

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИБАВИРИНА В СУБСТАНЦИИ И МАЗИ

МАРЧЕНКО С.И.*, ТРУХАЧЕВА Т.В.**, ПЕТРОВ П.Т.**, ЖЕБЕНТЯЕВ А.И.*

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра токсикологической и аналитической химии*,
научно-фармацевтический центр РУП «Белмедпрепараты»**

Резюме. Изучено влияние pH подвижной фазы и органического модификатора на удерживание рибавирина на сорбентах Нуклеосил C₁₈ и Сепарон ODS.

Разработана методика определения рибавирина в субстанции и мазевой лекарственной форме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве подвижной фазы использован 0,05 М раствор калия дигидрофосфата, длина волны детектора 207 нм, скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин, колонка Bakerbond C₁₈ (250 x 4,6 мм, 5 мкм). Предел определения составляет 150 нг/мл, предел обнаружения — 0,5 нг/мл. Методика отличается хорошей воспроизводимостью, позволяет количественно определять рибавирин в субстанции и мази.

Ключевые слова: рибавирин, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Abstract. The effect of pH and organic modifier in mobile phase on retention of ribavirin on Nucleosil C18 and Separon ODS sorbents has been studied.

HPLC method for determination of ribavirin in substance and ointment has been developed. 0.05 M potassium dehydrophosphate solution represents mobile phase, flow rate is 1 ml/min, detection at 207 nm, column — Bakerbond C₁₈ (250 x 4.6mm, 5µm). Limit of determination makes up 150 ng/ml, detection limit — 0.5 ng/ml. This method is notable for its good reproducibility and allows quantitation of ribavirin in substance and ointment.

Рибавирин (1-β-D-рибофуранозил-1H-1,2,4-триазол-3-карбоксамид, виразол) является синтетическим нуклеозидом, обладающим широким спектром противовирусной активности. Он был синтезирован Джозефом Витковски и Роландом Робинсом в 1972 году. Рибавирин ингибирует синтез вирусной РНК и ДНК, активен в отношении респираторно-синтициального вируса, вируса гриппа А и В, вируса простого герпеса. Совместно с интер-

фероном А применяется при лечении хронического гепатита С [6].

Для проверки качества рибавирина существуют различные методы: высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [2, 5, 6, 9, 13, 14, 16], газовой хроматографии [11], радиоиммунный анализ [10, 3], капиллярный зонный электрофорез [7], спектрофотометрия [8, 12], поляриметрия [17, 18]. Наиболее пригодным для данного класса соединений является метод обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ. В качестве детектора при ОФ ВЭЖХ чаще используют спектрофотометрический [2, 5, 9,

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, кафедра токсикологической и аналитической химии – Марченко С. И.

13, 14, 16] и масс-спектрометрический [6, 11].

Согласно ВР-2002 и USP-26 в качестве подвижной фазы при количественном ВЭЖХ анализе порошка для приготовления ингаляционного раствора и субстанции рибавирина используется вода, доведенная до pH 2,5±0,1 серной кислотой, а разделение ведется на катион-обменной смоле. В то же время, колонки, заполненные силикагелем, модифицированным углеводородными радикалами C₈-C₁₈, более доступны в контрольно-аналитических лабораториях, чем ионообменные колонки для ВЭЖХ [4, 15].

В связи с выпуском отечественных препаратов рибавирина разработка ВЭЖХ методики его определения с использованием доступного растворителя и сорбента представляет собой практический интерес.

Целью данной работы является разработка точной, воспроизводимой и чувствительной ОФ ВЭЖХ методики количественного определения рибавирина в субстанции и лекарственной форме (мазь).

Методы

Влияние pH подвижной фазы и содержание в ней органического модификатора (ацетонитрила) на удерживание рибавирина исследовали на микроколоночном хроматографе Милихром-4 (Россия), снабженном спектрофотометрическим детектором (УФ-область). Для исследований были использованы колонки из нержавеющей стали (80 г 2 мм), заполненные сорбентом Нуклеосил C₁₈ и Сепарон ODS, зернение 5 мкм. Скорость ПФ 100 мкл/мин, объем инъектируемых проб 20 мкл.

Для разработки методики количественного определения рибавирина был использован хроматограф фирмы Shimadzu (Япония) (SPD-10A – UV-VIS детектор с переменной длиной волны, CBM-10A – блок управления, LC-10AT – насос высокого давления, GT-104 – дегазатор), дозирующая петля на 20 мкл. Спектральные характеристики исследуемых растворов определены на спектрофотометре Shimadzu UV-2401PC (Япония).

Для хроматографического разделения использована колонка Bakerbond C₁₈ (250 мм

х 4,6 мм, зернение 5 мкм), скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин.

В качестве подвижной фазы (ПФ) использован 0,05 М раствор калия дигидрофосфата (pH 4,3±0,1). Подвижная фаза была дегазирована и профильтрована на фильтре с диаметром пор 0,45 мкм.

Детектирование проводили при длине волны 207 нм.

Колонку промывали подвижной фазой в течение 40 минут со скоростью 1 мл/мин.

Статистическую обработку проводили при помощи программы Microsoft Excel.

В качестве объекта исследования были приготовлены растворы рибавирина с концентрацией 0,000006-0,000060% (0,06-0,6 мкг/мл) и 0,00025-0,01250% (2,5-125 мкг/мл). Методика была применена для количественного определения рибавирина в составе мазевой лекарственной формы следующего состава:

Рибавирин – 7,5 г.

Воды очищенной – 10,0 г.

Геля монокарбоксицеллюлозы микрокристаллической 10% – до 100,0 г.

Результаты и их обсуждение

Влияние pH подвижной фазы и органического модификатора (ацетонитрила) на удерживание рибавирина на сорбенте Нуклеосил C₁₈ и Сепарон ODS представлено на рисунках 1 и 2. В качестве характеристики удерживания использован коэффициент емкости (k'), который представляет собой отношение исправленного объема удерживания компонента (V_R') к мертвому объему (V₀).

Исходя из полученных данных, для количественного определения рибавирина в качестве подвижной фазы использовали профильтрованный и дегазированный фосфатный буферный раствор с pH 4-5 (рисунок 1). Добавление органического модификатора при этом не требуется. Максимум оптической плотности раствора рибавирина при pH 4,5 находится при 207 нм.

Анализ был выполнен при комнатной температуре и скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин. Был выполнен анализ 9 раство-

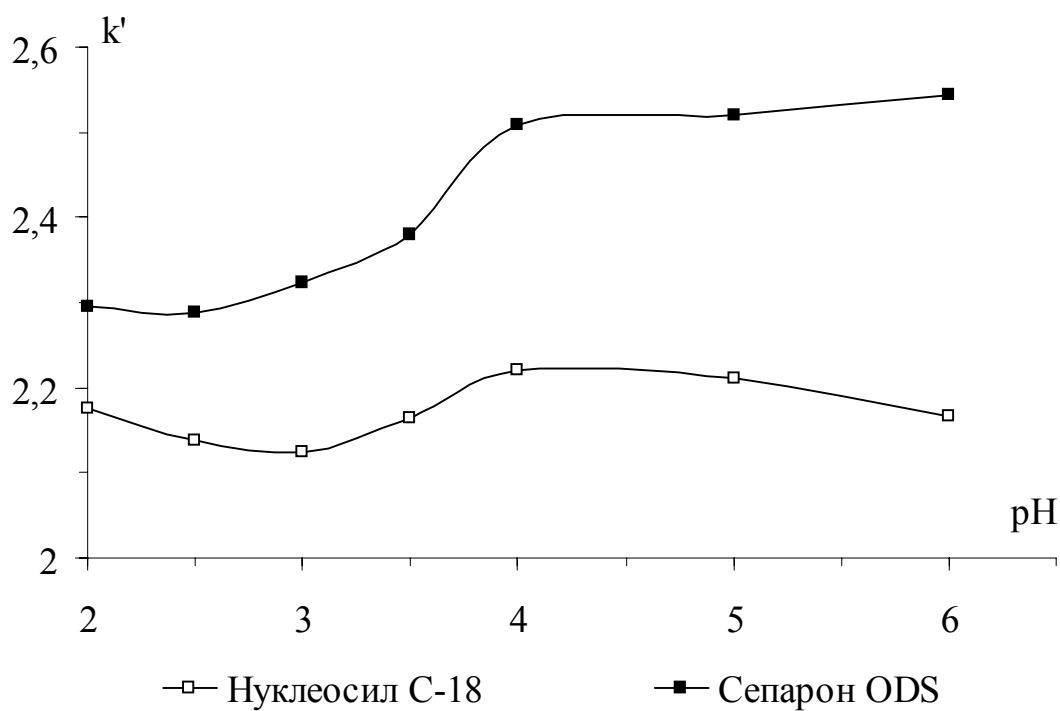


Рис. 1. Влияние pH подвижной фазы на удерживание рибавирина на сорбентах Нуклеосил C₁₈ и Сепарон ODS.

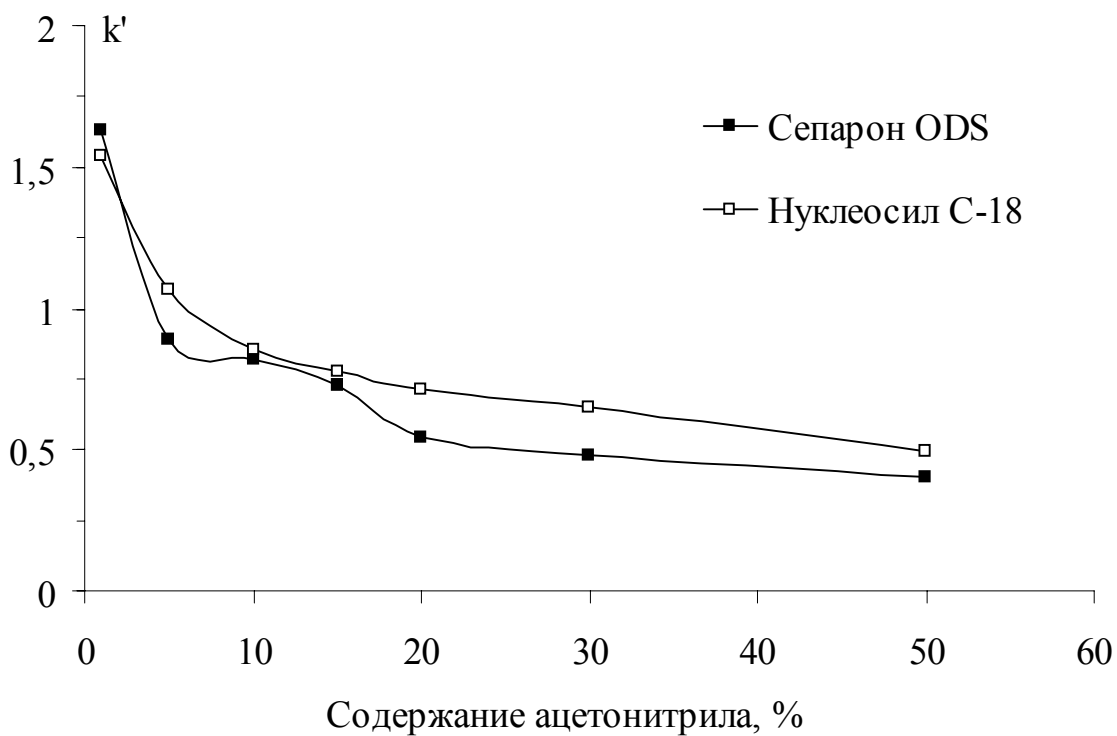


Рис. 2. Влияние органического модификатора в ПФ на удерживание рибавирина на сорбентах Сепарон ODS и Нуклеосил C-18.

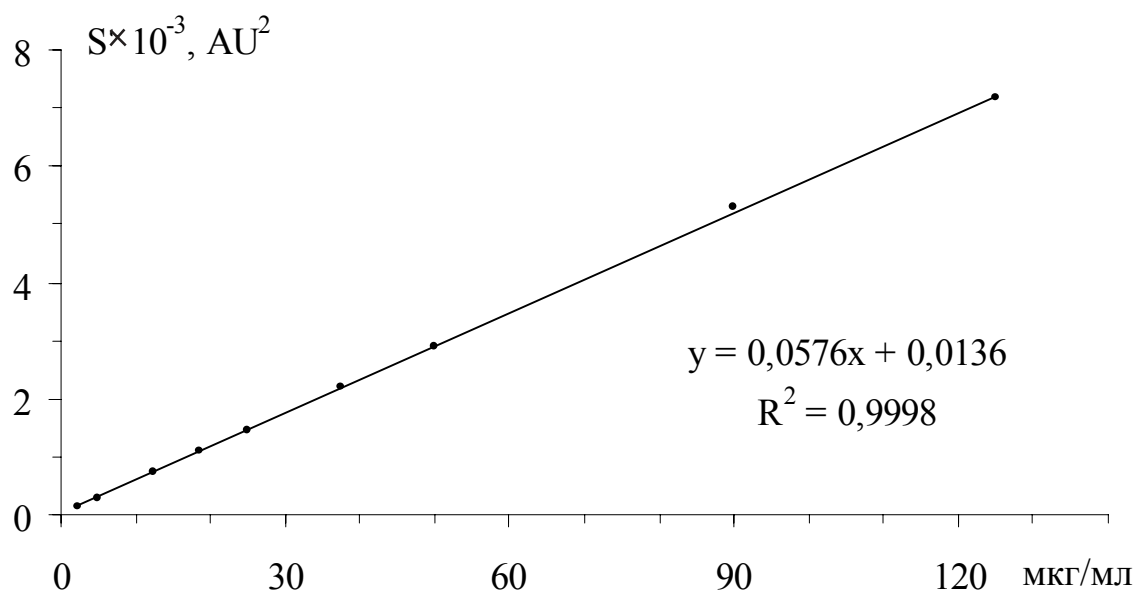


Рис. 3. Градуировочный график для растворов рибавирина.

ров рибавирина с различной концентрацией (рисунок 3, таблица 1). Количество инъекций – 3.

Коэффициент корреляции r составил 0,9999. Методика отличается хорошей воспроизводимостью ($RSD_{\%}$ для растворов с концентрацией 5-125 мкг/мл составило 0,23-0,22 (согласно ВР-2002 и USP-26 – не более 0,5)), характеризуется высокой эффективностью – число теоретических тарелок (N) ≈ 11500 и симметрией пика (коэффициент асимметрии (T) – 1,14-1,17).

Предел детектирования определяли по формуле 1:

$$C_{\min} = \frac{2 \cdot \delta X \cdot G}{h \cdot \mu_{0.5} \cdot V} \quad (1)$$

где G – масса вещества (г) ($G = C' \cdot V'$, C' – массовая концентрация рибавирина (мг/л), V' – объем введенной дозы (л)),

V – скорость элюента (мл/мин),

δX – уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала (δX соответствует максимальному значению амплитуды повторяющихся колебаний нулевого сигнала с периодом не более 20 с),

Таблица 1

Анализ растворов рибавирина различной концентрации

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
мкг/мл	2,5	5	12,5	18,5	25	37,5	50	90	125
RSD%	0,4255	0,2305	0,1716	0,2082	0,2171	0,2137	0,1932	0,2982	0,2151
N	11485	11488	11465	11513	11487	11380	11438	11424	11351
T	1,15	1,15	1,14	1,15	1,15	1,15	1,15	1,17	1,17

Таблица 2

Растворимость рибавирина

Растворитель	Количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1,0 г рибавирина (20±2°С)
Вода	5,5
Этанол, 96%	580
Хлороформ	>100000

h – высота пика рибавирина,

$\mu_{0,5}$ – ширина пика на половине высоты (мин).

По результатам предварительных экспериментов было установлено, что $\delta X=1 \times 10^{-5} AU$, $C'=25 \text{ мг/л}$, $V'=0,00002 \text{ л}$, $h=0,172 AU$, $\mu_{0,5}=0,12 \text{ мин}$, $V=1 \text{ мл/мин}$.

Предел детектирования составил 0,5 нг/мл.

Установленный предел определения составляет 0,15 мкг/мл (рисунок 4 а, б).

Полученные результаты позволяют рекомендовать разработанную методику при количественном анализе рибавирина в субстанции.

По разработанной методике была про-

анализирована 7,5% мазь рибавирина.

Методика выделения действующего вещества из мазевой формы основана на хорошей растворимости рибавирина в воде (таблица 2).

На основании ранее полученных данных оптимальная концентрация рибавирина для ВЭЖХ определения составляет 20-90 мкг/мл (0,002-0,009%).

Методика подготовки пробы для ВЭЖХ анализа.

Около 0,5 г (точная навеска) 7,5% мази помещают в мерную колбу на 50 мл, добавляют 30 мл воды, перемешивают на механическом встряхивателе в течение 30 минут, дово-

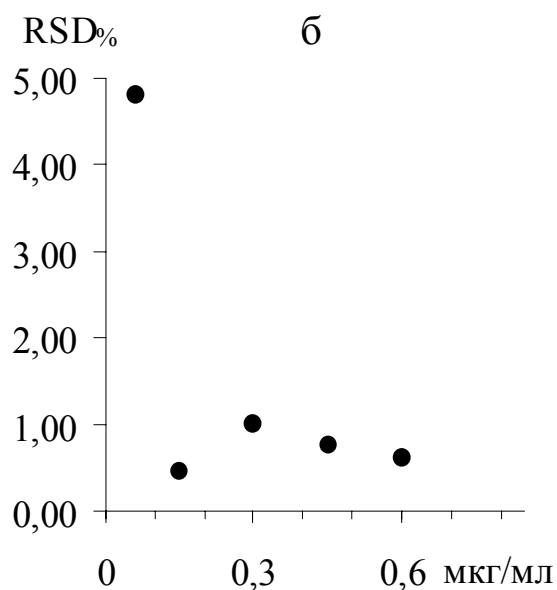
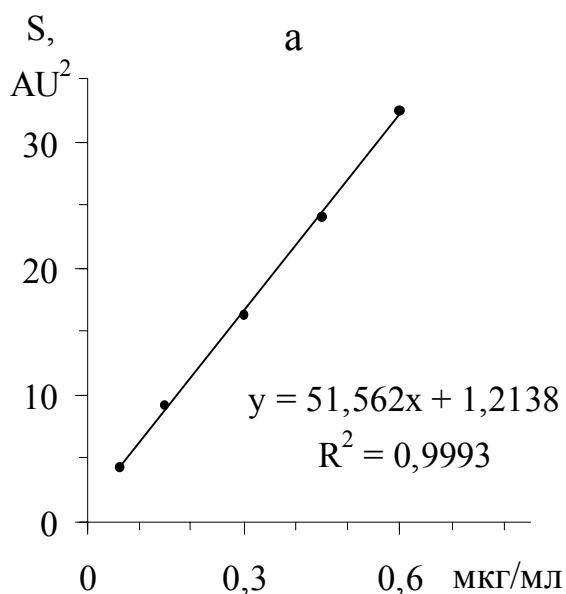


Рис 4. Предел определения: а – градуировочная кривая для концентраций 0,06-0,6 мкг/мл; б – относительное стандартное отклонение для трех повторных инъекций.

Таблица 3

Метрологические характеристики результатов определения рибавирина в мазевой лекарственной форме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

m	S _{сред}	%	X _{сред}	S	RSD%	ΔX	ε, %
0,5301	1788384	7,26	7,29	0,031	0,419	0,08	1,1
0,5143	1742161	7,29					
0,5136	1749768	7,33					
0,5022	1702410	7,29					
0,4782	1614287	7,26					

дят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Полученный раствор переносят в пробирки для центрифугирования и центрифугируют на лабораторной центрифуге в течение 15 минут со скоростью 5000об/мин.

1 мл надосадочной жидкости помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

В качестве рабочего стандартного образца готовят 0,003% раствор рибавирина в ПФ, фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

По 20 мкл испытуемого раствора и раствора рабочего стандартного образца попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе со спектрофотометрическим детектором (подвижная фаза — 0,05 М раствор калия дигидрофосфата (рН 4,3±0,1), скорость

потока ПФ 1 мл/мин, детектирование при 207 нм). Расчет содержания рибавирина X (%) ведут по формуле 2:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 5 \cdot 100}{S_0 \cdot m_1 \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50} \quad (2)$$

где S₁ – площадь пика испытуемого раствора рибавирина, S₀ – площадь пика раствора РСО рибавирина, m₀ – масса рибавирина в РСО (г), m₁ – навеска мази рибавирина (г).

Приготовление раствора РСО. Отвешивают 0,0150 г (точная навеска) рибавирина в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят водой до метки. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50мл, доводят подвижной фазой до метки.

Параллельно растворы анализировали методом спектрофотометрии (СФМ). Методика извлечения аналогичная, но конечная кон-

Таблица 4

Метрологические характеристики результатов определения рибавирина в мазевой лекарственной форме методом спектрофотометрии

m	A _{сред}	%	X _{сред}	S	RSD%	ΔX	ε, %
0,5301	0,629	7,39	7,42	0,048	0,647	0,13	1,8
0,5143	0,615	7,45					
0,5136	0,608	7,37					
0,5022	0,595	7,38					
0,4782	0,575	7,48					

центрация действующего вещества в растворах для СФМ составила 0,0015%.

Результаты количественного определения рибавирина методом ВЭЖХ и СФМ представлены в таблицах 3 и 4 соответственно.

В таблицах 3 и 4 — m — навеска мази, $S_{\text{сред}}$ — средняя площадь пика при 3 повторных инъекциях, $A_{\text{сред}}$ — оптическая плотность растворов при 3 повторных определениях. Расчеты, представленные в таблице, выполнены для доверительной вероятности $P=0,95$ ($f=4$). Стандартное отклонение (S), полуширина доверительного интервала (ΔX) и относительная ошибка отдельного определения (ϵ , %) вычислены, как описано в [1], относительное стандартное отклонение ($RSD_{\%}$) — [4].

Для сравнения воспроизводимости результатов двух методик анализа рассчитывали F -критерий Фишера ($F_{\text{эксп}}$) по формуле 3:

$$F_{\text{эксп}} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (3)$$

где S_1^2 — большая дисперсия (метод СФМ), S_2^2 — меньшая дисперсия (метод ВЭЖХ). Воспроизводимости двух методик статистически не отличаются ($F_{\text{эксп}} = 2,40 < F_{\text{табл}}(0,95; 4, 4) = 6,39$).

Метрологические характеристики представленных методов указывают на предпочтительность методики ВЭЖХ, которая, помимо лучших метрологических характеристик, позволяет одновременно производить идентификацию (по времени выхода пика анализируемого вещества и пика вещества рабочего стандартного образца) и количественное содержание примесей (отношение суммы площадей неидентифицированных пиков к площади всех пиков на хроматограмме).

Выводы

Разработанная методика количественного определения рибавирина в субстанции и мазевой лекарственной форме методом ВЭЖХ отличается хорошей воспроизводимостью (от-

носительное стандартное отклонение не превышает 0,4%), высокой чувствительностью (предел детектирования 0,5 нг/мл, установленный предел определения 150 нг/мл), а также позволяет идентифицировать действующее вещество и количественно оценить содержание примесей.

Литература

1. Государственная фармакопея СССР XI, Вып. 1, Москва, Медицина, 1987.
2. Шлянкевич А.М., Корбух И.А., Трещалин И.Д., Некрасова Е.Б., Сыркин А.Б., Евтушенко Н.С. и Преображенская М.Н. // Хим.-фарм. журн. — 1987. — №21. — С. 1260.
3. Austin R.K., Trefts P.E., Hintz M., Connor J.D., Kagnoff M.F. // Antimicrob. Agents Chemother. — 1983. — Vol. 24, №5. — P. 696-701.
4. British Pharmacopoeia 2002. Version 6.0. Crown Copyright (2002).
5. Granich G.G., Krogstad D.J., Connor J.D., Desrochers K.L., Sherwood C. // Antimicrob. Agents Chemother. — 1989. — Vol. 33, №3. — P. 311-315.
6. Lin C.-c., Yeh L.-T., N. Lau J.Y. // J. Chromatogr. B. — 2002. — Vol. 779. — P. 241-248.
7. Liu S.F., North J.A., Murray B.K., Huang M.X., Lee M.L. // J. Microcolumn Sep. — 1994. — Vol. 6, №1. — P. 49-54.
8. Meiling Q., Chumhua H., Shunrong L. // Shenyang Yaoxue Yanxuebao. — 1994. — Vol. 11, №2 — P. 133.
9. Paroni R., Sirtori C.R., Borghi C., Kielne M.G. // J. Chromatogr. B. — 1987. — Vol. 64. — P. 189-196.
10. Raleigh K.A., Park E.T., Hintz M., James D.C., Martin F.K. // Antimicrob. Agents Chemother. — 1983. — Vol. 24, №5. — P. 693-695.
11. Roboz J. and Suzuki R. // J. Chromatogr. — 1978. — Vol. 160. — P. 169.
12. Sastry C.S.P., Naidu P.I., Lakshmi C.S.R., Reddy M.N., Chinthalapati R. // Talanta. — 1998. — Vol. 47. — P. 85-93.
13. Shah Y., Joshi S., Jindal K.C., Khanna S. // Drug Dev. Ind. Pharm. — 1994. — Vol. 20, №1. — P. 85-91.
14. Smith R.H.A., Gilbert B.E. // J. Chromatogr. B. — 1987. — Vol. 58. — P. 202-210.
15. USP 26 - NF 21. The United States Pharmacopoeial Convention (2003).
16. Wang J.X., Feng S.M. // Yaowu Fenxi Zazhi. — 1995. — Vol. 15, №4. — P. 48-49.
17. Wei W., Wang G. // Yiyao Gongye. — 1988. — Vol. 19, №4. — P. 178-179.
18. Wenao W., Guoxiang W. // Zhongguo Yiyao Gongye. — 1988. — Vol. 19, №4. — P. 178.

Поступила 02.05.2005 г.

Принята в печать 23.06.2005 г.