

А. З. Абышев, И. К. Журкович, Э. М. Агаев, А. А. Абдулла-заде,
А. Б. Гусейнов

МЕТОДЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ КАЧЕСТВА СУБСТАНЦИЙ БЕТУЛИНОЛА И ЕГО ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток

В данной статье представлены результаты разработки методов стандартизации субстанций гепатопротекторного препарата бетулинола и его лекарственных форм. При этом, учитывая современный уровень принципиальных требований к аналитическим методам и их валидацию в фармацевтическом анализе лекарственных средств, в разделы “Подлинность”, “Посторонние примеси” и “Количественное определение”, наряду с известными фармакопейными методами, включены такие методы как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и ПМР-спектроскопия. Для обеспечения надежности методик определения содержания основного вещества разработан Государственный стандартный образец (ГСО) субстанций бетулинола, а также установлено время удерживания возможных примесей при измерении хроматограмм модельных смесей — лупеола и бетулиновой кислоты в бетулиноле (не более 1 %). Исходя из полученных экспериментальных данных, установлены конкретные условия определения действующего вещества в субстанции и в лекарственных формах бетулинола, нормированы показатели “Подлинность”, “Посторонние примеси” и “Количественное определение”, составлены соответствующие спецификации на исследуемые препараты, которые включены в соответствующие ФС и ФСП. Разработанные методики могут быть использованы как для научно-исследовательских целей, например, при изучении фармакокинетики рассматриваемых препаратов, так и в производственных процессах при контроле качества указанных препаратов.

Бетулинол-луп-20(29)-ен-3 β ,28-диол (I) является одним из основных компонентов внешнего слоя коры (бересты) *Betula pubescens Ehrh.* (*B. alba L.*). Как химическое соединение он представляет собой пентациклический тритерпеновый спирт лупанового ряда, умеренно растворим в большинстве органических растворителей (около 0,5 – 1,0 %) и практически нерастворим в воде. Изучение физико-химических свойств и строения I проведено многими отечественными и зарубежными авторами в течение последних 200 лет. Впервые он выделен из коры березы в 1788 г. [1] и значительно позже в 1831 г. назван бетулинолом (от лат. *Betula* — Береза). В итоге проведенных многолетних классических исследований установлено, что вторичная гидроксильная группа у хирального углеродного атома в положении 3 имеет β -(S)-конфигурацию. Сравнительно недавно определена абсолютная конфигурация метильных групп в молекуле I с применением таких современных спектральных методов, как ИК-, ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия [2 – 7], установлены его кристаллическая и молекулярная структура [8]. Биологическая активность I также изучалась в течение многих лет [9 – 12]. Ранее в индийской медицине I, лупеол (II) и бетулиновую кислоту (III) использовали в качестве антисептика [9], а позже было показано, что эти компоненты также обладают противоопухолевыми свойствами [10 – 12]. В последние годы противоопухолевая, иммуномодулирующая и анти-ВИЧ активность указанных соединений и их аналогов лупанового ряда отмечена многими исследователями [10 – 21]. В результате проведенных многочисленных исследований было показано, что некоторые

компоненты (особенно I – III и их аналоги) бересты березы имеют чрезвычайно важное лекарственное значение. Однако несмотря на наличие неисчерпаемого источника получения этих соединений, ни один из них до сих пор не внедрен в современную медицинскую практику.

Тем не менее продолжение исследований этих соединений и их синтетических аналогов сохраняет свою актуальность для создания на их основе целого ряда чрезвычайно важных для медицинской практики лекарственных средств.

Исходя из вышеизложенного, к настоящему времени в научно-производственном комплексе “Химия и технология лекарственных препаратов” СПбНИИВС впервые разработаны технологии препаративного производства Государственных стандартных образцов I и III с содержанием основного действующего вещества не менее 99,5 %, субстанции и лекарственных форм (таблетки по 0,04 и 0,08 г, капсулы 0,020 г) — не менее 99,0 %, а также подготовлены соответствующие нормативные документы (ФС, ФСП и лабораторный регламент производства) с включением в них, в основном, традиционных фармакопейных методик (титриметрии, ТСХ, УФ- и ИК-спектроскопии). Кроме того, учитывая современный уровень требований к аналитическим методам и их валидации (пригодности) в фармацевтическом анализе лекарственных средств [22 – 27], в разделы “Подлинность”, “Посторонние примеси” и “Количественное определение”, наряду с вышеуказанными методами, включены такие методы как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и ПМР-спектроскопия. Для обеспечения на-

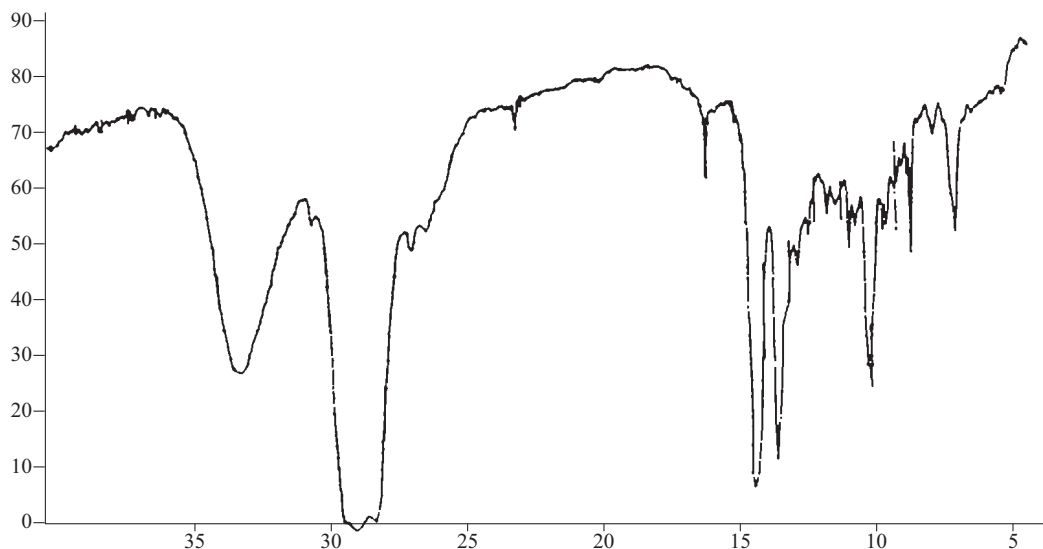
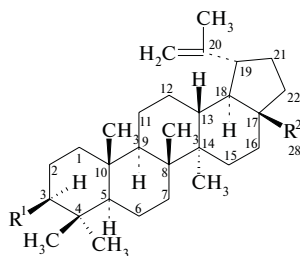


Рис. 1. ИК-спектр субстанции бетулинола в вазелиновом масле в виде суспензии

дежности методик определения содержания основного вещества рекомендуется использование Государственного стандартного образца (ГСО) субстанции I, а также установлено время удерживания возможных примесей при измерении хроматограмм модельных смесей — II и III (не более 0,5 %), которые могут присутствовать в исследуемых препаратах.



- I. Бетулинол — $R^1 = OH, R^2 = CH_2-OH$
 II. Лупеол — $R^1 = OH, R^2 = CH_3$
 III. Бетулиновая кислота — $R^1 = OH, R^2 = COOH$

Экспериментальная часть

ИК-спектры регистрировали на приборе “Spectord-75” в виде суспензии в вазелиновом масле. Спектры ПМР сняты на спектрометрах АС-200 и АМ-500 “Brucker” с рабочей частотой 200,13 МГц, внутренний стандарт ГМДС. ТСХ проводили на пластинках Сорбфил УФ-254 нм (Силикатель СТХ-1А) размером 5×15 см или Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck размером 10×20 см в системе растворителей бензол — этилацетат в соотношении 3:1.

ВЭЖХ-анализы выполнены на жидкостном хроматографе “Gold System” (Beckman) с УФ-детектором модели 168 с диодной матрицей. Рабочая длина волны 200 нм. Колонка из нержавеющей стали ($250 \times 4,6$ мм), упакованная октадецилсиликагелем зернением 5 мкм типа Nucleosil C₁₈, температура колонки $30 \pm 1^\circ C$. Подвижная фаза: ацетонитрил (ТУ 6-09-14-2167-84) — деионизованная вода (95:5), скорость потока 1 мл/мин. Дозируемый объем 20 или 50 мкл. Время регистрации хроматограммы 0 – 40 мин.

Получение фармакопейной субстанции I из сухого экстракта бересты достигается методом кристаллизации из изопропилового спирта. Полученная субстанция содержит не более 2 % посторонних примесей, причем основная из них идентифицирована с помощью ВЭЖХ- и ПМР-спектра заведомого образца как бетулиновая кислота (III). Дополнительная очистка субстанции I методом перекристаллизации из диметилформамида позволяет получить более чистый образец с содержанием I не менее 99,5 %, который может быть зарегистрирован как Государственный стандартный образец (ГСО).

Использованные в ходе исследования методики и результаты их применения послужили основой для разработки разделов “Подлинность”, “Посторонние примеси” и “Количественное определение” стандартов качества на субстанцию I и его лекарственных форм, а также раздела “Посторонние примеси” для ФС на ГСО.

Метрологические параметры хроматографического определения бетулинола (I) в субстанции и лекарственных формах.

Препарат	f	\bar{x}	S^2	s	$S_{\bar{x}}$	P	$t(P, f)$	Δx	$\Delta_{\bar{x}}$	\bar{e}
Субстанция I, %	4	99,0	0,16	0,40	0,18	95	2,78	1,1	0,50	0,51
Таблетки гепатопротектола, мг/таблетка	4	42,0	0,45	0,21	0,10	95	2,78	0,58	0,26	0,62
Капсула гепатопротектола, мг/капсула	4	21,0	0,25	0,50	0,22	95	2,78	1,39	0,62	2,96

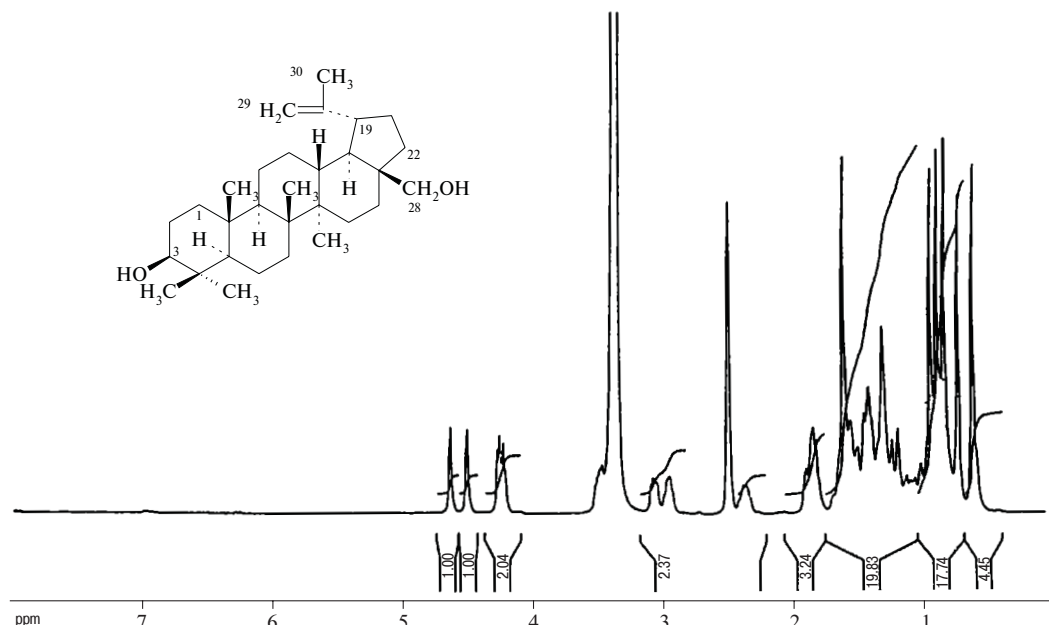


Рис. 2. ПМР-спектр субстанции бетулинола в ДМСО

При определении подлинности основного вещества I в ГСО, субстанции и лекарственных формах, наряду с характерной химической реакцией на пентациклические тритерпеноиды (реакция Либермана – Бухгардта), рекомендуются следующие методы:

1. ИК-спектр препарата, снятый в виде суспензии в вазелиновом масле в области от 400 до 4000 см^{-1} должен иметь полное совпадение полос поглощения с полосами поглощения прилагаемого спектра по положению и относительным интенсивностям полос (рис. 1).

2. Спектр ПМР в области от 0 до 8 м.д. должен иметь набор сигналов, характерных для соответствующих протонов в структуре I (рис. 2).

3. Время удерживания основного пика на хроматограмме раствора препарата, определенного методом ВЭЖХ, должен соответствовать времени удерживания пика ГСО I (9 – 11 мин, рис. 3).

Для анализа возможных посторонних примесей II и III в исследуемых препаратах около 0,025 г (точная навеска) ГСО и субстанцию I помещают в отдельные мерные колбы вместимостью 100 мл и растворяют в ацетонитриле при небольшом нагревании, затем объ-

ем доводят до метки этим же растворителем, перемешивают (испытуемые растворы 1 и 2 соответственно). При определении примесей в лекарственных формах, например в таблетках 0,04 г, около 0,045 г (точная навеска) порошка от 20 растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора до метки ацетонитрилом, энергично встряхивают в течение 40 мин и фильтруют через бумажный фильтр (раствор 3), а в случае капсул 0,1 г (точная навеска) растертого порошка содержимого капсул помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл. Прибавляют 10 мл метанола и растворяют препарат при периодическом встряхивании и нагревании до 30° С в течение 15 – 20 мин. Раствор охлаждают до комнатной температуры и доводят до метки ацетонитрилом. Перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая 10 мл фильтрата (раствор 4). Аналогичным образом готовят раствор стандартного об-

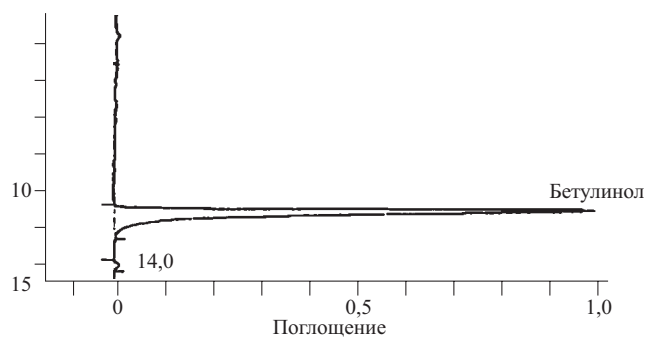


Рис. 3. Хроматограмма ГСО бетулинола с содержанием основного вещества 99,8 %

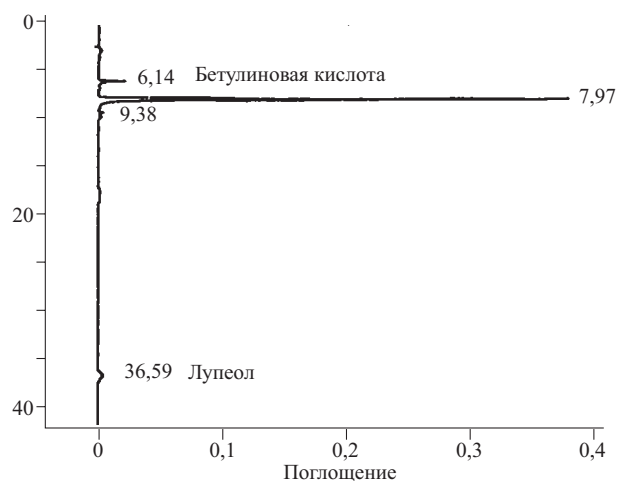


Рис. 4. Хроматограмма модельной смеси — лулеола (1 %) и бетулиновой кислоты (1 %)

разца, используя точную навеску ГСО I около 0,01 г (раствор 5).

При определении посторонних примесей в ГСО и субстанции I в хроматографическую колонку вводят 50 мкл растворов 1 и 2, а в таблетках — 20 мкл раствора 3 и регистрируют хроматограммы с помощью компьютеризированного интегратора, получая не менее 5 хроматограмм в вышеописанных условиях (см. рис. 3) и рассчитывают содержание примесей по формуле:

$$X(\%) = \frac{S_R}{S_T} \cdot 100,$$

где S_R — сумма площадей пиков примесей на хроматограмме испытуемого раствора; S_T — сумма площадей всех пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

Содержание посторонних примесей в исследуемых образцах ГСО должно быть не более 0,5 %, а в субстанции, таблетках и содержимом капсул — не более 1 % (рис. 4 и таблица).

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста “Пригодность хроматографической системы”. Для этого эффективность колонки, рассчитанная по пику ГСО I, должна быть не менее 4000 теоретических тарелок.

Коэффициент асимметрии пика, рассчитанный по пику I, должен быть не менее 0,5 и не более 2,0. При повторных вводах величины относительного стандартного отклонения времени удерживания и площади пика препарата не должны превышать 2 %.

Коэффициент асимметрии (T) рассчитывают по формуле:

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f},$$

где $W_{0,05}$ — ширина пика, определенная на высоте 5 % от базовой линии, мм; f — расстояние от начала пика на высоте 5 % от базовой линии до перпендикуляра, проведенного из его вершины, мм.

Разрешение (R) между двумя пиками определяют по формуле:

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2},$$

где t_{R1} и t_{R2} — время удерживания хроматографических пиков; W_1 и W_2 — ширина соответствующих пиков, мм.

Разрешение между пиками I и вероятных примесей II и III должно быть не менее 1,5.

Положение вероятных примесей II и III на хроматограммах установлено экспериментально с использованием модельной смеси этих веществ и регистрации хроматограмм в течение 40 мин. Времена удерживания III = 6,0 – 6,20 мин, а II = 36,0 – 37,0 мин, тогда как время удерживания I = 8,0 – 11,1 мин (рис. 4).

При количественном определении содержания основного вещества в ГСО I сначала определяют содержание посторонних примесей с использованием раствора 1, как описано выше, а затем рассчитывают его количественное содержание I с учетом содержания примесей и потери в массе при высушивании.

Содержание I в ГСО должно быть не менее 99,5 % в пересчете на сухое вещество.

Содержание основного вещества в субстанции I в процентах (X) и в лекарственных формах (в таблетках и капсулах) в граммах рассчитывают по следующим формулам:

$$1. X(\%) = \frac{SG_0}{S_0a} \cdot 100,$$

где S и S_0 — площади пиков I на хроматограммах растворов испытуемого препарата и ГСО I; a и G_0 — массы навесок испытуемого препарата и ГСО I в г.

Содержание $C_{30}H_{50}O_2$ в субстанции I должно быть не менее 99 %.

$$2. X = \frac{Sm_{cp}\alpha_0 50}{S_0M \cdot 50} = \frac{Sm_{cp}\alpha_0}{S_0M},$$

где S и S_0 — площади пиков I на хроматограммах раствора испытуемого препарата и раствора ГСО I; α_0 — навеска ГСО I, г; m_{cp} — средняя масса одной таблетки, г; M — навеска порошка растертых таблеток, г.

Содержание I в одной таблетке должно составлять от 0,040 до 0,0510 г, считая на среднюю массу одной таблетки.

$$3. X = \frac{S\alpha_0 km}{S_0M \cdot 100},$$

где S и S_0 — площади пиков I на хроматограммах испытуемого раствора и раствора ГСО I; α_0 — навеска ГСО I в граммах при приготовлении раствора стандартного образца; k — содержание I в ГСО в процентах; M — навеска порошка содержимого капсул в граммах; m — средняя масса содержимого капсулы в граммах.

Содержание I в одной капсуле должно быть не менее 0,02 г.

В таблице приведены метрологические характеристики среднего результата количественного определения I в субстанции и в препарате гепатопротектол в таблетках 0,04 г и в капсулах 0,02 г.

Таким образом, в итоге проведенных экспериментальных исследований осуществлена стандартизация и нормирование основных показателей качества субстанции и лекарственных форм бетулинола (I) методами ВЭЖХ, ИК- и ПМР-спектроскопии. Разработанные методики могут быть использованы как для научных целей, например, при изучении фармакокинетики исследуемых препаратов, а также при контроле качества последних.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Н. Кислицын, *Химия древесины*, № 3, 3 – 28 (1994).
2. J. D. Gilbert and C. J. Brooks, *Anal. Lett.*, **6**(7), 639 – 648 (1973).
3. J. M. Lehn and G. Ourisson, *Bull. Sor. Chim. France*, № 6, 1137 – 1142 (1962).
4. J. M. Lehn and A. Vystrcil, *Tetrahedron*, **19**, 1733 – 1745 (1963).
5. M. Sholichin, K. Yamasaki, R. Kasai, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **28**(3), 10006 – 10008 (1980).
6. F. N. Lugemwa, F. Y. Huang, M. D. Bentley, et al., *J. Agric. Food Chem.*, **38**(2), 493 – 496 (1990).
7. D. P. Kumar and M. Manika, *Ind. J. Phys.*, **57A**(3), 182 – 189 (1983).
8. D. H. R. Barton and N. I. Holness, *J. Chem. Soc.*, 78 – 92 (1952).
9. A. K. Batta and S. Ragaswami, *Phytochem.*, **12**, 214 – 216 (1973).
10. S. K. Maurya, S. Devi, V. B. Pandey, et al., *Fitoterapia*, **60**(5), 468 – 469 (1989).
11. J. Liu, C. Zuo, and Zhiwu Xuebao, *Acta bot. Sin.*, **29**(1), 84 – 87 (1987).
12. K. Seth and E. Bianchi, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 139 (1973).
13. K. Seth, S. Joiland, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 1819 (1972).
14. K. Kahlos, L. Kangas, and R. Hulten, *Acta Pharm. Fenn.*, **96**, 33 (1987).
15. D. H. Miles and U. Kokpol, *J. Pharm. Sci.*, **63**, 613 (1974).
16. F. A. Tomas-Barberan and K. A. Hostettman, *Planta Med.*, **54**(3), 266 – 267 (1988).
17. T. Konoshima, M. Takasaki, and M. Kozuka, *J. Nat. Prod.*, **50**(6), 1167 – 1170 (1987).
18. H. Jamaguchi, M. Sugomoto, T. Murakami, et al., *Patent Japan*, 01143832[89143832].
19. T. Fujioka, Y. Kashiwada, R. Kiluske, et al., *J. Nat. Prod.*, **57**(2), 243 – 247 (1994).
20. K. Sheth, E. Bianchi, R. Wiedhopf, et al., *J. Theoretic. Pharm.*, **62**(1), 139 – 144 (1973).
21. K. Yasukawa, M. Takido, T. Matsumoto, et al., *Oncology*, № 48, 72 – 76 (1991).
22. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Washington (1994).
23. United States Pharmacopoeia Validation of compendial methods, USP26-NF21 (2003).
24. J. M. Green, *A Practical Guide to Analytical Method Validation. Analytical Chemistry News and Features (1996)*, pp. 305A – 309A.
25. *British Pharmacopoeia* (2001), Vol. 11, Appendix III, pp. A141 – A144.
26. C. M. Riley, T. W. Rosanske, *Development and Validation of Analytical Methods*, Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis, USA, New York, Vol. 3 (1996).
27. Н. А. Эпштейн, *Хим.-фарм. журн.*, **38**(4), 40 – 56 (2004).

Поступила 04.11.04

METHODS OF STANDARDIZATION OF THE QUALITY OF BETULENOL PARENT SUBSTANCE AND ITS READY-TO-USE MEDICINAL FORMS

A. Z. Abyshiev, I. K. Zhurkovich, E. M. Agaev, A. A. Abdulla-zade, and A. B. Guseinov

St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera, St. Petersburg, Russia

The results of the development of methods for the standardization of the hepatoprotector betulenol and its ready-to-use medicinal forms are presented. Taking into account the modern level of requirements to the analytical methods and their validation for the pharmaceutical analysis of medicinal products, the pharmacopoeial articles "Identity," "Foreign Impurities," and "Quantitative Determination" include (together with the well-known methods) some more objective techniques such as HPLC and NMR spectroscopy. For ensuring the reliability of the quantitative determination of the parent substance, the State Standard Sample (SSS) of betulenol is proposed. The retention times of the possible impurities (lupeol and betulinic acid) are established by measuring the chromatograms of model mixtures of these compounds (below 1 %) with Betulenol. Based on the obtained data, the conditions of the quantitative determination of betulenol in the parent substance and the related ready-to-use medicinal forms are established and the requirements for the "Identity," "Foreign Impurities," and "Quantitative Determination" pharmacopoeial articles of are formulated. The proposed methods can be used in studying the pharmacokinetics of betulenol and related drugs, in monitoring the technological processes, and in assessing the quality products.