

УДК 543:615.2/3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДНЕЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРЕПАРАТЕ “ОКТРЕОТИД” МЕТОДОМ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

И.Н. Глазков, И.А. Ревельский

(кафедра аналитической химии, glazkov@environment.chem.msu.ru)

Получены данные о составе примесей среднелетучих органических соединений в препарате “Октреотид” с использованием сверхкритической флюидной экстракции и хромато-масс-спектрометрии.

Причиной опасности приема лекарственных препаратов может быть наличие различных примесей, обладающих нежелательным фармакологическим и токсикологическим действием, и это действие может быть сильнее положительного эффекта от применения лекарства. Кроме того, примеси могут мешать проявлению фармацевтических свойств лекарственного вещества.

По современным требованиям нижний предел регистрируемых органических примесей в фармацевтических препаратах составляет от 0,05 до 0,1%, в зависимости от препарата. Примеси с концентрацией выше этого уровня должны быть идентифицированы [1]. Определение примесей на более низком уровне (10^{-3} % и ниже) требуется лишь в ряде случаев, однако все более актуальным становится снижение пределов обнаружения в связи с накоплением информации о пагубном влиянии примесей, присутствующих в фармацевтических препаратах даже на уровне 10^{-4} – 10^{-3} %.

В настоящее время органические примеси определяют, как правило, хроматографическими методами, из которых высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) применяется в большинстве случаев при определении средне- и малолетучих веществ [2–5]. Предел обнаружения в стандартных фармакопейных методиках составляет 10^{-2} – 10^{-1} %. Альтернативными методами для решения задачи определения примесей в лекарственных препаратах являются методы высокоэффективной тонкослойной хроматографии [6, 7], газовой хроматографии (ГХ) [8, 9] и реже сверхкритической флюидной хроматографии [10, 11], а также капиллярного электрофореза [12, 13]. Метод ГХ применим в том случае, когда

примеси являются термостабильными и элюируются из колонки без разложения. Необходимо отметить, что подавляющее большинство работ посвящено определению заданных примесей. В случае неизвестных примесей необходимо проведение предварительной идентификации. Идентификация наиболее достоверно осуществляется при использовании сочетания ГХ с масс-спектрометрией (ГХ/МС).

Целью настоящей работы было исследование возможности использования ГХ/МС (ИЭУ) в сочетании с различными методами выделения для определения среднелетучих примесей в фармпрепаратах на примере препарата “Октреотид”.

Исследуемый препарат был закуплен в аптечной сети. Концентрация основного компонента в препарате составляла 0,01%.

Для выделения примесей использовали сверхкритическую флюидную экстракцию, которую проводили с помощью насоса для сверхкритической флюидной экстракции SFE-300 (*Carlo Erba Instruments*, Италия) из ячейки объемом 12 мл. Ячейку с 5 мл исследуемого препарата помещали в установку для сверхкритической флюидной экстракции SFE-30 (*Carlo Erba Instruments*, Италия) и термостатировали в течение 5 мин при 50°C. Далее проводили СФЭ в динамическом варианте сверхкритическим диоксидом углерода при давлении 250 атм. Чистота используемого диоксида углерода составляла 99,995 %. Поток экстрагирующей фазы составлял 1 мл/мин (по жидкости). На выходе из экстракционной системы вещества улавливали сорбционным устройством, которое представляло собой металлическую трубку длиной 4 см и внутренним диаметром 3 мм, наполненную активированным углем, сорбентом Тенакс и сорбен-

* ИЭУ – ионизация электронным ударом.

Т а б л и ц а 1

Предполагаемый состав примесей, выделенных из препарата “Октреотид” методом СФЭ и зарегистрированных методом ГХ/МС (ИЭУ) с использованием библиотеки масс-спектров NIST

Характеристичные ионы	Соединение	Мол. масса	Брутто-формула
55, 69, 83, 97, 111, 168, 196	1-Гексадеканол	242	C ₁₆ H ₃₄ O
73, 55, 185, 228, 282, 97, 129	Неидентифицировано	-	-
60, 73, 129, 185, 228	Миристиновая кислота	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
88, 101, 57, 157, 256, 211	Этиловый эфир тетрадекановой кислоты	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
60, 73, 129, 199, 242	Пентадекановая кислота	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
73, 60, 129, 256, 213	Гексадекановая кислота	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
88, 101, 149, 284	Этиловый эфир гексадекановой кислоты	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
88, 101, 157, 312	Этиловый эфир октадекановой кислоты	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
149, 167, 279, 57, 71, 390	Диизооктиловый эфир 1,2-бензолдикарбоновой кислоты	390	C ₂₄ H ₃₈ O ₄

Т а б л и ц а 2

Предполагаемый состав силирированных примесей, выделенных из препарата “Октреотид” и зарегистрированных методом ГХ/МС (ИЭУ) с использованием библиотеки масс-спектров NIST

Характеристичные ионы	Соединение	Мол. масса	Брутто-формула
147, 247, 189, 134, 219, 289	Третбутилдиметилсилилловый эфир уксусной кислоты	304	C ₁₄ H ₃₂ O ₃ Si ₂
147, 261, 134, 189, 233, 159, 115	Третбутилдиметилсилилловый эфир пропановой кислоты	318	C ₁₅ H ₃₄ O ₃ Si ₂
231, 147, 134, 184, 99, 117, 273	N,N'-бис-(третбутил-диметилсиллил)мочевина	288	C ₁₃ H ₃₂ N ₂ O ₂ Si ₂
305, 134, 184, 147, 117, 247	Неидентифицировано	-	-

том Хромосорбом W с 15% SE-30 в указанном порядке. Зоны различных сорбентов внутри трубки отделялись друг от друга кварцевой ватой. Улавливание определяемых веществ проводили при потоке с направлением от хромосорба W с 15% SE-30 к углю. При термодесорбции поток газа пропускали в обратном направлении.

Для ввода органических соединений в газовый хроматограф сорбционное устройство подключали к газовой линии, идущей из баллона к системе таким образом, чтобы поток газа-носителя входил в нагреваемое до 270°C сорбционное устройство через газовую линию, а выходил через иглу в инжектор хроматографа. Время термодесорбции составляло 9 мин. Примеси

Т а б л и ц а 3

Сводные данные по составу предполагаемых примесей и оценка их содержания в исследуемом растворе

Предполагаемое соединение	Содержание, мкг/мл
1-Гексадеканол	0,003
Неидентифицировано	0,0007
Миристиновая кислота	0,02
Этиловый эфир тетрадекановой кислоты	0,002
Пентадекановая кислота	0,004
Гексадекановая кислота	0,05
Этиловый эфир гексадекановой кислоты	0,009
Этиловый эфир октадекановой кислоты	0,003
Диизооктиловый эфир	0,03
1,2-бензолдикарбоновой кислоты	
Уксусная кислота	0,02
Пропановая кислота	0,2
Мочевина	0,04
Неидентифицировано	0,02

фокусировали в начале капиллярной колонки.

Для обеспечения выделения и хроматографического определения полярных органических соединений средней летучести, газохроматографическое определение которых напрямую затруднительно, была проведена химическая модификация этих соединений с одновременной экстракцией продуктов реакции при использовании МТБСФА*.

Эксперимент проводили следующим образом. Значение рН исследуемого препарата (1 мл) довели до 2 ед. с помощью 2N соляной кислоты, затем упаривали досуха в токе азота. Далее добавляли 20 мкл дихлорметана и также упаривали досуха в токе азота. Операцию повторяли два раза. Затем к остатку добавляли 200 мкл МТБСФА, обрабатывали

в ультразвуковом поле в течение 5 мин и термостатировали при 50°C в течение 1 ч. Полученный раствор центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин, переносили экстракт шприцем в специальную коническую склянку и упаривали в токе азота до 20 мкл. Полученный раствор (1 мкл) анализировали методом ГХ/МС.

Для проведения ГХ/МС-анализа полученных экстрактов использовали масс-спектрометр фирмы *Finnigan* (модель "Incos50") в сочетании с капиллярным газовым хроматографом "Varian-3400". Разделение примесей проводили на капиллярной кварцевой колонке с неподвижной фазой RTX-5 (30 м×0,32 мм×1 мкм) с использованием режима программирования температуры

(50°C(10 мин) → 10°C/мин → 290°C(30 мин)).

Диапазон сканирования составлял 50–500 а.е.м.; температура источника 180°C.

Для проведения идентификации зарегистрированных примесей использовали библиотеку масс-спектров NIST, полученных ионизацией электронным ударом.

Методом ГХ/МС (ИЭУ) был проанализирован весь объем полученного СФЭ экстракта исследуемого препарата с использованием специального сорбционного картриджа. Предполагаемый состав зарегистрированных примесей представлен в табл. 1.

Методом ГХ/МС (ИЭУ) был проанализирован экстракт из исследуемого препарата после проведения реакции силилирования с использованием МТБСФА. Предполагаемый состав зарегистрированных примесей представлен в табл. 2.

В табл. 3 приведены данные по оценке содержания в исследуемом препарате зарегистрированных примесей в мг/мл. Оценку содержания проводили методом внешнего стандарта (нафталин-d₈), при этом допускали, что чувствительность детектирования всех зарегистрированных соединений была одна и та же и что степень извлечения примесей из препарата во всех случаях была одинаковой (100%) для всех зарегистрированных примесей. Реальное содержание примесей может быть больше приведенных значений или равно им.

Как видно из приведенных в табл. 3 данных, с помощью метода ГХ/МС (ИЭУ) и различных методов выделения в образце препарата "Октреотид" зарегист-

* МТБСФА – метилтретсилилфторацетамид.

рировано 13 примесей, две из которых не идентифицированы при использовании общепринятого подхода, основанного на поиске в библиотеке масс-спектров NIST. Оценка содержания зарегистрированных примесей в исследуемом растворе составила от 0,0007 до 0,2 мкг/мл. Следует отметить, что в связи с необходимостью работы с разбавленным водным раствором активного вещества, а не с субстанцией, т.е. вследствие малой величины пробы исследуемого препарата, предел обнаружения используемых методов определения был достаточно высок.

В рамках проведенной работы получены данные о составе примесей среднелетучих органических соединений в препарате “Октреотид” с использованием

различных методов выделения и метода ГХ/МС (ИЭУ). Проведенная идентификация зарегистрированных примесей с использованием экспериментальных масс-спектров и библиотеки масс-спектров NIST показала, что в состав предполагаемых соединений входили карбоновые кислоты и их эфиры, а также мочевины и гексадеканол.

В заключение необходимо еще раз подчеркнуть, что приведенные данные по составу органических примесей являются предварительными и требуют уточнения в дальнейшем.

Работа выполнена в соответствии с контрактом с представительством фирмы “НОВАРТИС ФАРМА СЕРВИСЕЗ ИНК”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Krstulovic A.M., Lee C.R.* // J. Chromatogr. B: Biomed. Appl. 1997. **689**. P. 137.
2. *Arioz F., Yalcin G., Dolen E.* // Chromatographia. 1999. **49**. P. 562.
3. *Szasz G., Budvari-Barany Z., Gyimesi-Forras K.* // J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 1999. **22**. P. 747.
4. *Orwa J.A., Vandenbempt K., Depuydt S., Roets E., Hoogmartens J.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 1999. **20**. P. 745.
5. *Goss J.D.* // J. Chromatogr. 1998. **828 A**. P. 267.
6. *Hopirtean I., Bota A., Hopirtean I., Marutoiu C.* // J. Planar. Chromatogr. Mod. TLC. 1999. **12**. P. 392.
7. *Agbaba D., Djurkovic M., Brboric J., Zivanov-Stakic D.* // J. Planar. Chromatogr. Mod. TLC. 1998. **11**. P. 447.
8. *Iosefzon-Kuyavskaya B.* // Accred. Qual. Assur. 1999. **4**. P. 240.
9. *Mcclure G.L.* // PDA J. Pharm. Sci. Technol. 1999. **53**. P. 129.
10. *Jagota N.K., Nair J.B., Frazer R., Klee M., Wang M.Z.* // J. Chromatogr. A. 1996. **721**. P. 315.
11. *Jagota N.K., Stewart J.T.* // J. Liq. Chromatogr. 1992. **15**. P. 2429.
12. *Jaworska M., Szulinska G., Wilk M., Taut J.* // J. Chromatogr. 1999. **853**. P. 479.
13. *Gotti R., Pomponio R., Andrisano V., Cavrini V.* // J. Chromatogr. 1999. **844**. P. 361.

Поступила в редакцию 27.02.03

CHROMATO-MASS-SPECTROMETRY DETERMINATION OF SEMIVOLATILE ORGANIC COMPOUNDS IN MEDICATION “OCTREOTID”

I.N. Glazkov, I.A. Revel'skii

(Division of Analytical Chemistry; glazkov@environment.chem.msu.ru)

The data of semivolatile impurities composition in medication “Octreotid” using supercritical fluid extraction and chromato-mass-spectrometry