД РБ 0381С
Пиридоксина гидрохлорид (B_6), Shanghai Chenfu Chemical Co., Ltd., Китай	100,0	НД РБ 0180С
Цианокобаламин (B_{12}), North China Pharmaceutical Victor Co., Ltd., Китай	1,0	НД РБ 0374С
Лидокаина гидрохлорид, Dishman Pharmaceuticals & Chemicals Ltd, Индия	20,0	НД РБ 0340С
Бензиловый спирт	40,0	СТП-12
Натрия полифосфат	20,0	СТП-07
Калия феррицианид	0,2	СТП-08
Натрия гидроксид	12,0	ГФ РБ т. 2 стр. 210
Вода для инъекций	до 2	ГФ РБ т. 2 стр. 95

Существует большое количество способов определения пиридоксина гидрохлорида, тиамина гидрохлорида, цианокобаламина, лидокаина гидрохлорида, бензилового спирта в ЛС (таблица 2).

Как видно из таблицы 2, общими методами для количественного определения основных действующих веществ ЛС «Витагамма» являются спектрофотометрический и ВЭЖХ-метод. Остальными методами можно определить 2–3 компонента, но для полного анализа всего состава основных действующих веществ эти методы не могут быть применимы [2–4]. После сравнения метрологических характеристик методов ВЭЖХ и спектрофотометрии можно отметить, что оба метода являются эффективными для анализа рассматриваемого ЛС. Но, несмотря на большую стоимость и относительно высокую погрешность определения, в настоящее время предпочтение отдается ВЭЖХ-анализу, так как этот метод обладает высокой воспроизводимостью и позволяет определять малые количества вещества, что обуславливает его точность [5].

Таблица 2.

Методы количественного определения пиридоксина гидрохлорида, тиамина гидрохлорида, цианокобаламина, лидокаина гидрохлорида, бензилового спирта в ЛС

Метод	Тиамин (B_1)	Пиридоксин (B_6)	Цианокобаламин (B_{12})	Лидокаин
Титриметрия	+	+	–	+
Спектрофотомерия	+	+	+	+
Колориметрия	+	+	–	–
ВЭЖХ	+	+	+	+
Электрофорез	+	+	–	–
Флуориметрия	+	+	–	–
Потенциометрия	+	+	–	–

Согласно справочнику «The essential chromatography & spectroscopy catalog LC and LC/MS» разделить смесь витаминов группы В можно, используя буферный 0,1 М раствор ортофосфата натрия с pH=2,5 с градиентом концентрации органического растворителя от 2% до 60%. Для более корректного разделения пиков тиамина и пиридоксина при их совместном нахождении в растворе рекомендуется добавлять в буферный раствор ион-парный агент.

Вещества лидокаинового ряда также можно разделить при помощи 0,1 М буферного раствора ортофосфата натрия (№ 342483 из каталога Sigma-Aldrich), но значение pH раствора должно быть равным 4. В этой системе лидокаина гидрохлорид (№ L5647 из каталога Sigma-Aldrich) обнаруживается при содер-

жании в подвижной фазе 30–40% органического растворителя.

Бензиловый спирт (№ 80708 из каталога Sigma-Aldrich) можно обнаружить, используя любой фосфатный буфер со значением pH=4–6. Главное условие его определения – длина волны спектофотометрического детектора в диапазоне от 240 до 250 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основании поисковых исследований и рекомендаций, приведенных выше, было принято решение использовать один буферный раствор – 0,1 М раствор ортофосфата натрия с добавлением 0,001 М натрия пентансульфоната (ион-парный агент) (№ 221538 из каталога Sigma-Aldrich), pH раствора – 5.

Также были подобраны следующие условия для хроматографического определения всех компонентов ЛС «Витагамма», которое готовили путем помещения 2,0 мл ЛС в мерную колбу вместимостью 100 мл с прибавлением 60 мл воды для хроматографии Р, последующим перемешиванием и доведением объема раствором воды для хроматографии Р до метки:

– градиент концентрации органического растворителя (ацетонитрил, № 271004 из каталога Sigma-Aldrich) – от 2 до 60%;

– хроматографическая колонка ZORBAX Eclipse Plus C8, 3,0×150 mm, 3,5-Micron;

– температура колонки – 30 °С;

– скорость подвижной фазы – 0,6 мл/мин;

– длина волны спектрофотометрического детектора – 245 нм;

– объем пробы – 20 мкл.

Исследования были проведены на хроматографе жидкостном Agilent 1100 с УФ-детектором системой регистрации, обработки и хранения информации.

Методика разрабатывалась с учетом требований ТКП 432 «Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний».

Важной составляющей процесса разработки методики являлось изучение стабильности растворов витаминов, так как совместное определение нескольких компонентов – процесс более длительный, чем анализ каждого из индивидуальных веществ. Исходя из того, что достоверные результаты можно получить, усредняя значения 3–5 заколов, можно сделать вывод, что максимальное время одного закола должно варьироваться в диапазоне 48–80 мин. Изучение стабильности растворов витаминов производилось путем анализа растворов сравнения (РСО) и испытуемых растворов согласно рекомендуемым ФСП №1779-13 методикам

Хроматограф жидкостной Agilent 1260 Infinity II пришел на смену с производства Agilent 1100

количественного определения действующих веществ. Анализ растворов проводился в течение первых 4 ч после их приготовления. Определение стабильности растворов проводилось путем сравнения площадей пиков компонентов на их хроматограммах. Установлено, что РСО тиамина гидрохлорида («Хромлаб», Россия), цианокобаламина («Хромлаб», Россия), лидокаина гидрохлорида, бензилового спирта обладали стабильностью в течение 4 ч, так как разброс средних значений площадей пиков не превышал ±20%.

Раствор сравнения отвечал следующим требованиям: в состав входили те же компоненты, что и в ЛС; концентрация РСО в растворе была такая же, как и в испытуемом растворе (таблица 1); масса навески РСО была не менее 20,0 мг. Результаты исследований показали, что растворы РСО следует готовить, руководствуясь следующими рекомендациями.

Приготовление раствора 1: 100,0 мг РСО тиамина гидрохлорида и 100,0 мг РСО пиридоксина гидрохлорида («Хромлаб», Россия) необходимо внести в мерную колбу объемом 100,0 мл, добавить 20 мл подвижной фазы, довести объем раствора подвижной фазой до метки и перемешать.

Приготовление раствора 2: 20,0 мг РСО лидокаина гидрохлорида и 40,0 мг РСО бензилового спирта необходимо внести в мерную колбу объемом 50,0 мл. К смеси РСО необходимо добавить 15 мл раствора 1. Полученный раствор довести до метки раствором 1 и перемешать.

Приготовление раствора 3: 20,0 мг РСО цианокобаламина необходимо внести в мерную колбу объемом 100,0 мл и добавить 20 мл подвижной фазы. Полученную смесь перемешать до полного растворения навески. После этого необходимо объем раствора довести до метки и перемешать. Далее следует отобрать 5,0 мл полученного раствора и перенести его в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, довести объем раствора подвижной фазой до метки и перемешать.

Для получения раствора сравнения нужно смешать 10,0 мл раствора 2 и 10,0 мл раствора 3.

После приготовления раствора сравнения был проведен хроматографический анализ в условиях, описанных выше. Полученная хроматограмма приведена на рисунке 1.

Для идентификации пиков, наблюдаемых на хроматограмме (рисунок 1), были использованы спектры индивидуальных веществ, полученные при изучении стабильности ЛС. Анализ данных спектров показал, что первым компонентом является пиридоксина гидрохлорид, вторым – тиамина гидрохлорид, третьим – цианокобаламин, четвертым – лидокаина гидрохлорид, а пятым – бензиловый спирт.

Статистической обработке подвергали 5 хроматограмм раствора сравнения. Она показала, что среднее время выхода для пика 1 составляет 3,76 мин, для пика 2 – 6,70 мин, для пика 3 – 11,37 мин, для пика 4 – 13,35 мин и для пика 5 – 14,71 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора (рисунок 2) также наблюдалось 5 пиков, что свидетельствует о том, что все компоненты ЛС можно идентифицировать в заданных условиях.

Статистическая обработка 5 хроматограмм испытуемого раствора показала, что среднее время выхода для пика 1 составляет 3,62 мин, для пика 2 – 6,61 мин, для пика 3 – 11,05 мин, для пика 4 – 12,95 мин и для пика 5 – 14,24 мин.

Из представленных хроматограмм (рисунки 1 и 2) видно, что все компоненты легко идентифицируются, а время выхода исследуемых компонентов совпадает.

Далее был произведен расчет количественного содержания действующих веществ в ЛС «Витагамма». Согласно ФСП 1779-13 количественное содержание тиамина гидрохлорида должно находиться в пределах от 45,0 до 62,5 мг/мл, пиридоксина гидрохлорида – от 47,5 до 52,5 мг/мл, цианокобаламина – от 0,450 до 0,625 мг/мл, лидокаина гидрохлорида – от 9,5 до 10,5 мг/мл, бензилового спирта – от 19,0 до 21,0 мг/мл. Результаты определения, полученные после обработки 5 хроматограмм ЛС, приведены в таблице 3.

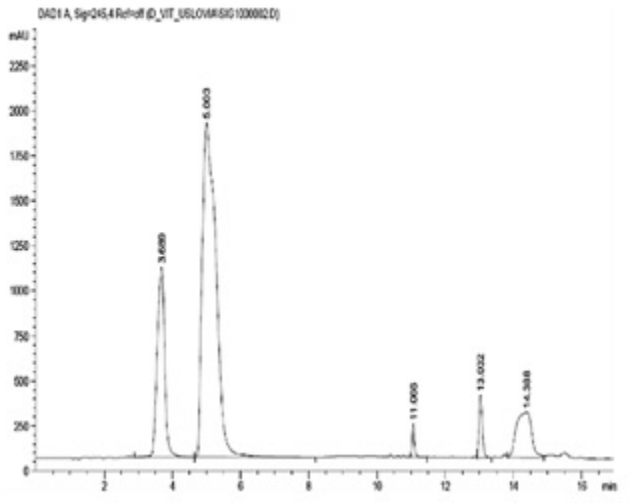

Рисунок 1. Хроматограмма раствора сравнения

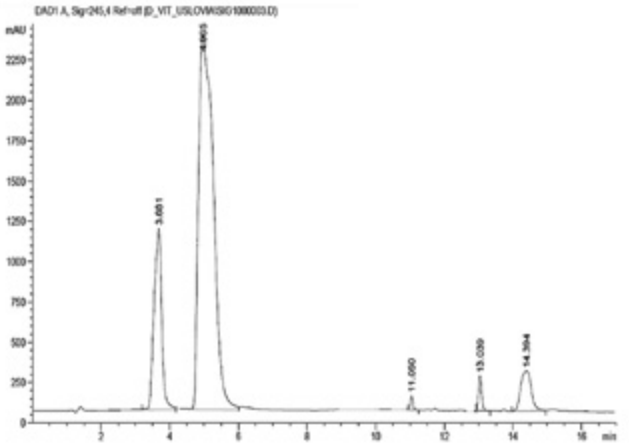

Рисунок 2. Хроматограмма испытуемого раствора

Как видно из таблицы 3, количество всех определяемых веществ находилось в пределах обнаружения.

Согласно ТКП 432 и ТКП 438 был проведен комплекс необходимых испытаний и рассчитаны основные валидационные характеристики разрабатываемой методики: повторяемость; точность, включая сходимость и внутрилабораторную воспроизводимость; линейность; правильность и диапазон применения.

Результаты расчета повторяемости приведены в таблице 4.

Сходимость разработанной методики подтверждена испытаниями образца готового ЛС «Витагамма». Получены значения среднеквадратичного отклонения (СКО) для каждого компонента лекарственного средства: пиридоксина гидрохлорида – 0,33; тиамина гидрохлорида – 0,51; цианокобаламина – 0,96; лидокаина гидрохлорида – 0,86,

Таблица 3.

Количественное содержание действующих веществ в ЛС «Витагамма»

№ хроматограммы	Компонент				
	Пиридоксина гидрохлорид	Тиамина гидрохлорид	Цианокобаламин	Лидокаина гидрохлорид	Бензиловый спирт
1	51,50	54,86	0,56	10,17	19,72
2	52,31	54,42	0,54	9,65	19,71
3	52,11	53,51	0,56	9,77	19,59
4	51,65	53,20	0,57	10,08	20,22
5	51,43	53,25	0,58	10,10	20,13

бензилового спирта – 0,52. Данные значения удовлетворяют критериям приемлемости и не превышают 1%. Воспроизводимость методики подтверждена испытаниями в условиях внутрилабораторной воспроизводимости. Критерий Стьюдента для пиридоксина гидрохлорида составил 2,902; для тиамина гидрохлорида – 3,774; для цианокобаламина – 2,826; для лидокаина гидрохлорида – 0,759, для бензилового спирта – 1,210, что меньше табличного значения, равного 4,3. Полученные значения относительных стандартных отклонений также удовлетворяют критерию приемлемости и не превышают 1%. Линейность методики подтверждена испытаниями и расчетами в пределах требуемого диапазона применения – 80–120% содержания действующих веществ от их номинального количества. Правильность методики подтверждена испытаниями и расчетами в пределах требуемого диапазона – 90–110% содержания действующих веществ от их номинального количества. Установлено, что разработанная методика удовлетворяет критериям правильности, поскольку смещение результатов измерения, отнесенное к абсолютному СКО среднего значения, не превышает значение критерия Стьюдента t(0,95;5)=2,57, а процент восстановления для каждого из определяемых веществ находится в диапазоне от 95 до 105%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанная методика прошла процедуру подтверждения пригодности, следовательно, она может быть предложена к использованию заводам-производителям мультивитаминных комплексов, в составе которых используются пиридоксина гидрохлорид, тиамина гидрохлорид, цианокобаламин, лидокаина гидрохлорид, бензиловый спирт, и аналитическим лабораториям, которые занимаются контролем качества лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ю.А. Овчинников. Витамины. Биоорганическая химия. – М: Просвещение, 1987. 668 с.
2. А.И. Лутцева. Анализ и стандартизация водорастворимых витаминов // Фармация. 1998. Т. 47. № 5. С. 22–29.
3. И.В. Власова. Определение водорастворимых витаминов в премиксах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Заводская лаборатория. 2007. Т. 73. № 9. С. 25–27.
4. R.T. Sane, U.A. Ghorpade. Colorimetric estimation of vitamin B, pharmaceutical preparations // Acta vitaminol et enzymol. 1983. V. 5. №. 1. P. 29–34.
5. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии / Под ред. В.Ф. Селеменева – Воронеж: Водолей, 2004. 528 с.

Таблица 4.

Результаты расчета повторяемости

Компонент	Результаты определения количественного содержания компонента							СКО
	1	2	3	4	5	6	Среднее	
Пиридоксина гидрохлорид	51,50	52,31	52,40	51,65	51,43	52,05	51,89	0,42
Тиамина гидрохлорид	54,86	54,42	53,51	53,20	53,25	53,73	53,83	0,67
Цианокобаламин	0,56	0,54	0,56	0,57	0,58	0,56	0,57	0,013
Лидокаина гидрохлорид	10,17	9,65	9,77	10,08	10,10	9,84	10,02	0,21
Бензиловый спирт	19,72	19,71	19,59	20,22	20,13	20,08	20,16	0,25