

3. Федеральный закон Российской Федерации от 22.12.2014 г. № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств». Российская газета. 2014. № 6568.

Federal'nyj zakon Rossijskoj Federacii ot 22.12.2014 g. № 61-FZ' «O vnesenii izmenenij v Federal'nyj zakon «Ob obrashhenii lekarstvennykh sredstv». Rossijskaya gazeta. 2014. № 6568.

4. Daw J.R., Hanley G.E., Greyson D.L., Morgan S.G. Prescription drug use during pregnancy in developed countries: a systematic review. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2011. № 20. P. 895-902.

5. Lupattelli A., Spigset O., Twigg M.J., Zagorodnikova K., Mardby A.C., Moretti M.E. et al. Medication use in pregnancy: a cross-sectional, multinational web-based study. *BMJ Open.* 2014. № 4.

6. Adam M.P., Polifka J.E., Friedman J.M. Evolving knowledge of the teratogenicity of medications in human pregnancy. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2011. № 157. P. 175-182.

7. FDA Pregnancy Categories [Интернет] 2017 (дата обращения 25.11.2017). Доступно на: <https://www.drugs.com/pregnancy-categories.html>.

FDA Pregnancy Categories [Internet] 2017 (data obrashheniya 25.11.2017). Dostupno na: https://www.drugs.com/pregnancy-categories.html.

8. Тарасова Л.В., Жучкова С.М., Бусалаева Е.И. Информированность врачей Чувашской Республики о проблеме неблагоприятных побочных реакций лекарственных средств. *Медицинский альманах.* 2017. № 1. С. 91-94.

Tarasova L.V., Zhuchkova S.M., Busalaeva E.I. Informirovannost' vrachej Chuvashskoj Respubliki o probleme neblagoprijatnykh pobochnykh reakcij lekarstvennykh sredstv. Medicinskij al'manax. 2017. № 1. S. 91-94.



ВАК: 615.072:543.544:615.281

Код специальности ВАК: 14.04.02

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИРЕТРОВИРУСНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ю.А. Гончикова¹, Н.В. Чмелевская², Е.А. Илларионова¹,

¹ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет»,

²ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы»

Гончикова Юлия Анатольевна – e-mail: Gonchikova1984@mail.ru

Дата поступления
07.02.2018

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) широко используется для количественного определения лекарственных веществ в субстанциях и лекарственных формах. Нормативная документация на абакавир, ламивудин и зидовудин предлагает для количественного определения их в субстанциях и таблетках использовать метод ВЭЖХ на аппаратном оснащении импортного производства с использованием стандартных образцов производства США. **Цель настоящей работы** состояла в разработке методики количественного определения абакавира, ламивудина, зидовудина в лекарственных формах методом ВЭЖХ на хроматографе российского производства и проведении ее валидационной оценки. **Материал и методы.** Использовалась колонка, заполненная ProntoSIL-120-5-S18 AQ, при элюировании в системе элюент А – [4 М лития перхлорат – 0,1 М хлорная кислота] – вода (5: 95); элюент Б – ацетонитрил. Условия хроматографирования: линейный градиент растворителя – 2000 мкл от 5 до 100% при скорости потока 150 мкл/мин Температура колонки 35°C. Результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы «МультХром» (ЗАО «Амперсенд», Москва). **Результаты и их обсуждение.** Разработана селективная, экспрессная методика определения абакавира, ламивудина, зидовудина в фармацевтических препаратах методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией на хроматографе отечественного происхождения. Методика характеризуется хорошей линейностью с коэффициентом корреляции 0,999 в интервале концентраций 0,05–1 мг/мл. Относительная ошибка определения не превышает 1,33%.

Ключевые слова: абакавир, ламивудин, зидовудин, высокоэффективная жидкостная хроматография, количественный анализ.

The conditions chosen for quantitative analysis of abacavir, lamivudine and zidovudine in tablets using HPLC. **The aim** is to develop a method of quantitative determination of abacavir, lamivudine, zidovudine in dosage forms by HPLC on a chromatograph of Russian production and to carry out its validation assessment. **Materials and methods.** The quality of the equipment used was a chromatograph liquid microcolonies «Miltichrom A-02». Analysis conditions: linear gradient of solvent – 2000 μ l from 5 to 100%, flow rate 150 μ l/min in the system of lithium perchlorate, perchloric acid, water and acetonitrile, column temperature 35°C. the standard samples used pharmaceutical substances of abacavir, lamivudine and zidovudine. **Results and discussion.** The method is characterized by good linearity with the correlation coefficient is 0.999 in the concentration range of 0,05–1 mg/ml. The relative error of determination does not exceed 1,33%.

Key words: abacavir, lamivudine, zidovudine, high-performance liquid chromatography, quantitative analysis.

Вирус иммунодефицита человека – одно из самых тяжелых хронических заболеваний. Антиретровирусная терапия позволяет снизить концентрацию вируса в крови до минимальных показателей, тем самым уменьшая риск развития сопутствующих заболеваний и позволяя иммунитету восстановиться в достаточной степени [1].

Количественный состав лекарственной формы, соответствующий нормативной документации, – это залог успеха

антиретровирусной терапии. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) широко используется для количественного определения лекарственных веществ в субстанциях и лекарственных формах. Данный метод дает возможность разделить исследуемые вещества и определить их количественное содержание [2–4]. Нормативная документация на абакавир, ламивудин и зидовудин предлагает для количественного определения их в субстанциях

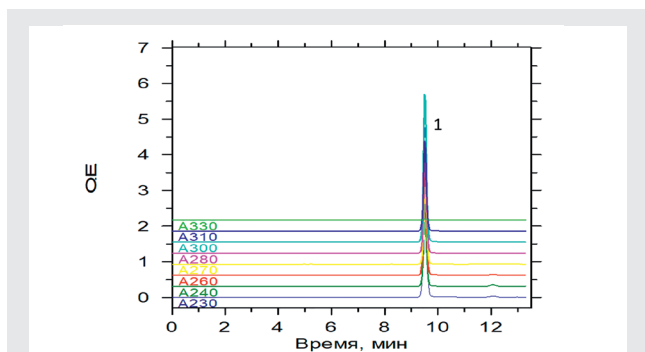


РИС. 1.
Хроматограмма 0,1% стандартного раствора абакавира в метаноле.

ТАБЛИЦА 1.

Длины волн максимального, минимального поглощения абакавира, ламивудина, зидовудина

Определяемое соединение	λ_{max} , нм	λ_{min} , нм
Абакавир	258, 296 (210–230 плато)	242, 272
Зидовудин	214, 272	236
Ламивудин	212, 280	242

ТАБЛИЦА 2.

Результаты количественного определения абакавира, ламивудина, зидовудина в таблетках методом ВЭЖХ

Лекарственная форма	№ серии	\bar{X} , г	Метрологические характеристики (n=9, P=95%)						
			\bar{X} , %	S ²	S	S \bar{x}	ΔX , %	E%	Sr
Абакавир таблетки 300 мг	1411116	0,3102	103,40	1,98	1,41	0,47	1,11	0,11	0,014
	1010815	0,3012	100,40	1,21	1,10	0,37	0,87	0,87	0,011
	1411118	0,2969	98,97	1,53	1,24	0,41	0,97	0,98	0,013
Ламивудин таблетки 150 мг	3821016	0,1449	96,60	2,06	1,44	0,48	1,13	1,17	0,015
	3681016	0,1462	97,47	2,73	1,65	0,55	1,30	1,33	0,017
	3611016	0,1502	100,13	2,25	1,50	0,50	1,18	1,18	0,015
Зидовудин таблетки 300 мг	711016	0,2949	98,30	1,95	1,40	0,47	1,11	1,13	0,014
	701016	0,3084	102,80	2,02	1,42	0,47	1,11	1,08	0,014
	691016	0,2978	99,27	1,87	1,37	0,46	1,09	1,10	0,013

ТАБЛИЦА 3.

Результаты проведения валидационной оценки методики количественного определения абакавира, ламивудина, зидовудина в таблетках методом ВЭЖХ

Параметры	Критерии	Результаты испытания		
		абакавир	ламивудин	зидовудин
Специфичность		методика специфична	методика специфична	методика специфична
Пригодность хроматографической системы				
Эффективность колонки	не менее 3000 т.т.	3500 т.т.	3500 т.т.	3500 т.т.
Коэффициент асимметрии пика	не более 1,5	1,0	0,84	1,02
Сходимость	RSD \leq 2,0%	1,47	1,94	1,33
Воспроизводимость	RSD \leq 2,0%	2,11	2,32	1,96
Правильность	$t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}$ ($t_{\text{таб}} = 2,36$), n=9	1,09	0,26	1,60
Линейность	r \geq 0,990	0,999	0,999	0,999
Стабильность	индивидуально	в течение суток	в течение суток	в течение суток

и таблетках использовать метод ВЭЖХ на аппаратном оснащении импортного производства с использованием стандартных образцов производства США [5–8].

Цель настоящей работы состояла в разработке методики количественного определения абакавира, ламивудина, зидовудина в лекарственных формах методом ВЭЖХ на хроматографе российского производства и проведении ее валидационной оценки.

Материал и методы

Работу выполняли на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Милихром А-02». Использовали ацетонитрил «о.с.ч»; лития перхлорат, хлорную кислоту квалификации «х.ч».

В качестве стандартных веществ применялись фармацевтические субстанции абакавира, ламивудина, зидовудина, содержание действующего вещества в которых не ниже 95%.

Результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы «МультиХром». Для расчета достоверности был использован критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В качестве сорбента была выбрана колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ с обращенной фазой. Было установлено, что используемая колонка обеспечивает симметричные пики на хроматограмме в системе при pH 2,8, содержащей элюент А – [4 М лития перхлорат – 0,1 М хлорная кислота] – вода (5 : 95); элюент Б – ацетонитрил. Исследуемые вещества в выбранной системе элюентов хроматографируются в виде симметричных пиков, что доказано рассчитанными значениями коэффициентов асимметрии, которые для определяемых соединений не превышают 1,5. Это свидетельствует об отсутствии ионообменных взаимодействий в используемой системе [9].

В связи с тем, что исследуемые нами лекарственные вещества могут входить в комбинированные лекарственные формы, а также они достаточно сильно различаются между собой по полярности, изократическое элюирование становится для них нецелесообразным. При анализе применяли градиентный режим элюирования 2000 мкл от 5 до 35% ацетонитрила (0–13 мин), условия которого подобраны экспериментально.

Регистрацию спектров 0,1% растворов абакавира, ламивудина, зидовудина в метаноле проводили в интервале длин волн 190–360 нм с шагом 2 нм. Длины волн максимального, минимального поглощения абакавира, ламивудина, зидовудина приведены в таблице 1.

На рисунках 1–3 представлены хроматограммы стандартных растворов абакавира, ламивудина и зидовудина, зарегистрированные при всех длинах волн.

Используемая система растворителей привела к снижению времени удерживания исследуемых веществ до 30 мин. Время удерживания абакавира, ламивудина и зидовудина равны 9,5 мин, 5 мин и 8 мин, соответственно. Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций 0,05–1,0 мг/мл для всех исследуемых веществ.

Подобранные условия в дальнейшем были использованы для количественного анализа абакавира, ламивудина и зидовудина в таблетках. В качестве стандартного образца сравнения применяли очищенные фармацевтические субстанции абакавира, ламивудина и зидовудина.

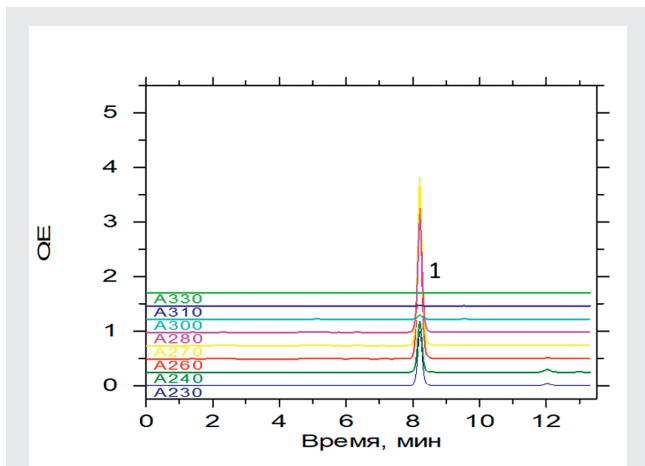


РИС. 2.
Хроматограмма 0,1% стандартного раствора зидовудина в метаноле.

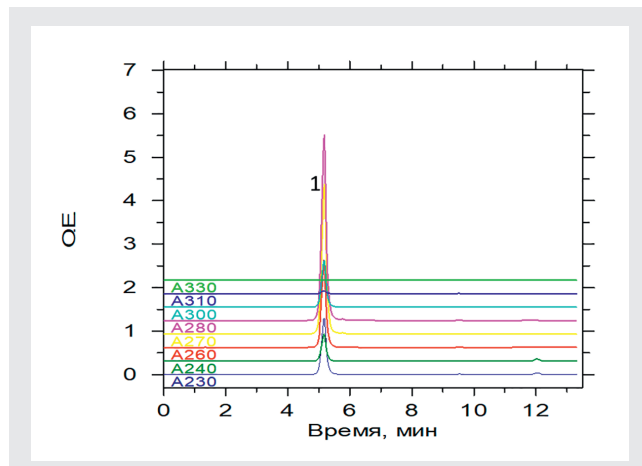


РИС. 3.
Хроматограмма 0,1% стандартного раствора ламивудина в метаноле.

Воспроизводимость методики оценивали путем параллельных анализов образцов, содержащих абакавир, ламивудин, зидовудин в трех различных концентрациях (низкой, средней и высокой). Значения относительных стандартных отклонений, полученные во всем изученном интервале концентраций, указывают на высокую воспроизводимость методики. Разработанная методика использовалась для определения абакавира, ламивудина и зидовудина в таблетках, результаты представлены в таблице 2. Видно, что относительная ошибка определения исследуемых веществ по разработанной методике не превышает 1,33%.

Проведена валидационная оценка разработанной методики по показателям прецизионность (сходимость, воспроизводимость), правильность, специфичность, линейность (таблица 3).

Результаты, представленные в таблице 3, подтверждают пригодность разработанной методики для анализа.

Выводы

Таким образом, разработанная унифицированная методика количественного определения абакавира, ламивудина, зидовудина в лекарственных формах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детекцией на хроматографе отечественного производства «Милихром А-02» характеризуется селективностью, быстротой выполнения и правильностью. Дополнительные пики на хроматограммах не появлялись даже при анализе образцов через более длительный промежуток времени, что свидетельствует об отсутствии неактивных ингредиентов или продуктов разложения. Кроме того, такие вспомогательные вещества, как целлюлоза, карбоксиметилкрахмал натрия, магния стеарат и другие, которые обычно присутствуют в препаратах, не мешают определению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Онищенко Г.Г. ВИЧ-инфекция-проблема человечества. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. 2009. Т. 1. №. 1. С. 5-9.
Onishhenko G.G. VICH-infekciya-problema chelovechestva. VICH-infekciya i immunosupressii. 2009. T. 1. №. 1. S. 5-9.

2. Медведев Ю.В. и др. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы для определения лекарственных веществ в крови (обзор). Химико-фармацевтический журнал. 2013. Т. 47. №. 4. С. 45-51.

Medvedev Yu.V. i dr. VEZhX i SVEZhX kak metody dlya opredeleniya lekarstvennykh veshhestv v krovi (obzor). Ximiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2013. T. 47. №. 4. S. 45-51.

3. Kumar D.A., Rao G.S., Rao J. Simultaneous determination of Lamivudine, zidovudine and abacavir in tablet dosage forms by RP HPLC method. Journal of Chemistry. 2010. Т. 7. №. 1. С. 180-184.

4. Reddiah C.H.V. et al. Development and validation of stability indicating HPLC method for Lamivudine, Zidovudine and Abacavir in tablet dosage forms. International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research. 2017.

5. Фармакоп. ст. предпр. Фирма «Ранбакси Лабораториз Лимитед» 42-14702-07. Таблетки Виро-Зет 300 мг. М. 2001. 16 с.

Farmakop. st. predpr. Firma «Ranbaksi Laboratoriz Limited» 42-14702-07. Tabletki Viro-Zet 300 mg. M. 2001. S. 16.

6. Фармакоп. ст. предпр. Фирма «ГлаксоСмитКляйн Экспорт ЛТД» 42-10406-05. Таблетки Зиаген 300 мг. М. 2008. С. 21.

Farmakop. st. predpr. Firma «GlaksoSmitKlyajn Eksport LTD» 42-10406-05. Tabletki Ziagen 300 mg. M. 2008. S. 21.

7. Фармакоп. ст. предпр. Фирма «Глаксо Вэллком Оперейшенс» 42-10497-99. Таблетки Зеффикс 150 мг. 2004. С. 8.

Farmakop. st. predpr. Firma «Glakso Vehlkom Operejshens» 42-10497-99. Tabletki Zeffiks 150 mg. 2004. S. 8.

8. Азарова И.Н., Барсегян С.С., Барам Г.И. Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии: базы данных «ВЭЖХ-УФ» Хроматография на благо России // Сб. статей по хроматографии / под ред. А.А. Курганова. М.: Граница, 2007. С. 653-665.

Azarova I.N., Barsegyan S.S., Baram G.I. Novye vozmozhnosti vysokoefektivnoj zhidkostnoj xromatografii: bazy dannykh «VEZhX-UF» Xromatografiya na blago Rossii // Sb. statej po xromatografii / pod red. A.A. Kurganova. M.: Granica, 2007. S. 653-665.

9. Барам Г.И., Грачев С.А. Использование перхлората лития при выделении и анализе олиго- и полинуклеотидов. Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1420-1422.

Baram G.I., Grachev S.A. Ispol'zovanie perchlorata litiya pri vydelenii i analize oligo- i polinukleotidov. Bioorganicheskaya ximiya. 1985. T. 11. № 10. S. 1420-1422.