УДК 615.074
DOI 10.18413/2075-4728-2018-41-4-687-702

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕРПЕНО-ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ (НА ПРИМЕРЕ ВИНКРИСТИНА СУЛЬФАТА И ВИНБЛАСТИНА СУЛЬФАТА)

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SPECTROPHOTOMETRIC QUANTITATIVE DETERMINATION OF TERPENE-INDOLE ALKALOIDS (FOR EXAMPLE, VINCRISTINE SULFATE AND VINBLASTINE SULFATE)

О.В. Тринеева, А.Д. Халахакун, А.И. Сливкин
O.V. Trineeva, A. J. Halahakun, A.I. Slivkin

Воронежский государственный университет,
Россия, 394006, г. Воронеж, Университетская пл., д. 1

Voronezh State University,
1 Universitetskaya Sq., Voronezh, 394006, Russia

E-mail: trineevaov@mail.ru

Аннотация
Изучены спектральные характеристики винкристина и винбластина в УФ-области в воде очищенной, метаноле, 0.1 М NaOH, 0.1 М HCl, фосфатном буферном растворе (pH=5), 95 % этаноле и хлороформе в диапазоне 200-320 нм. Выраженный батохромный сдвиг наблюдается на спектрах исследуемых алкалоидов при использовании в качестве растворителя с наименьшей полярностью хлороформа. Некоторый гиперхромный эффект наблюдается на спектрах водных и спиртовых растворов винкристина при 295 нм и винбластина при 268 нм. Валидация разработанной методики проводилась по таким параметрам, как специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, правильность, прецизионность и робастность аналитического метода. Представленные результаты могут послужить основой для разработки проектов фармакопейных статей на фармацевтические субстанции данных алкалоидов для ГФ РФ. Разработанные методики также могут быть использованы для определения винкристина и винбластина сульфатов в лекарственных формах и биологическом материале.

Abstract
Spectrophotometric methods for the quantitative determination of terpene-indole alkaloids have been developed and validated (using vincristine and vinblastine sulfates as an example). The spectral characteristics of vincristine and vinblastine were studied in the UV region in purified water, methanol, 0.1 M NaOH, 0.1 M HCl, phosphate buffer solution (pH=5), 95 % ethanol, and chloroform in the range 200-320 nm. A pronounced bathochromic shift is observed in the spectra of the studied alkaloids when used as the solvent with the lowest polarity - chloroform. Some hyperchromic effect is observed in the spectra of aqueous and alcoholic solutions of vincristine at 295 nm and vinblastine at 268 nm. Validation of the developed methodology was carried out according to such parameters as specificity, detection limit, limit of quantitative determination, linearity, accuracy, precision and robustness of the analytical method. The presented results can serve as a basis for the development of drafts of pharmacopoeial articles on the pharmaceutical substances of these alkaloids for the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. The developed techniques can also be used to determine vincristine and vinblastine sulfates in dosage forms and biological material.

Ключевые слова: винкристина сульфат, винбластина сульфат, терпено-индольные алкалоиды, валидация, спектрофотометрия.
Keywords: vincristine sulfate, vinblastine sulfate, terpene-indole alkaloids, validation, spectrophotometry.

Введение

Противоопухолевые препараты растительного происхождения винкристин (VCR) и винбластин (VBL) относятся к цитостатикам с высокой биологической активностью и применяются в моно- и комбинированной химиотерапии онкологических заболеваний [Заборовский и др., 2017; Заборовский и др., 2017; Тринеева и др., 2018]. Данная группа алкалоидов имеют сходную химическую структуру, отличаясь друг от друга характером радикала-R (рис. 1).

Американская [United States Pharmacopeia, (USP 29), 2005], Британская, Европейская [European Pharmacopoeia: Supplement, 2008], Японская [Японская фармакопея, 15-е изд., 2007] и Международная фармакопеи рекомендуют использовать УФ- и ИК-спектральные характеристики VCR сульфата и VBL сульфата для оценки их подлинности и степени чистоты в субстанциях [США – UPS30-NF25, E.Ph. 7, J.Ph. XV].

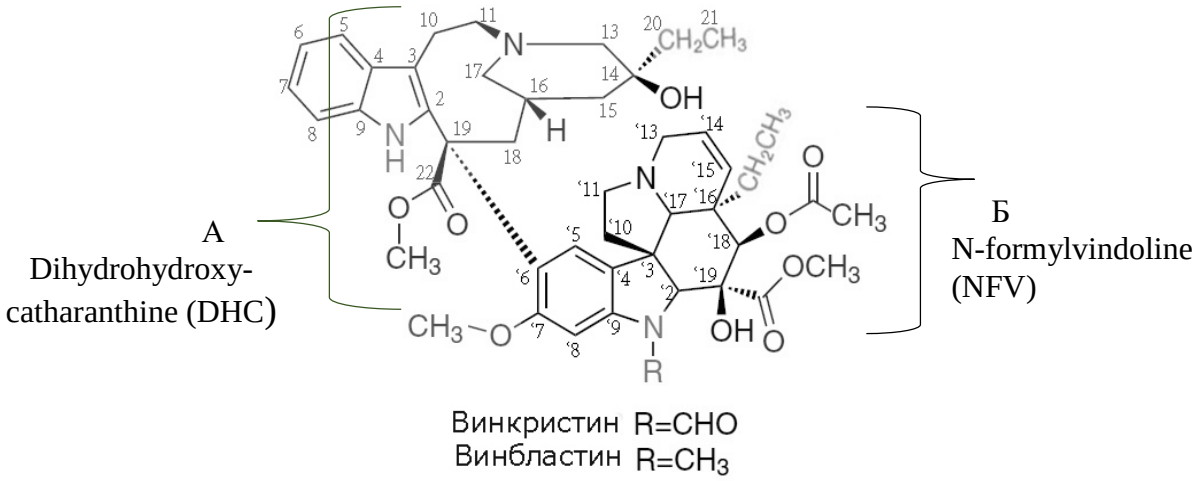


Рис. 1. Химическая структура VCR и VBL: А – фрагмент катарантина (индольный фрагмент), Б – фрагмент виндолина (индолиновый фрагмент)
Fig. 1. The chemical structure of VCR and VBL: A – fragment of quarantine (indole fragment), B – fragment vindolin (indoline fragment)

Для количественного определения препаратов данной группы в настоящее время наиболее часто используется метод ВЭЖХ [Cimpan et al., 2002; Dobson, 2006; Hisiger et al., 2007; Uniyal et al., 2001; Van Tellingen et al., 1991] с УФ- и масс-детектированием [Ranta et al., 1994; Sethi et al., 1981], описанный в фармакопейных статьях (ФС) на субстанции VCR и VBL сульфатов Европейской, Американской и Японской фармакопей (ГФ). В ГФ РФ с X по XIII изд. ФС как на данные алкалоиды, так и на лекарственное растительное сырье, их содержащее (трава катарантуса розового), отсутствуют [Государственная фармакопея СССР, 1990; Государственная фармакопея Российской Федерации XII изд., 2008; Государственная Фармакопея Российской Федерации, 2015]. Качество сырья регламентируется ВФС по содержанию VBL (не менее 0.02 %, фотоколориметрическим методом). Не обнаружены подобные ФС и в ГФ республик Казахстан и Беларусь.

Большее внимание исследователей привлекают оптические методы анализа, одним из которых является спектрофотомерия. В химических структурах терпено-индольных ал-

калоидов имеются хромофорные и ауксохромные группы, которые обусловливают появление полос поглощения в электромагнитных спектрах. К достоинствам данного метода можно отнести высокую воспроизводимость, доступность и экспрессность.

Цель исследования – разработка и валидация спектрофотометрических методик количественного определения терпено-индольных алкалоидов (на примере винкристина и винбластина сульфатов), основанных на их избирательном светопоглощении в ультрафиолетовой области.

Задачи исследования:

1. Изучить спектральные характеристики VCR и VBL в УФ-области в воде очищенной, метаноле, 0.1 М NaOH, 0.1 М HCl, фосфатном буферном растворе (pH=5), 95 % этаноле и хлороформе в диапазоне 200–320 нм.
2. Разработать и валидировать спектрофотометрическую методику качественного и количественного определения VCR и VLB в субстанциях.
3. Провести количественное определение VCR и VLB в лекарственных формах с помощью разработанной методики.

Материалы и методы исследования

В виду малой доступности и высокой стоимости стандартных образцов VCR и VBL, для эксперимента использовали готовые лекарственные препараты данных веществ, стандартизованные в соответствие с требованиями действующей нормативной документации (США – UPS30-NF25, E.Ph. 7, J.Ph. XV, B.Ph. 2013). Для приготовления рабочего стандартного раствора VCR сульфата (раствор А) использовали «Винкристин-Рихтер» 1,0 мг, лиофилизат во флаконах, содержащий 1 мг субстанции VCR сульфата (в пересчете на безводное вещество) и лактозу в качестве вспомогательного вещества. Для приготовления рабочего стандартного раствора VBL сульфата (раствор А) применяли «Винбластин-ЛЭНС», лиофилизат во флаконах, содержащий 5 мг субстанции VBL сульфат (в пересчете на безводное вещество).

Приготовление РСО VCR сульфата: содержимое 5 флаконов (5 мг) количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили водой очищенной до метки (раствор А).

Приготовление РСО VBL сульфата: 5,0 мг лиофилизата помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили водой очищенной до метки (раствор А). Стандартные растворы хранили в темной склянке в холодильнике при температуре +4 ^{0}С до времени употребления (не более 10 суток).

Количественное определение VBL сульфата в лекарственной форме: около 5.0 мг (точная навеска) лиофилизата растворяли в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 50 мл, объем раствора доводили до метки тем же растворителем. 10 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора до метки водой очищенной. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре в максимуме поглощения в кювете с толщиной рабочего слоя 1 см на фоне воды очищенной.

Количественное определение VCR сульфата в растворе для инъекций (1 мг/мл во флаконе): содержимое 2 флаконов количественно перемещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем раствора доводили до метки водой очищенной. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре в максимуме поглощения в кювете с толщиной рабочего слоя 1 см на фоне воды очищенной.

Содержание VBL и VCR рассчитали на основе калибровочных графиков (рис. 6а и 6б) по формулам 1 и 2 соответственно:

$$X_{VBL\ (мкг)} = (A - 0.01153)/0.01923 \times 50 \quad (1)$$

$$X_{VCR\ (мкг)} = (A - 0.01120)/0.01954 \times 50 \quad (2)$$

где А – оптическая плотность, исследуемого раствора.

Для изучения спектральных характеристик VCR и VBL в УФ-области были сняты спектры поглощения растворов с концентрацией 25 мкг/мл, приготовленных на воде очищенной, метаноле, 0.1 М NaOH, 0.1 М HCl, фосфатном буферном растворе (pH=5), 95 % этаноле и хлороформе в диапазоне 200–320 нм на спектрофотометре Hitachi Ratio Beam Spectrophotometer U-1900 «Япония» в кюветах с толщиной рабочего слоя 1.0 см при 20 ^{0}C.

Валидацию разработанной методики проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ XIII [Государственная Фармакопея Российской Федерации, 2015] по таким параметрам, как специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, правильность, прецизионность и робастность аналитического метода.

Результаты и их обсуждение

Вид полученных УФ-спектров и спектральные характеристики представлены в табл. 1 и на рис. 2. Установлено, что максимум поглощения $\lambda_{(max)}$ для водного раствора VCR сульфата находится при 219, 254 и 295±1нм, а для водного раствора VBL сульфата – при 214 и 268±1нм. В Британской и Японской ГФ в качестве растворителя используют метанол.

Данные табл. 1 и рис. 2 демонстрируют, что в разных растворителях максимумы поглощения VCR и VBL изменяются по сравнению с $\lambda_{(max)}$ в метаноле. Полярность растворителя и pH среды влияют на электронные переходы при поглощении молекулой энергии электромагнитного излучения [Язык спектров. Введение в интерпретацию спектров органических соединений, 2002]. Выраженный батохромный сдвиг наблюдается на спектрах исследуемых алкалоидов при использовании в качестве растворителя с наименьшей полярностью хлороформа. Некоторый гиперхромный эффект (табл. 2) наблюдается на спектрах водных и спиртовых растворов VCR при 295 нм и VBL при 268 нм.

Таблица 1
Table 1

Спектральные характеристики VCR сульфата и VBL сульфата
в различных растворителях (25 мкг/мл)
Spectral characteristics of VCR sulfate and VBL sulfate in various solvents (25 μg / ml)

Растворитель	VCR, λ_{max} нм			VBL, λ_{max} нм	
Метанол	222±2	256±2	298±2	214±2	266±2
Вода очищенная	219±1	254±1	295±1	214±1	268±1
0.1 M NaOH	218.5±1	254±1	297.5±1	214±1	268.5±1
0.1 M HCl	219±1	254±1	295.5±1	214±1	268±1
Фосфатный буферный раствор	223±1	255±1	295.5±1	222±1	269±1
95 % этанол	226±1	256±1	297±1	214±1	265±1
Хлороформ	241±1	291±1	299±1	249.5±1	290.5±1

В эксперименте показано также, что изменение показателя pH среды влияет на положение максимума поглощения. В более кислой среде максимумы поглощения в области 190–230 нм и 230–300 нм смещаются батохромно с одновременным гипохромным эффектом (рис. 3 и 4).

Экспериментальные данные показывают, что более выраженные максимумы поглощения ($\lambda_{(max)}$=295 нм для VCR и 268 нм для VBL) были получены при использовании воды очищенной в качестве растворителя, что послужило основанием для выбора ее при разработке методики спектрофотометрического определения изучаемых алкалоидов. Для исследования аналитической области методики готовили серию рабочих растворов (раствор Б) из стандартного раствора А с концентрациями 250, 100, 50, 20, 10, 5 и 1 мкг/мл.

Таблица 2
Table 2

Значения оптической плотности растворов VCR сульфата и VBL сульфата
в максимумах поглощения в различных растворителях (25 мкг/мл)
The optical density values of solutions of VCR sulphate and VBL sulphate
at absorption maxima in various solvents (25 µg / ml)

Растворитель	VCR			VBL	
	219 нм	254 нм	295 нм	214 нм	268 нм
Вода очищенная	1.590	0.498	0.509	1.701	0.497
0.1 M NaOH	1.897	0.432	0.409	1.332	0.346
0.1 M HCl	1.314	0.430	0.390	1.317	0.343
Фосфатный буферный раствор	1.225	0.428	0.429	1.117	0.452
95 % этанол	1.274	0.408	0.538	1.894	0.532
Хлороформ	0.709	0.536	0.531	0.496	0.413

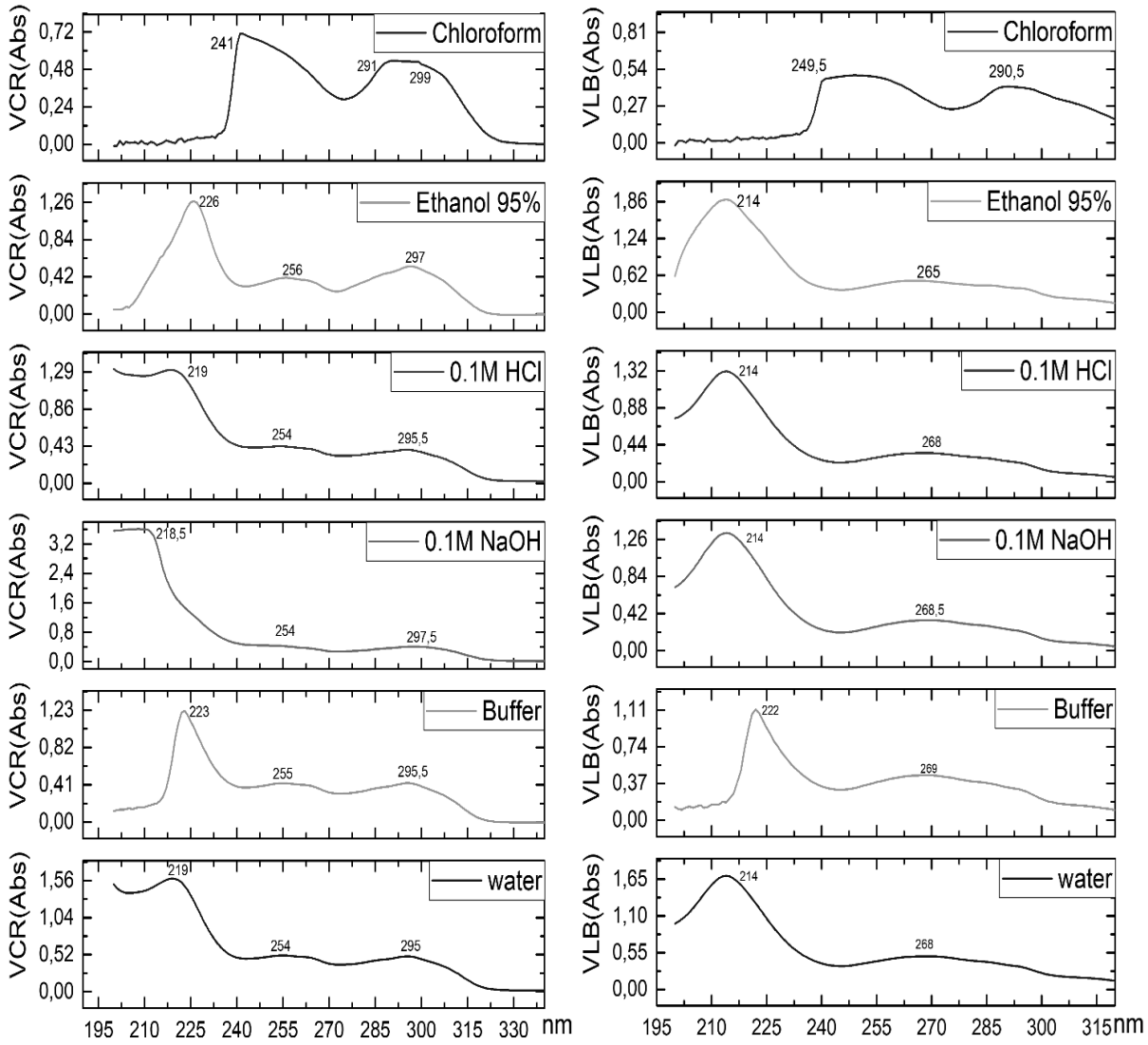


Рис. 2. УФ-спектры растворов VCR сульфата и VBL сульфата
в различных растворителях (25 мкг/мл)
Fig. 2. UV spectra of solutions of VCR sulfate and VBL sulfate in various solvents (25 µg / ml)

Результаты определения оптической плотности исследуемых растворов представлены в табл. 3.

Таблица 3
Table 3

Значение оптической плотности растворов VCR и VBL при определении аналитической области методики (n=21; ±SD)
The value of the optical density of solutions of VCR and VBL in determining the analytical field of the technique (n = 21; ±SD)

Концентрация раствора Б (мкг/мл)	VCR при λ=295 nm	VBL при λ=268 nm
250	3.253±0.004	3.268±0.003
100	1.568±0.003	1.859±0.002
50	0.987±0.002	0.970±0.002
20	0.400±0.001	0.398±0.001
10	0.274±0.001	0.202±0.001
5	0.104±0.001	0.102±0.001
1	0.038±0.002	0.039±0.002

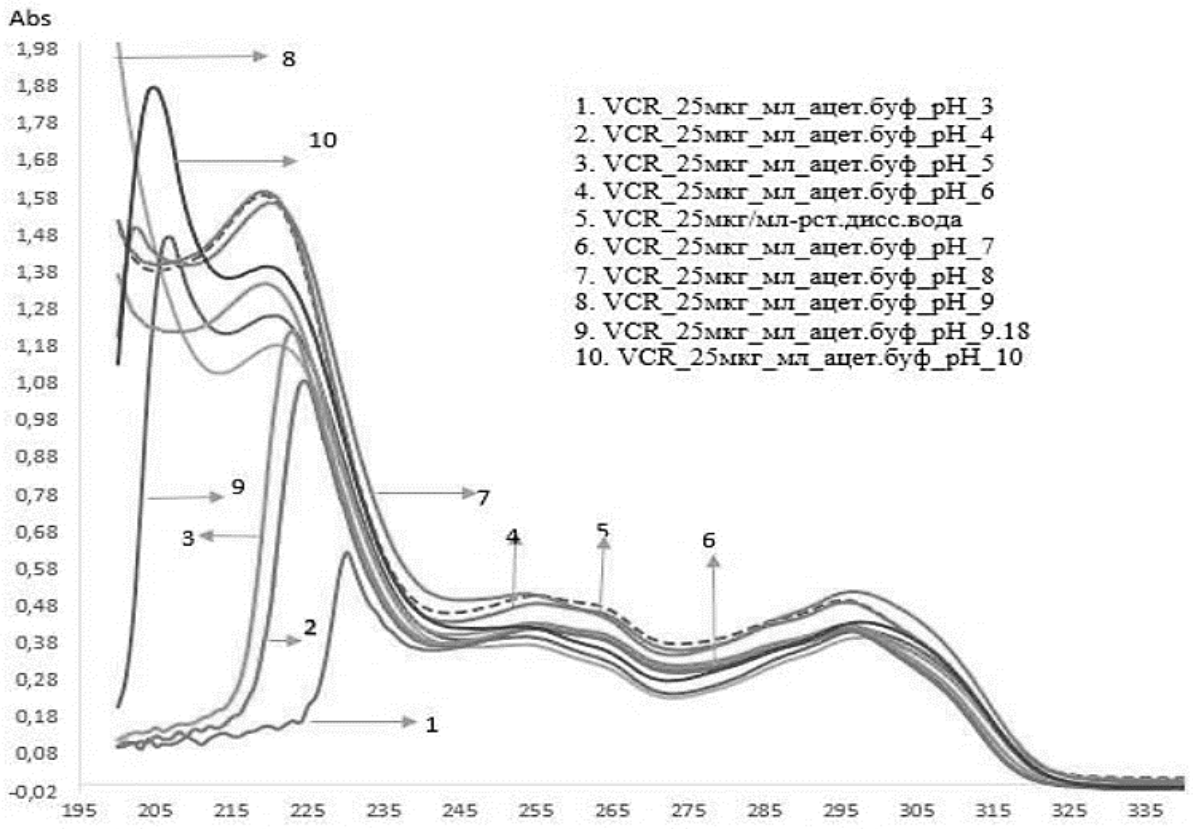


Рис. 3. Влияние pH среды растворителя на вид УФ-спектр VCR сульфата (pH 3-10). Ацетатный буфер: 1 – pH=3; 2 – pH=4; 3 – pH=5; 4 – pH=6; 6 – pH=7; 7 – pH=8; 8 – pH=9; 9 – pH=9.18; 10 – pH=10; 5 – вода очищенная
Fig. 3. Effect of solvent pH on the appearance of the UV spectrum of VCR sulfate (pH 3-10). Acetate buffer: 1 – pH=3; 2 – pH=4; 3 – pH=5; 4 – pH=6; 6 – pH=7; 7 – pH=8; 8 – pH=9; 9 – pH=9.18; 10 – pH=10; 5 – purified water

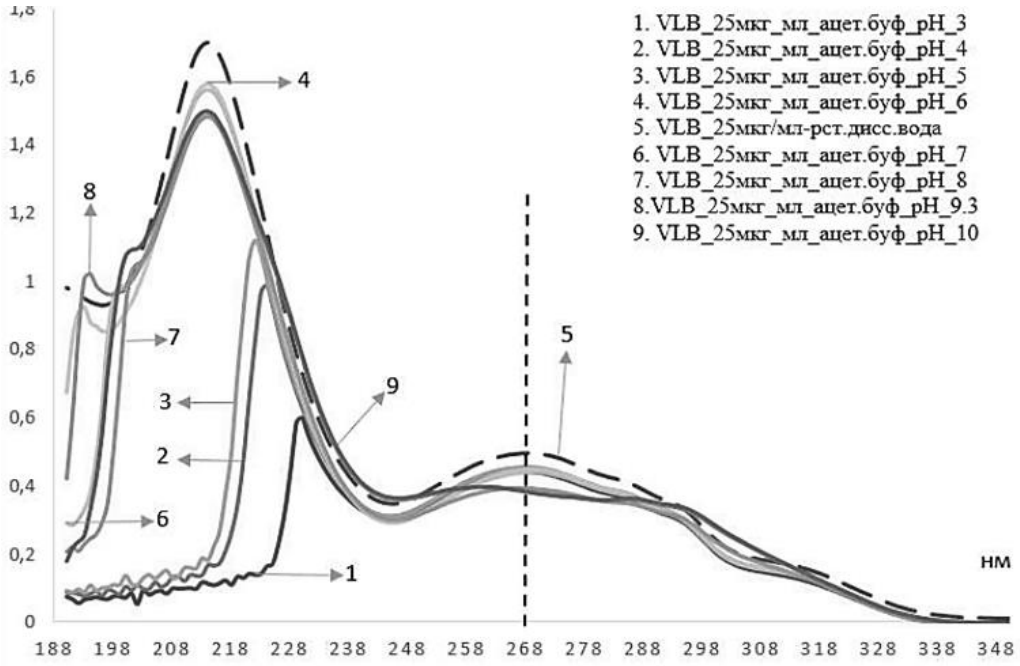
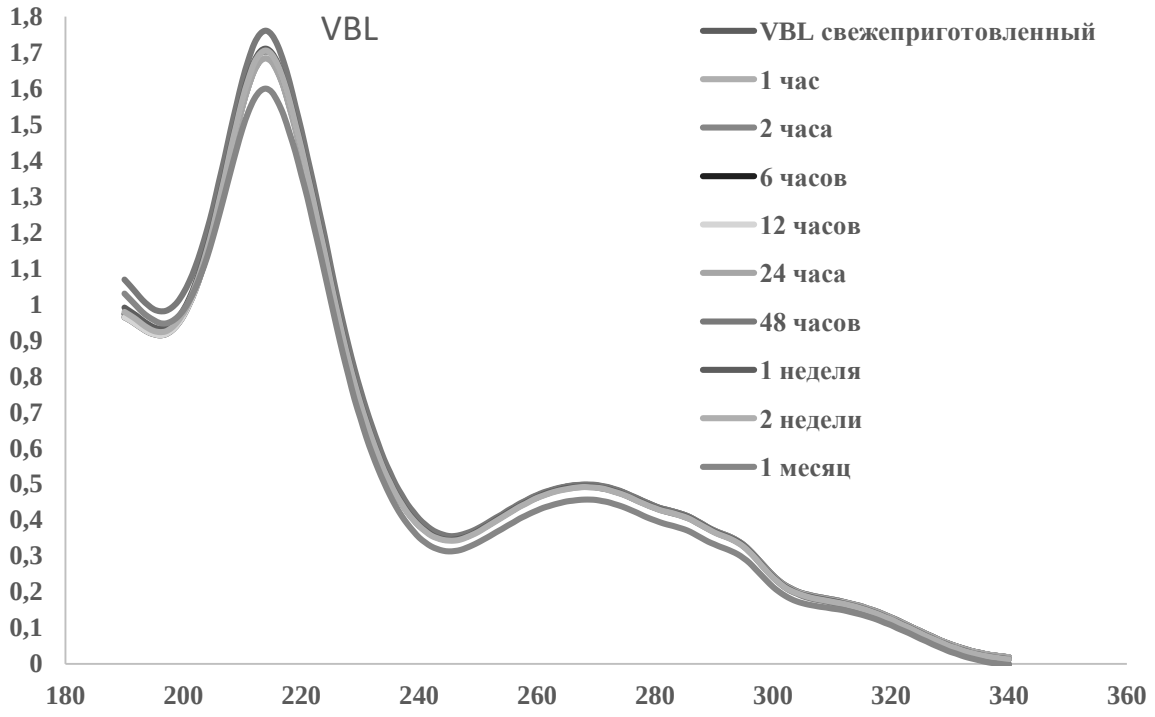


Рис. 4. Влияние pH среды растворителя на вид УФ-спектр VBL сульфата (pH 3-10).
Ацетатный буфер: 1 – pH=3; 2 – pH=4; 3 – pH=5; 4 – pH=6; 6 – pH=7; 7 – pH=8; 8 – pH=9; 9 – pH=9.18; 10 – pH=10; 5 – вода очищенная
Fig. 4. Effect of solvent pH on the appearance of the UV spectrum of VBL sulfate (pH 3-10).
Acetate buffer: 1 – pH=3; 2 – pH=4; 3 – pH=5; 4 – pH=6; 6 – pH=7; 7 – pH=8; 8 – pH=9; 9 – pH=9.18; 10 – pH=10; 5 – purified water

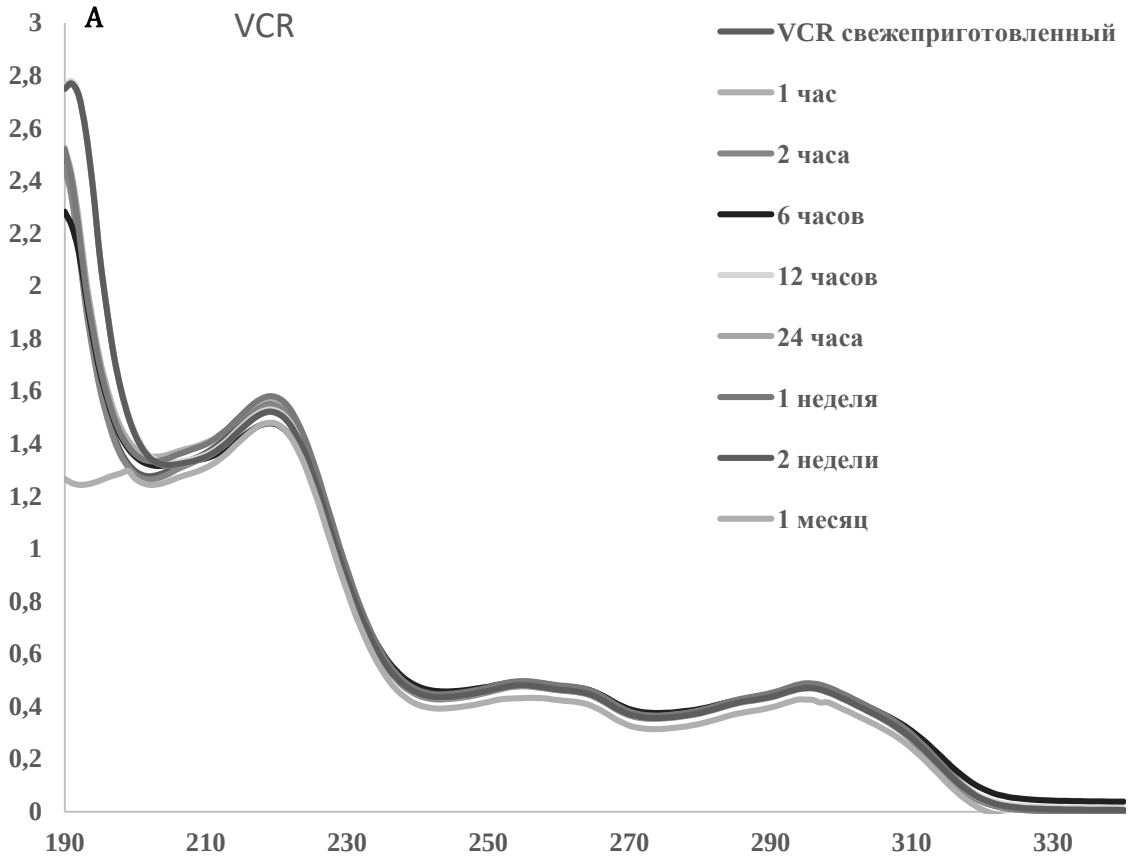
Полученные данные свидетельствуют о том, что для дальнейшей работы могут быть выбраны растворы с концентрациями от 10 до 50 мкг/мл. На основании литературных данных об УФ-спектре лактозы – вспомогательного вещества, содержащегося в лиофилизате («Винкристин-Рихтер»), в диапазоне длин волн 340–190 нм отсутствуют характерные пики поглощения [Язык спектров. Введение в интерпретацию спектров органических соединений, 2002], а, следовательно, лактоза не мешает определению, и полученные максимумы поглощения обусловлены присутствием VCR сульфата.

Для определения стабильности значений оптической плотности водных растворов во времени готовили серию (6 образцов) стандартных растворов с концентрацией 100 мкг/мл (растворы А). I группу образцов хранили в темных склянках при +4 ^{0}С в холодильнике; II группу – в темных склянках при комнатной температуре (20 ^{0}С). Непосредственно перед измерением растворы разводили водой очищенной до содержания действующего вещества 25 мкг/мл (растворы Б) и регистрировали спектры поглощения во временном интервале: 1 ч., 2 ч., 4 ч., 6 ч., 12 ч., 24 ч., 48 ч., 1 неделя, 2 недели, 1 месяц. Полученные УФ-спектры исследуемых растворов (I группа образцов) изображены на рис. 5 (а,б). Стандартные водные растворы VCR и VBL стабильны при хранении в холодильнике при температуре +4 ^{0}С до 10 суток.

Для исследования области линейности методики из растворов рабочих стандартных образцов (растворы А) готовили серию растворов Б с содержанием изучаемых солей алкалоидов в диапазоне 5–50 мкг/мл. Для построения калибровочного графика применяли средние значения, полученные из 3-х измерений. Критерий приемлемости – коэффициент корреляции не менее 0.999. Вид линейной зависимости величины оптической плотности раствора от содержания VCR сульфата и VBL сульфата представлен на рис. 6. Характеристики линейности приведены в табл. 4.



а



б

Рис. 5. Изменение значений оптической плотности стандартных растворов VCR и VBL при хранении в условиях холодильника

Fig. 5. Changes in the values of optical density of standard solutions of VCR and VBL during storage in refrigerator conditions

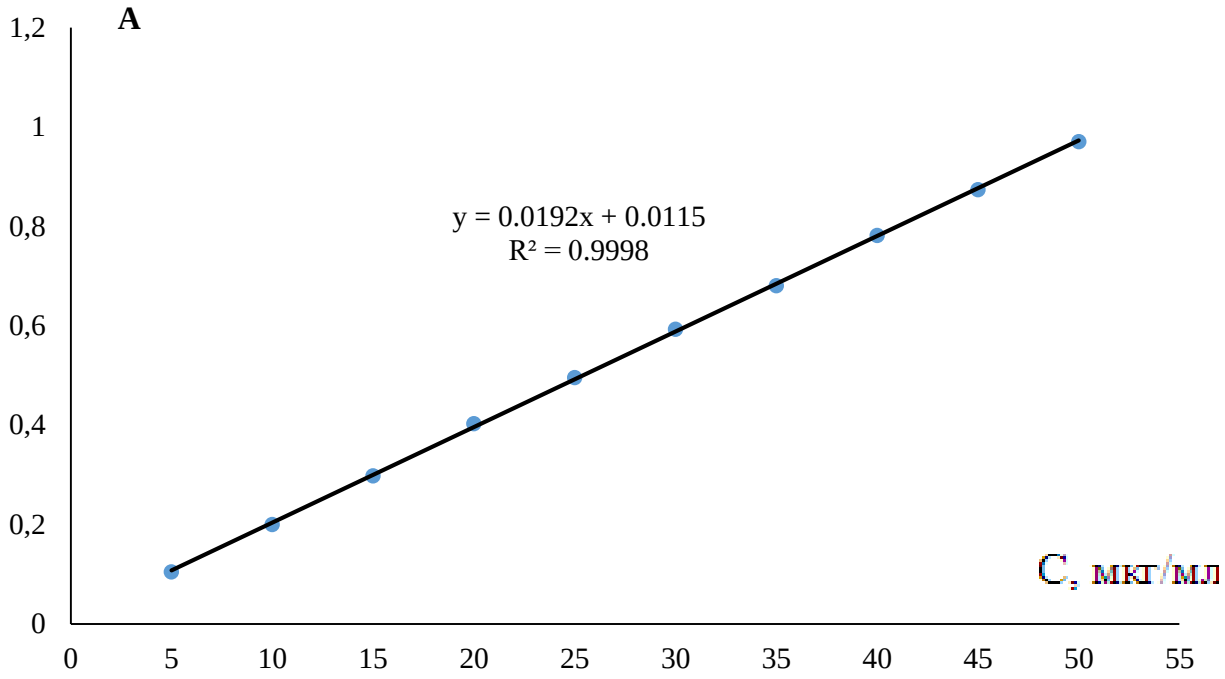
Таблица 4
Table 4

Параметры калибровочных графиков VCR и VBL
VCR and VBL calibration graph parameters

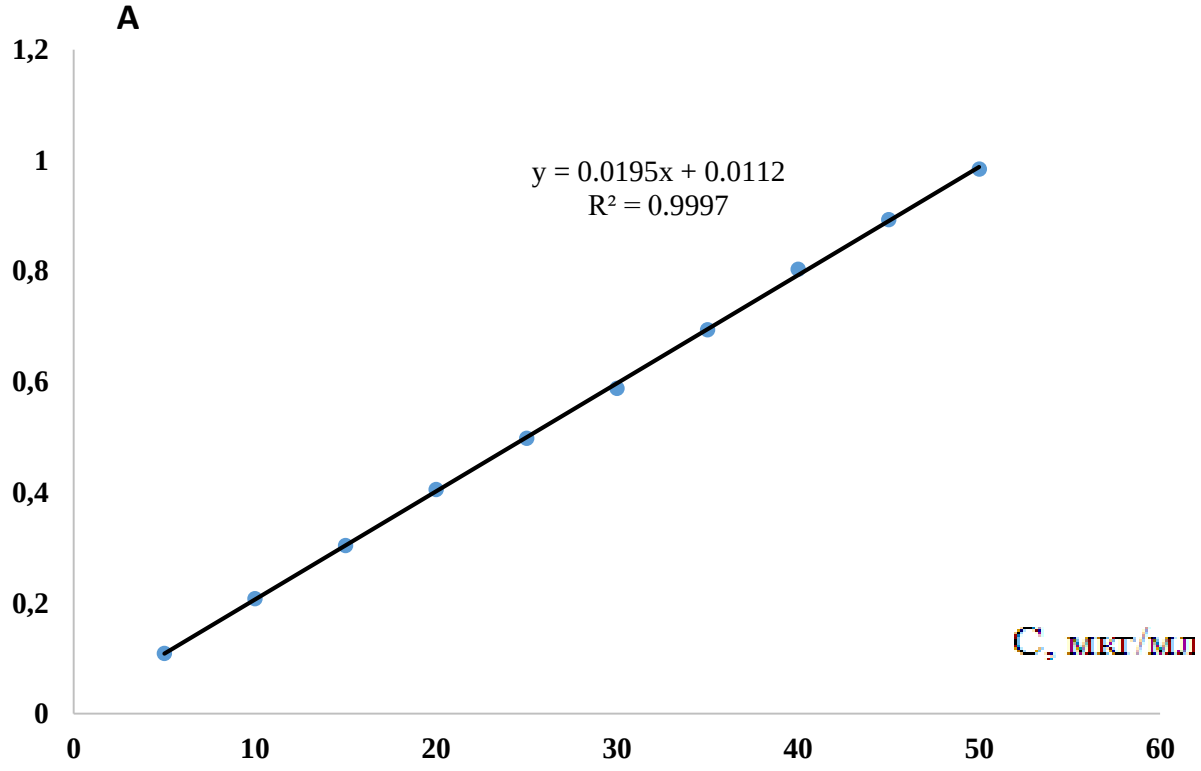
Параметр линейности	VCR	VBL
Коэффициент - a	0.01954	0.01923
Коэффициент - b	0.01120	0.01153
Уравнения регрессии	y=0.0195x+0.0112	y=0.0192x+0.0115
Коэффициент корреляции	0.99985	0.99991
R^2	0.99971	0.99978
S_0^2	5.21836	3.66892
S_b^2	0.00253	0.00178
S_a^2	2.43523	1.71216
S_b	0.05030	0.04218
S_a	1.56052	1.30850
Δb	0.11368	0.09532
Δa	3.52678	2.95720
$X_{ср}$	27.5	27.5
$Y_{ср}$	0.549	0.540
SD	0.00538	0.00438
Предел обнаружения (ПО), мкг/мл	2.108	2.022
Предел количественного определния, мкг/мл	6.389	6.126
$E^{1\,\%}_{1см}$	201.0191	198.0615

Для определения прецизионности методики использовали три серии растворов на трех уровнях концентраций изучаемых веществ 10, 25 и 40 мкг/мл. Результаты представлены в табл. 5 и 6. Полученные при статистической обработке данные, достоверны при доверительной вероятности 95 %. Вычисленные значения RSD и SD не превышают рекомендованного для субстанций и монокомпонентных лекарственных форм критерия приемлемости - 2 % [Валидация аналитических методик для производителей лекарств, 2008], что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Правильность методики определяли методом «введено-найдено» путем добавления точного количества VCR и VBL (в пересчете на активное вещество) в рабочие стандартные растворы препаратов с содержанием 50, 125 и 250 мкг/мл (готовили из растворов А рабочих стандартных образцов). Содержание VBL и VCR в растворах с добавками рассчитали на основе калибровочных графиков (рис. 6 а и б) по формулам 1 и 2. Полученные результаты, представленные в таблицах 7 и 8, позволяют сделать вывод о правильности методики, так как процент восстановления (R, %) должен быть в пределах 98 – 102 % [Валидация аналитических методик для производителей лекарств, 2008].



а



б

Рис. 6. Вид линейной зависимости величины оптической плотности раствора от содержания: а) VBL сульфата (λ_{max} =268 нм); б) VCR сульфата (λ_{max} =295 нм)
Fig. 6. Type of linear dependence of the optical density of the solution on the content: a) VBL sulfate (λmax = 268 nm); b) VCR sulfate (λmax = 295 nm)

Таблица 5
Table 5

Результаты определения прецизионности методики количественного определения VCR сульфата (n=27; P=95 %)
The results of determining the precision of the method of quantitative determination of VCR sulfate (n=27; P=95 %)

Уровень	Взято для анализа (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)	R (%)	$R_{ср}$	SD	RSD, %
1	10	10.30±0.089	103.53	100.08	2.643	2.641
1	10	9.81±0.059	98.10			
1	10	9.79±0.051	97.90			
2	25	24.75±0.030	99.01			
2	25	26.05±0.029	104.20			
2	25	24.79±0.051	99.16			
3	40	39.30±0.078	98.25			
3	40	41.13±0.078	102.83			
3	40	39.10±0.078	97.75			

Таблица 6
Table 6

Результаты определения прецизионности методики количественного определения VBL сульфата (n=27; P=95 %)
The results of determining the precision of the method of quantitative determination of VBL sulfate (n=27; P=95 %)

Уровень	Взято анализа (мкг/мл)	Найдено (мкг/мл)	R (%)	$R_{ср}$	SD, %	RSD, %
1	10	10.13±0.06	101.31	100.17	0.9271	0.9255
1	10	10.15±0.08	101.66			
1	10	10.15±0.08	100.62			
2	25	25.02±0.03	100.16			
2	25	25.13±0.08	100.16			
2	25	25.06±0.12	99.95			
3	40	39.60±0.10	98.75			
3	40	39.69±0.03	99.27			
3	40	39.90±0.06	99.66			

Таблица 7
Table 7

Результаты определения правильности методики количественного определения VBL сульфата (n=24; P=95 %)
The results of determining the correctness of the method of quantitative determination of VBL sulfate (n=24; P=95 %)

№	Взято, (мкг)	Добавлено, (мкг)	Должно быть, (мкг)	Найдено, (мкг)	R, %	$R_{ср}$, %	SD	RSD, %
1	50	200	250	249.36	99.74	$\bar{X}$ =100.32; $\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$ = 100.32±0.9782; ε, %=2.76; $\overline{\varepsilon}$,% =0.98	1.173	1.169
2	50	200	250	249.88	99.95			
3	125	200	325	332.053	102.17			
4	125	200	325	332.053	102.17			
5	250	50	300	300.328	100.11			

Окончание таблицы 7

6	250	50	300	299.288	99.76			
7	250	200	450	446.99	99.33			
8	250	200	450	446.99	99.33			

Таблица 8
Table 8

Результаты определения правильности методики количественного определения VCR сульфата (n=24; P=95 %)
The results of determining the correctness of the method of quantitative determination of VCR sulfate (n=24; P=95 %)

№	Взято, (мкг)	Добавлено, (мкг)	Должно быть, (мкг)	Найдено, (мкг)	R, %	$R_{ср}$, %	SD	RSD, %
1	50	200	250	250.642	100.257	$\bar{X}$ =100.07; $\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$ = 100.07±0.1355; ε, %=0.359; $\overline{\varepsilon,\%}$ =0.135	0.1466	0.1465
2	50	200	250	251.656	100.666			
3	125	200	325	324.842	99.951			
4	125	200	325	325.865	100.266			
5	250	50	300	300.279	100.093			
6	250	50	300	299.767	99.922			
7	250	200	450	450.214	100.05			
8	250	200	450	449.702	99.934			

Теоретическое значение предела обнаружения, установленное по калибровочному графику, сопоставимо с экспериментально вычисленным значением для растворов VCR и VBL сульфатов с содержанием 1.0 мкг/мл (табл. 9).

Таблица 9
Table 9

Пределы обнаружения (ПО) VCR и VBL
VCR and VBL Detection Limits

Препарат	Концентрация исследуемого раствора (мкг/мл)	Оптическая плотность	Теоретический ПО (мкг/мл)	Экспериментально установленный ПО (мкг/мл)
VCR	1.0	0.039±0.002	2.1081	1.4226
VBL	1.0	0.035±0.001	2.0219	1.2205

Робастность методики устанавливали по влиянию pH среды (буферные растворы с pH=3 – 10) на результаты измерений. Результаты, представленные в табл. 10, свидетельствуют о робастности методики. Положение максимума поглощения остается стабильным в интервале от 3.0 до 7.0 единиц pH.

Специфичность методики устанавливали по отсутствию влияния вспомогательных веществ и примесей на результаты определения. В данном случае методика специфична, так как ни растворитель (вода очищенная), ни вспомогательное вещество – лактоза не искажают результат (рис. 7).

Таблица 10
Table 10

Спектральные характеристики растворов VBL и VCR при изменении pH среды
The spectral characteristics of solutions VBL and VCR when the pH of the medium

λ_{max} (нм)	Оптическая плотность* VBL в разных буферных растворах (25мкг/мл)									
	Вода очищенная	pH=3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9	pH=9.3	pH=10
260.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.394
261	-	-	-	-	-	-	-	0.394	0.395	-
266.5	-	-	-	-	-	-	0.392	-	-	-
267	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
267.5	-	0.439	-	-	-	-	-	-	-	-
268	0.492	-	0.452	0.458	-	-	-	-	-	-
269	-	-	-	-	0.448	0.441	-	-	-	-
Оптическая плотность VCR в разных буферных растворах (25мкг/мл)										
295	0.498	-	-	-	-	-	-	-	-	-
295.5	-	0.421	-	0.429	0.495	0.431	-	-	-	-
296	-	-	0.415	-	-	-	0.522	-	-	-
296.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
297.5	-	-	-	-	-	-	-	0.416	0.397	0.430

Примечание: *SD – VLB (± 0.001-0.003); VCR (± 0.001-0.004)

Чистоту препаратов определили по отношению оптической плотности (A) VCR при λ(max)=256 нм к λ(max)=295 нм и при λ(max)=219 нм к λ(max)=295 нм; для VBL при λ(max)=214 нм к λ(max)=268 нм в аналитической области методики (5-50 мкг/мл) (табл. 11).

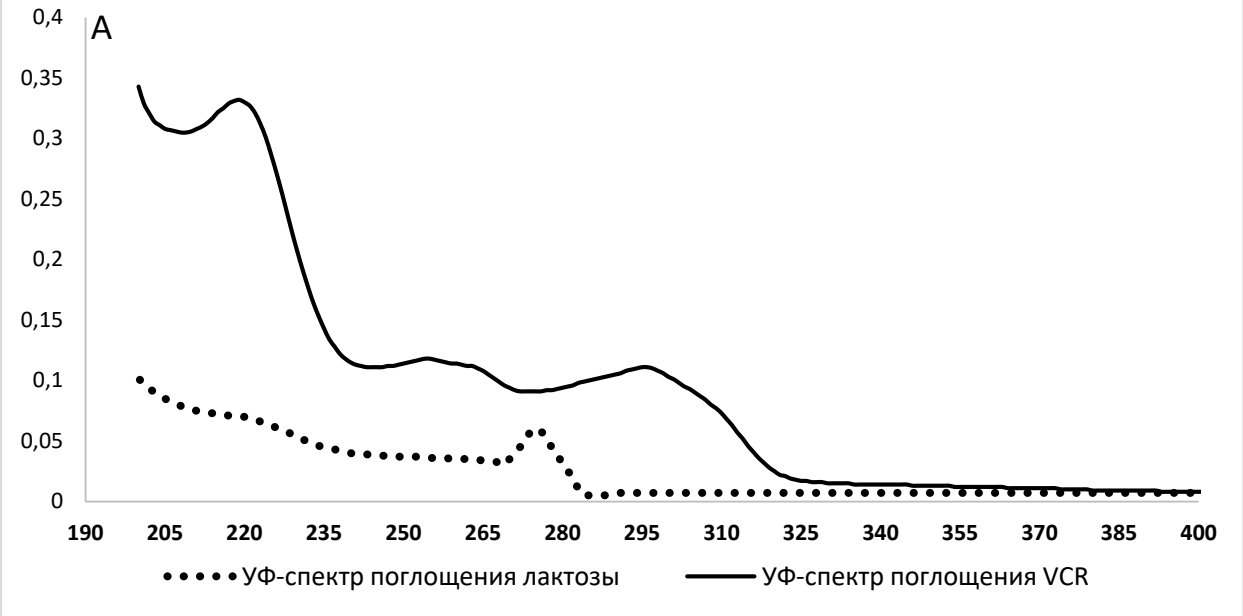


Рис. 7. Определение специфичности методики количественного определения терпено-индольных алкалоидов (на примере VCR)
Fig. 7. Determination of the specificity of the method for quantitative determination of terpene-indole alkaloids (on the example of VCR)

Таблица 11
Table 11

Отношение оптической плотности (А) в максимумах поглощения для VCR и VBL
Optical density ratio (A) at absorption maxima for VCR and VBL

Отношения (А) в λ(max)	Значение
VCR $\lambda_{(max)}$ 256 нм/ $\lambda_{(max)}$ 295 нм	1.0202±0.0182
VCR $\lambda_{(max)}$ 219 нм/ $\lambda_{(max)}$ 295 нм	3.1892±0.1042
VBL $\lambda_{(max)}$ 214 нм/ $\lambda_{(max)}$ 268 нм	3.412±0.1399

Разаработанная методика была апробирована на лекарственных формах VBL и VCR (лиофилизат и раствор для инъекций). Полученные результаты показаны в табл. 12.

Таблица 12
Table 12

Результаты количественного определения VCR и VBL в лекарственных формах
The results of the quantitative determination of VCR and VBL in dosage forms

№ п/п	Объект исследования	А	Взято для анализа, мкг	Найдено, мкг	Содержа-ние, %	Метрологические характеристики Р- 95 %
VBL						
1	Лиофилизат	0.395	1000	997.133	99.7133	$\bar{X}$ = 100.02692 SD = 0.34024 $\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$ =100.027±0.4230 % ξ=0.9456 %
2	Лиофилизат	0.396	1000	999.764	99.976	
3	Лиофилизат	0.398	1000	1004.96	100.496	
4	Лиофилизат	0.397	1000	1002.36	100.236	
5	Лиофилизат	0.395	1000	997.133	99.7133	
VCR						
1	Раствор для инъекций	0.402	1000	999.905	99.9905	$\bar{X}$ = 100.093 SD=0.29173 $\bar{X} \pm \Delta\bar{x}$ = 100.093±0.3627 % ξ=0.81026 %
2	Раствор для инъекций	0.401	1000	997.350	99.7350	
3	Раствор для инъекций	0.404	1000	1005.025	100.5025	
4	Раствор для инъекций	0.402	1000	999.905	99.9905	
5	Раствор для инъекций	0.403	1000	1002.465	100.2465	

Выводы

1. Изучены спектральные характеристики VCR и VBL в УФ-области в воде очищенной, метаноле, 0.1 M NaOH, 0.1 M HCl, фосфатном буферном растворе (pH=5), 95 % этаноле и хлороформе в диапазоне 200–320 нм. Выраженный батохромный сдвиг наблюдается на спектрах исследуемых алкалоидов при использовании в качестве растворителя с наименьшей полярностью – хлороформа. Некоторый гиперхромный эффект наблюдается на спектрах водных и спиртовых растворов винкристина при 295 нм и винбластина при 268 нм.

2. Разработана и валидирована спектрофотометрическая методика качественного и количественного определения VCR и VLB в субстанциях по таким параметрам, как специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, правильность, прецизионность и робастность аналитического метода.

3. На основе полученных калибровочных графиков проведено количественного определения VCR и VLB в лекарственных формах.

4. Представленные результаты могут послужить основой для разработки проектов ФС на фармацевтические субстанции данных алкалоидов для ГФ РФ. Разработанные методики также могут быть использованы для определения винкристина и винбластина сульфатов в лекарственных формах и биологическом материале.

Список литературы
References

1. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. 2008. Под ред. В.В. Береговых. Москва, «Литтерра», 132.

Validatsiya analiticheskikh metodik dlya proizvoditelei lekarstv: tipovoe rukovodstvo predpriyatiya po proizvodstvu lekarstvennykh sredstv. 2008. Pod red. V.V. Beregovykh. Moskva, «Litterra», 132. (in Russian)

2. Государственная фармакопея СССР, 1990. XI выпуск, том 2. М., Медицина: 397.

Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR, [State pharmacopeia of the USSR] XI vypusk, tom 2. M., Medicine: 397. (in Russian)

3. Государственная фармакопея Российской Федерации XII изд. 2008. Часть 1. М., Изд-во: Научный центр экспертизы средств медицинского назначения: 704.

Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii XII izd. 2008. [State pharmacopeia of the Russion Federation] – Chast' 1. - M.: Izd-vo: Nauchnyi tsentr ekspertizy sredstv meditsinskogo naznacheniya: 704. (in Russian)

4. Государственная Фармакопея Российской Федерации. 2015. XIII изд. В 3 т. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации. Режим доступа: http://www.femb.ru/feml.

Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiiskoi Federatsii. 2015. XIII izd. [State pharmacopeia of the Russion Federation]: V 3 t. M.: Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiiskoi Federatsii. Rezhim dostupa: http://www.femb.ru/feml. (in Russian)

5. Гремлих Г.У. 2002. Язык спектров. Введение в интерпретацию спектров органических соединений. Брукер, Оптик: 4–22.

Gremlikh G.U. 2002. Yazyk spektrov. Vvedenie v interpretatsiyu spektrov organicheskikh soedinenii. Bruker, Optik: 4–22. (in Russian)

6. Заборовский А.В., Гуревич К.Г. 2017. Моделирование направленного транспорта лекарственных веществ. Часть I. Однократное ведение. Сибирский онкологический журнал, 1 (16): 59-65.

Zaborovskij A.V., Gurevich K.G. 2017. Modelirovanie napravlennogo transporta lekarstvennyh veshchestv. Chast' I. Odnokratnoe vedenie. [Modeling directional transport of drugs. Part I. Single management]. Sibirskij onkologicheskij zhurnal, 1 (16): 59-65. (in Russian)

7. Заборовский А.В., Гуревич К.Г. 2017. Моделирование направленного транспорта лекарственных веществ. Часть II. Многократное введение. Сибирский онкологический журнал, 2 (16): 36-41.

Zaborovskij A.V., Gurevich K.G. 2017. Modelirovanie napravlennogo transporta lekarstvennyh veshchestv. CHast' II. Mnogokratnoe vvedenie. [Modeling directional transport of drugs. Part II. rt II. Repeated introduction]. Sibirskij onkologicheskij zhurnal, 2 (16): 36-41. (in Russian)

8. Тринеева О.В., Халахакун А.Д., Сливкин А.И., Чупандина Е.Е. 2018. Морфологические и физико-химические свойства эритроцитарных носителей, инкапсулированных терпеноиндольными алкалоидами. Разработка и регистрация лекарственных средств, 1 (22): 10-14.

Trineeva O.V., Halahakun A.D., Slivkin A.I., Chupandina E.E. 2018. Morfologicheskie i fiziko-himicheskie svojstva ehritrocitarnyh nositelej, inkapsulirovannyh terpenoindol'nymi alkaloidami. [Morphological and physico-chemical properties of erythrocyte carriers encapsulated with terpene-indole alkaloids]. Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv, 1 (22): 10-14. (in Russian)

9. Японская фармакопея – 15-е изд. – Хиросима: Национальный институт наук и здоровья, 2007. – С. 1373–1517.

Japonskaja farmakopeja – 15-e izd. – Hirosima: Nacional'nyj institut nauk i zdorov'ja, 2007. – S. 1373–1517.

10. Cimpan G., Gocan S. 2002. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 25: 13-15.
11. Dobson J. 2006. Drug Development Research. 67 (1).
12. European Pharmacopoeia: Supplement, 2008. - 6 rd ed., - Strasbourg: Council of Europe, 3905 p.
13. Hisiger S., Jolicoeur M. 2007. Phytochemistry Reviews, 6: 2-3. Uniyal G.C., Bala S., Mathur A.K., Kulkarni R.N. 2001. Phytochemical Analysis, 12: 3.
14. Ranta V.P., Callaway J.C., Naaranlahti T. 1994. ALKALOIDS. 15: 91-114.
15. Sethi V.S., Kimball J.C.. 1981. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 6: 111-115.
16. United States Pharmacopeia, (USP 29), 2005. 45 (7): 2695-2700.
17. Van Tellingen O., Beijnen J.H., Nooyen W.J. 1991. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 9: 10-12.