

Определение ванкомицина В и родственных примесей ванкомицина с использованием жидкостной хроматографии

С. И. Кулешова*, Е. П. Симонова, О. Н. Высочанская

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Резюме. При оценке качества лекарственных средств по содержанию родственных примесей предпочтительным является использование методов высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением мелкодисперсного сорбента и ультраэффективной жидкостной хроматографии (УЭЖХ), которые позволяют повысить эффективность хроматографического разделения действующих веществ и их родственных примесей, уменьшить временные затраты, оптимизировать использование материальных ресурсов. **Цель работы:** разработка методик определения основного компонента ванкомицина и его родственных примесей с применением ВЭЖХ и УЭЖХ для оптимизации проведения испытаний с оценкой разделительной способности хроматографической системы и ее эффективности.

Материалы и методы: в качестве объекта исследований использовали препарат ванкомицина гидрохлорида в форме лиофилизата для приготовления раствора для инъекций и приема внутрь и стандартный образец ванкомицина гидрохлорида квалификации USP RS. Испытания проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity с использованием хроматографических колонок Chromolith® Performance RP-18e, Kinetex C18, Nucleodur C18 Isis, Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 и LiChrospher® RP-18. **Результаты:** при проведении анализа методом ВЭЖХ с использованием колонки Chromolith® (100×4,6 мм) время анализа сокращается на 10 мин по сравнению с методикой, описанной в Фармакопее США, и на 15 мин по сравнению с методикой, описанной в Британской фармакопее. Предлагаемая методика требует меньшего расхода элюента при возрастании эффективности хроматографического разделения. Применение УЭЖХ с использованием колонки Kinetex C18 (50×4,6 мм, 2,6 мкм) позволило сократить время анализа в 3 раза по сравнению с методикой, описанной в Британской фармакопее, и использовать изократическое элюирование, что значительно упростило анализ. Время анализа в предлагаемых условиях хроматографирования составило 10 мин. **Выводы:** выбраны условия проведения испытания для методик ВЭЖХ и УЭЖХ, которые позволили значительно уменьшить время анализа, свести к минимуму расход дорогостоящих реагентов, увеличить эффективность хроматографического разделения при определении родственных примесей ванкомицина и его основного компонента — ванкомицина В.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография; ультраэффективная жидкостная хроматография; ванкомицина гидрохлорид; ванкомицин В; родственные примеси

Для цитирования: Кулешова СИ, Симонова ЕП, Высочанская ОН. Определение ванкомицина В и родственных примесей ванкомицина с использованием жидкостной хроматографии. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2021;11(4):246–254. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-4-246-254>

* **Контактное лицо:** Кулешова Светлана Ивановна; Kuleshova@expmed.ru

Determination of Vancomycin B and Vancomycin Impurities by Liquid Chromatography

S. I. Kuleshova*, E. P. Simonova, O. N. Vysochanskaya

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. The preferred test methods for control of product-related impurities in medicinal products are high-performance liquid chromatography (HPLC) with a fine sorbent, and ultra-performance liquid chromatography (UPLC), which allow for better chromatographic separation of active substances and related impurities, reduction of time costs, and saving of material resources.

The aim of the study was to develop HPLC and UPLC test procedures and assess the chromatographic separation capacity and efficiency in order to improve determination of the main vancomycin component and related impurities. **Materials and methods:** vancomycin hydrochloride lyophilisate for oral solution and solution for injection, and vancomycin hydrochloride reference standard (USP RS) were used as test objects. Agilent 1290 Infinity liquid chromatography system, and Chromolith® Performance RP-18e, Kinetex C18, Nucleodur C18 Isis, Zorbax RRHD Eclipse Plus C18, and LiChrospher® RP-18 columns were used for the testing.

Results: HPLC analysis using a Chromolith® column (100×4.6 mm) reduces the testing time by 10 minutes compared to the USP test procedure, and by 15 minutes compared to the British Pharmacopoeia procedure. The proposed test procedure requires less eluent and increases chromatographic separation efficiency. UPLC analysis using a Kinetex C18 column (50×4.6 mm, 2.6 μm) made it possible to reduce the testing time by two thirds compared to the British Pharmacopoeia procedure. The use of isocratic elution greatly simplified the testing. The testing time under the proposed chromatographic conditions was 10 minutes. **Conclusions:** the selected HPLC and UPLC test conditions made it possible to significantly reduce the time of testing, minimise the use of expensive reagents, and increase efficiency of chromatographic separation in the determination of vancomycin impurities and the main component Vancomycin B.

Key words: high-performance liquid chromatography; ultra-performance liquid chromatography; vancomycin hydrochloride; vancomycin B; product-related impurities

For citation: Kuleshova SI, Simonova EP, Vysochanskaya ON. Determination of vancomycin B and vancomycin impurities by liquid chromatography. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(4):246–254. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-4-246-254>

* **Corresponding author:** Svetlana I. Kuleshova; Kuleshova@expmed.ru

При разработке новых методик и совершенствовании подходов к анализу лекарственных средств (ЛС) особое внимание уделяется оценке качества ЛС по содержанию родственных примесей, продуктов деструкции и технологических примесей. Для контроля примесей, как правило, используются хроматографические методы, в частности метод жидкостной хроматографии [1]. В последние годы активно разрабатываются и включаются в нормативные документы на ЛС методики с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением мелкодисперсного (до 3 мкм) сорбента и ультраэффективной жидкостной хроматографии (УЭЖХ). Такие методики позволяют повысить эффективность хроматографического разделения действующих веществ и их родственных примесей, уменьшить временные затраты, оптимизировать использование материальных ресурсов [2, 3]. В связи с этим актуально проведение работ по совершенствованию методик определения действующих веществ и их примесей на основе метода ВЭЖХ. В лаборатории антибиотиков Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России было проведено исследование по разработке таких методик на примере антибиотика ванкомицина.

Ванкомицин, впервые выделенный в 1953 г. Э. Корнфельдом, представляет собой трициклический антибиотик группы гликопептидов, продуцируемый штаммом *Amycolatopsis orientalis* [4]. Для производства ЛС этот антибиотик используется в форме соли ванкомицина гидрохлорида. Препараты ванкомицина нашли широкое применение в лечебной практике за счет своего бактерицидного действия на большинство грамположительных микроорганизмов, а именно стафилококков, в том числе пенициллиназообразующие и метициллин-резистентные штаммы, а также стрептококков, включая штаммы, устойчивые к пенициллину [5].

Лекарственные препараты ванкомицина применяются для лечения таких угрожающих жизни заболеваний, как бактериальный эндокардит, сепсис, остеомиелит, менингит, пневмония, абсцесс легких, стафилококковый энтероколит, что особенно важно для пациентов, имеющих аллергию на пенициллиновые и цефалоспориновые антибиотики. Кроме того, согласно исследованиям российских ученых, ванкомицин является высокоэффективным препаратом при лечении больных с термической травмой, осложненной инфекцией, вызванной

грамположительными микроорганизмами [6]. Учитывая широкую область применения препаратов ванкомицина, существенное значение имеет оценка их качества по содержанию родственных примесей. В Британской фармакопее (BP) и Фармакопее США (USP) для определения ванкомицина В (основной компонент ванкомицина) и примесей ванкомицина рекомендовано использование метода ВЭЖХ¹. В 10 изд. Европейской фармакопее предложен метод УЭЖХ с использованием градиентной программы, рассчитанной на анализ в течение 37 мин (45 мин с учетом возврата на исходные соотношения подвижных фаз и уравнивание хроматографической колонки)². Методика определения концентрации ванкомицина с использованием УЭЖХ предложена для проведения терапевтического лекарственного мониторинга и позволяет быстро и эффективно с минимальными затратами определить содержание препарата в сыворотке крови [7]. Исследователями К. Nirmala и соавт. была разработана методика, позволяющая сократить время хроматографирования в несколько раз [8], однако в данной работе не приводится оценка разделительной способности хроматографической системы, что затрудняет анализ профиля примесей ЛС ванкомицина. Благодаря применению УЭЖХ описываемый способ оказался не только экономичным по времени и материальным затратам, но и высокочувствительным.

Цель работы — разработка методик определения основного компонента ванкомицина и его родственных примесей с применением ВЭЖХ и УЭЖХ для оптимизации проведения испытаний с оценкой разделительной способности хроматографической системы и ее эффективности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследований использовали препарат ванкомицина гидрохлорида в форме лиофилизата для приготовления раствора для инъекций и приема внутрь и стандартный образец ванкомицина гидрохлорида квалификации USP RS, серия которого была валидна на момент проведения испытаний.

Испытания проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, США), позволяющем работать как в режиме ВЭЖХ, так и в режиме УЭЖХ и оборудованном следующими модулями: градиентным двухканальным насосом, обладающим возможностью производить

¹ Vancomycin Hydrochloride. United States Pharmacopoeia. USP 43–NF 38. Rockville, MD; 2020.

Monographs: Vancomycin Hydrochloride. British Pharmacopoeia. London; 2013.

² Monograph 07/2019:1058 Vancomycin Hydrochloride. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: EDQM; 2019.

смешение четырех различных элюентов с максимальной скоростью потока 5 мл/мин (максимальное давление 1200 бар), диодно-матричным детектором (G4212A) с диапазоном длин волн 190–640 нм, термостатируемым колоночным отделением.

При разработке методики с использованием ВЭЖХ был выбран градиентный режим элюирования, а с использованием УЭЖХ — изократический. Для приготовления подвижной фазы использовали буферный раствор, описание которого приведено в ВР³: 4,0 мл триэтиламина (99,5%, Merck) растворили в 2 л воды очищенной, pH раствора доводили до значения 3,2 с помощью концентрированной фосфорной кислоты (85%, Sigma-Aldrich). В качестве других компонентов подвижной фазы использовали тетрагидрофуран (99,9%, Merck) и ацетонитрил (99,9%, Thermo Fisher Scientific) в различных соотношениях.

В ходе разработки методики ВЭЖХ была выбрана колонка Chromolith® Performance RP-18e (Merck, Германия), характеризующаяся уникальной жесткой монокристаллической структурой, позволяющей проводить анализ с большей скоростью элюента и меньшим давлением по сравнению с набивными хроматографическими колонками. Пористая структура кварцевого стержня колонки Chromolith® представляет собой совокупность макро- и мезопор, поверхность которых модифицирована октадецилсианом. Далее по тексту статьи методику с колонкой Chromolith® обозначили ВЭЖХ/Chr. Для оценки влияния неподвижной фазы на результаты анализа при использовании УЭЖХ испытание проводили на хроматографических колонках: Kinetex C18 (Phenomenex, США), Nucleodur C18 Isis (Macherey-Nagel, Германия), Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, США). При анализе по методикам ВР и USP использовали колонку

LiChrospher® RP-18 (Merck, Германия). Подробные характеристики хроматографических колонок приведены в таблице 1.

В соответствии с требованиями ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»⁴ полученные результаты сравнивали с результатами, полученными по валидированным методикам USP и ВР⁵. Методики, изложенные в данных монографиях, по основным параметрам сходны и отличаются только скоростью потока и программой подачи подвижных фаз.

Хроматографические условия, указанные в монографиях «Ванкомицина гидрохлорид» фармакопей USP и ВР:

- колонка: LiChrospher® RP-18 (250×4,6 мм, 5 мкм);
- объем вводимой пробы: 20 мкл;
- скорость потока подвижной фазы: согласно требованиям USP — 2,0 мл/мин, согласно требованиям ВР — 1,0 мл/мин;
- температура колонки: 20 °С;
- детектирование при длине волны 280 нм;
- подвижная фаза А: смесь буферного 0,2% раствора триэтиламина pH 3,2, тетрагидрофурана и ацетонитрила в объемном соотношении 92:1:7;
- подвижная фаза В: смесь буферного 0,2% раствора триэтиламина pH 3,2, тетрагидрофурана и ацетонитрила в объемном соотношении 70:1:29.

Режим градиентного элюирования по USP: первые 12 мин — 100% подвижной фазы А в изократическом режиме, затем линейное изменение концентрации элюента до 100% элюента В за 10 мин, затем выдержка 1 мин при 100% элюента В, возврат к 100% элюента А за 7 мин.

Режим градиентного элюирования по ВР: первые 13 мин — 100% подвижной фазы А, затем линейное изменение концентрации элюента до 100%

Таблица 1. Характеристики хроматографических колонок

Table 1. Characteristics of chromatographic columns

Колонка Column	Геометрические размеры Geometry				Степень покрытия (доля углерода), % Coverage (carbon), %	Площадь по- верхности, м ² /г Surface area, m ² /g
	Длина, мм Length, mm	Диаметр, мм Diameter, mm	Размер, мкм Size, μm			
			частиц particles	макропор/мезопор macropores / mesopores		
LiChrospher® RP-18	250	4,6	5	—	21	350
Chromolith® RP-18e	100	4,6	—	2/0,013	—	—
Kinetex C18	50	4,6	2,6	—	12	200
Nucleodur C18 Isis	50	4,6	1,8	—	20	340
Zorbax Eclipse Plus C18	50	2,1	1,8	—	9	160

Примечание. «—» — не применимо.
Note. — not applicable.

³ Monographs: Vancomycin Hydrochloride. British Pharmacopoeia. London; 2013.

⁴ Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

⁵ Vancomycin Hydrochloride. United States Pharmacopoeia. USP 43—NF 38. Rockville, MD; 2020.
Monographs: Vancomycin Hydrochloride. British Pharmacopoeia. London; 2013.

элюента В за 8 мин, выдержка 4 мин при 100% элюента В, возврат к 100% элюента А за 10 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке методики с использованием хроматографической колонки Chromolith® выбранные за основу условия проведения испытаний (USP/ВР) были модифицированы: в составе подвижной фазы А увеличено количество буферного раствора на 2,0% и настолько же уменьшено содержание ацетонитрила. Для достижения разрешения R_s не менее 1,5⁶ между пиками ванкомицина В и его ближайшей примеси была разработана градиентная программа элюирования продолжительностью 20 мин с учетом времени возврата к исходным условиям и уравнивания хроматографической колонки. Предлагаемые условия анализа методом ВЭЖХ:

– колонка: Chromolith® Performance RP-18e (100×4,6 мм);

– объем вводимой пробы: 20 мкл;

– скорость потока подвижной фазы: 1,0 мл/мин;

– температура колонки: 20 °С;

– детектирование при длине волны 280 нм;

– подвижная фаза А: смесь буферного 0,2% раствора триэтиламина рН 3,2, тетрагидрофурана и ацетонитрила в объемном соотношении 94:1:5;

– подвижная фаза В: смесь буферного 0,2% раствора триэтиламина рН 3,2, тетрагидрофурана и ацетонитрила в объемном соотношении 70:1:29.

Использовали градиентный режим подачи подвижной фазы (табл. 2).

Для сравнения фармакопейных методик и разработанной методики на колонке Chromolith® проведено хроматографирование раствора для проверки пригодности хроматографической системы (РППХС), приготовленного следующим образом: раствор стандартного образца ванкомицина гидрохлорида с концентрацией 0,5 мг/мл подвергали разделению в течение 48 ч при температуре 65 °С в сушильном шкафу ED23 (Binder GmbH, Германия). Результаты представлены на рисунке 1.

При использовании колонки Chromolith® время анализа сокращается на 10 мин по сравнению с методикой USP и на 15 мин по сравнению с методи-

кой ВР. В то же время благодаря более низкой скорости потока подвижной фазы предлагаемая методика ВЭЖХ/Chг требует меньшего расхода элюента, чем существующие фармакопейные методики, при этом эффективность хроматографического разделения значительно возрастает. Увеличивается количество пиков примесей при сохранении относительного содержания ванкомицина В, вычисленного методом нормализации (%) в анализируемой пробе стандартного образца ванкомицина гидрохлорида. Содержание ванкомицина В в РППХС, определенное по методике ВЭЖХ/Chг — 84,0%, по методике USP — 84,0%, по методике ВР — 87,0%, но в последнем случае количество пиков примесей на полученной хроматограмме (рис. 1а) меньше, чем на хроматограммах (рис. 1б) и (рис. 1с). Предложенные нами условия хроматографирования с использованием метода ВЭЖХ/Chг позволяют оценить возможное содержание родственных примесей в ЛС ванкомицина, что подтверждается соответствием критериев приемлемости при тестировании хроматографической системы (табл. 3).

При разработке методики с использованием УЭЖХ был апробирован двухкомпонентный элюент, также состоящий из подвижной фазы А и В в соотношении 75:25, со следующими условиями анализа:

– объем вводимой пробы: 2 мкл;

– скорость потока подвижной фазы: 0,5 мл/мин;

– температура колонки: 20 °С;

– детектирование при длине волны 280 нм;

– подвижная фаза А: смесь буферного 0,2% раствора триэтиламина рН 3,2, и тетрагидрофурана в объемном соотношении 99:1;

– подвижная фаза В: смесь буферного 0,2% раствора триэтиламина рН 3,2, тетрагидрофурана и ацетонитрила в объемном соотношении 70:1:29.

Анализ был проведен в изократическом режиме элюирования.

Предлагаемая методика УЭЖХ была опробована с применением нескольких колонок, а именно: Kinetex C18, Nucleodur C18 Isis и Zorbax Eclipse Plus C18, которые находятся в одной группе хроматографических колонок классификации USP (L1). Подвижная фаза, объем вводимой пробы

Таблица 2. Программа градиентной подачи подвижных фаз для анализа ванкомицина гидрохлорида с использованием колонки Chromolith®

Table 2. Mobile phase gradient programme for Vancomycin hydrochloride determination using a Chromolith® column

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, % Mobile phase A, %	Подвижная фаза В, % Mobile phase B, %
0	100	0
8	100	0
13	98	2
16	100	0
20	100	0

⁶ ОФС.1.2.1.2.0001.15 Хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

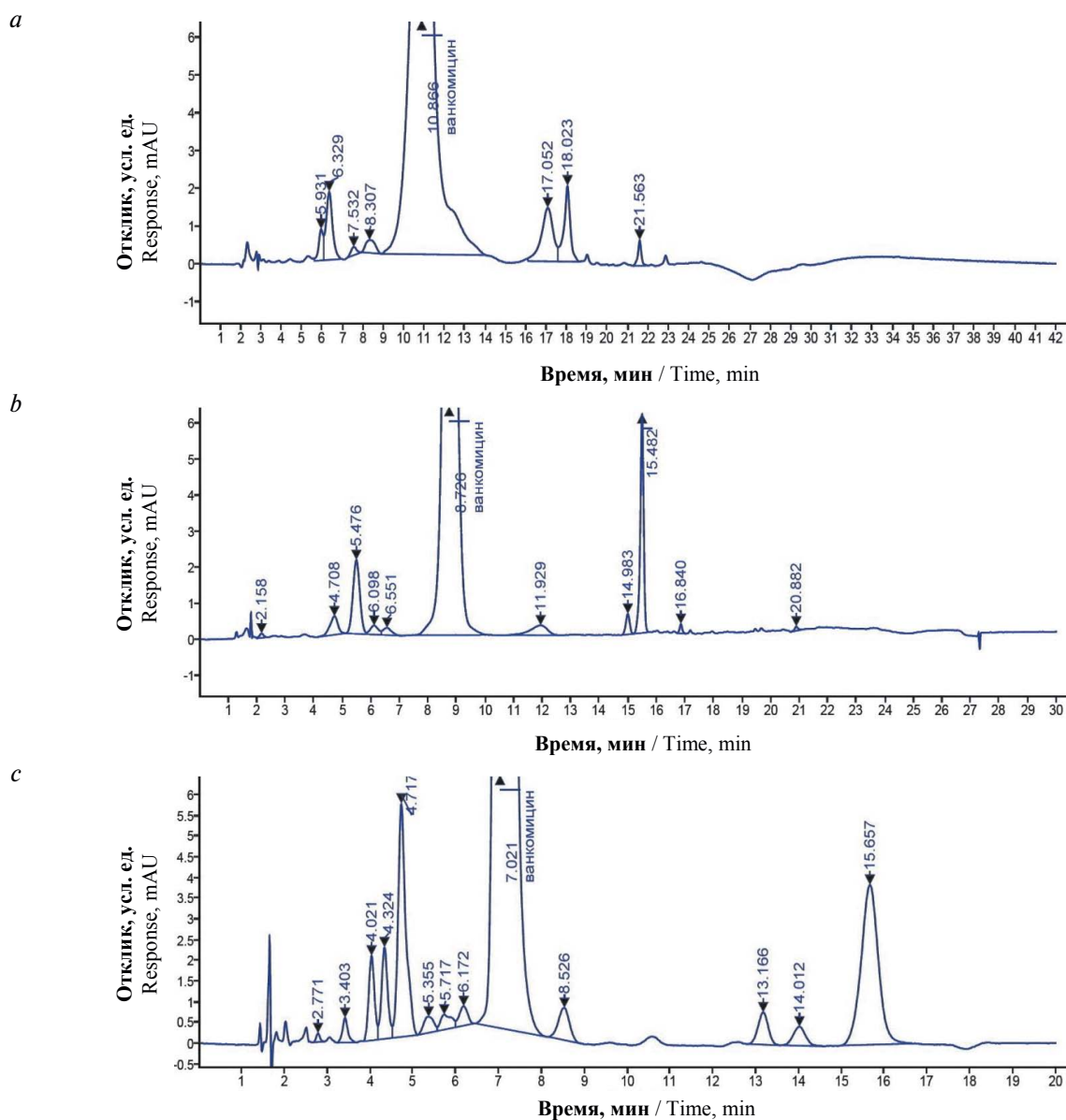


Рис. 1. Хроматограммы раствора для проверки пригодности хроматографической системы, полученные по методике Британской фармакопеи (а), Фармакопеи США (б) и методике ВЭЖХ/Chr (с). Условия анализа указаны в тексте

Fig. 1. Chromatograms of the system suitability solution, obtained according to the British Pharmacopoeia (a), the United States Pharmacopoeia (b), and HPLC/Chr (c) procedures. The test conditions are specified in the text

Таблица 3. Сравнение критериев приемлемости предлагаемой методики ВЭЖХ/Chr и методик Британской фармакопеи (BP) и Фармакопеи США (USP)

Table 3. Comparison of the acceptance criteria of the proposed HPLC/Chr procedure and the British Pharmacopoeia (BP) and United States Pharmacopoeia (USP) procedures

Методика Procedure	Фактор асимметрии пика ванкомицина В Tailing factor for Vancomycin B	Эффективность (N) по пика ванкомицина В Column efficiency (N) at Vancomycin B peak	Разрешение между пиками ванкомицина В и его ближайшей примесью Resolution between the peaks of Vancomycin B and its nearest impurity
BP	1,0	1806	2,6
USP	1,4	2134	2,8
ВЭЖХ/Chr HPLC/Chr	1,5	2813	1,9

Примечание. N — число теоретических тарелок.
Note. N—number of theoretical plates.

и длина волны детектора оставались неизменными. Для того чтобы время удерживания ванкомицина В при использовании заявленных колонок практически не изменялось, было произведено изменение скорости потока в соответствии с различием в геометрических размерах применяемых колонок.

Скорость подвижной фазы:

- для колонки Kinetex C18 (50×4,6 мм, 2,6 мкм) — 0,50 мл/мин,
- для колонки Nucleodur C18 (50×4,6 мм, 1,8 мкм) — 0,35 мл/мин,
- для колонки Zorbax Eclipse Plus C18 (50×2,1 мм, 1,8 мкм) — 0,16 мл/мин.

Результаты хроматографирования раствора для проверки пригодности хроматографической системы представлены на рисунке 2.

Проведенный сравнительный анализ нескольких сорбентов показал вариативность разработанной методики, которая проявляется в возможности использования различных хроматографических колонок. На рисунке 2 показано, что профиль всех хроматограмм достаточно близок друг к другу, а пики примесей хорошо разделены и симметричны. Однако хроматографическая колонка Kinetex C18 (50×4,6 мм, 2,6 мкм) имела наибольшую эффективность и более высокую разрешающую способность в приведенных условиях анализа (табл. 4).

При сравнении параметров пригодности хроматографической системы показано, что методика УЭЖХ соответствует фармакопейной методике ВЭЖХ (табл. 4).

Применение УЭЖХ с использованием хроматографической колонки с сорбентом, подходящим для работы в данных условиях (Kinetex C18), и выбор оптимального соотношения компонентов подвижной фазы позволили сократить время анализа в 3 раза по сравнению с методикой, описанной в монографиях ВР и USP. Применение изократического элюирования значительно упрощает анализ, а также исключает дополнительные временные затраты, необходимые для возврата к исходному компонентному составу подвижной фазы и уравниванию сорбента после разделения. Таким образом, время, необходимое для анализа примесей ванкомицина, в заданных условиях составило 10 мин.

Пригодность разработанных методик оценивали по результатам хроматографирования раствора лекарственного препарата ванкомицина (рис. 3).

Содержание ванкомицина В, максимальной единичной примеси и суммы примесей рассчитывали методом внутренней нормализации по пяти последовательным хроматограммам. Полученные результаты сравнивали с результатами анализа, полученными по методике ВЭЖХ (USP) (табл. 5).

Таблица 4. Сравнение критериев пригодности методики УЭЖХ с использованием различных колонок, а также методики, описанной в Британской фармакопее

Table 4. Comparison of the acceptance criteria of the UPLC procedure using different columns and the British Pharmacopoeia procedure

Колонка Column	Фактор асимметрии пика ванкомицина В Tailing factor for Vancomycin B	Эффективность (N) по пика ванкомицина В Column efficiency (N) at Vancomycin B peak	Разрешение между пиками ванкомицина В и его ближайшей примеси Resolution between the peaks of Vancomycin B and its nearest impurity
LiChrospher® RP-18 (ВЭЖХ / HPLC)	1,0	1806	2,6
Kinetex C18 (УЭЖХ / UPLC)	1,2	5523	4,5
Nucleodur C18 Isis (УЭЖХ / UPLC)	1,3	3299	1,8
Zorbax Eclipse Plus C18 (УЭЖХ / UPLC)	1,7	2589	1,1

Примечание. N — число теоретических тарелок.
 Note. N—number of theoretical plates.

Таблица 5. Содержание ванкомицина В и родственных примесей ванкомицина, рассчитанное по хроматограммам, полученным по методикам ВЭЖХ, ВЭЖХ/Chr и УЭЖХ

Table 5. Content of vancomycin B and vancomycin impurities calculated from chromatograms obtained by the HPLC, HPLC/Chr and UPLC procedures

Метод Procedure	Среднее содержание ванкомицина В, % Vancomycin B average content, %	Единичная примесь, % Single impurity, %	Сумма примесей, % Total impurities, %	Относительное стандартное отклонение (RSD), % Relative standard deviation (RSD), %, of	
				площади пика ванкомицина В Vancomycin B peak area	времени удерживания ванкомицина В Vancomycin B retention time
ВЭЖХ HPLC	92,97	1,57	7,03	0,41	0,14
ВЭЖХ/Chr HPLC/Chr	92,66	1,49	7,34	0,07	0,07
УЭЖХ UPLC	92,13	1,49	7,87	0,25	0,10

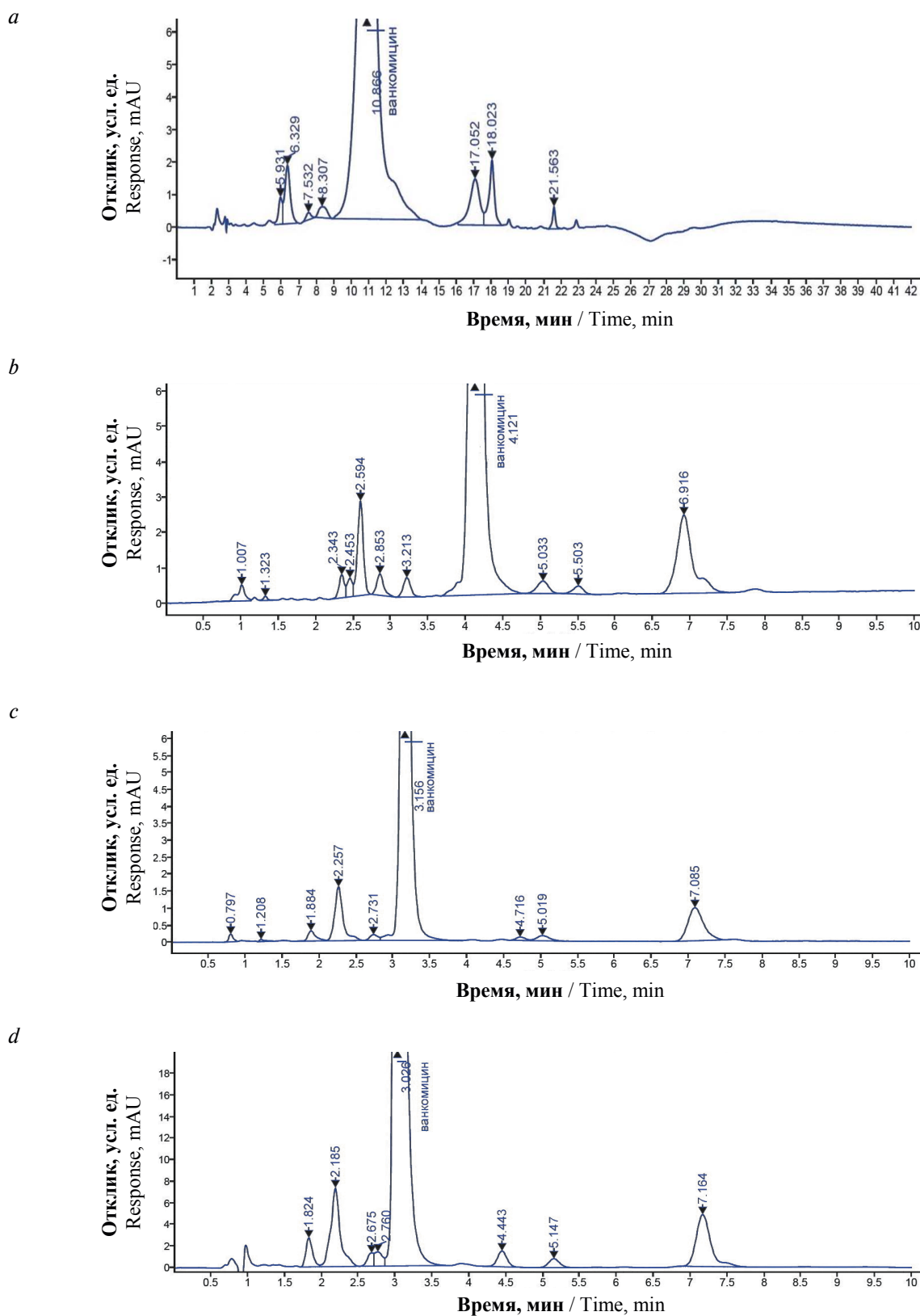


Рис. 2. Хроматограммы раствора для проверки пригодности хроматографической системы, полученные по методике Британской фармакопеи (a) и по методике УЭЖХ с использованием колонок: Kinetex C18 (b), Nucleodur C18 (c) и Zorbax Eclipse Plus C18 (d). Условия анализа указаны в тексте

Fig. 2. Chromatograms of the system suitability solution, obtained according to the British Pharmacopoeia procedure (a) and UPLC procedure using Kinetex C18 (b), Nucleodur C18 (c), and Zorbax Eclipse Plus C18 (d) columns. The test conditions are specified in the text

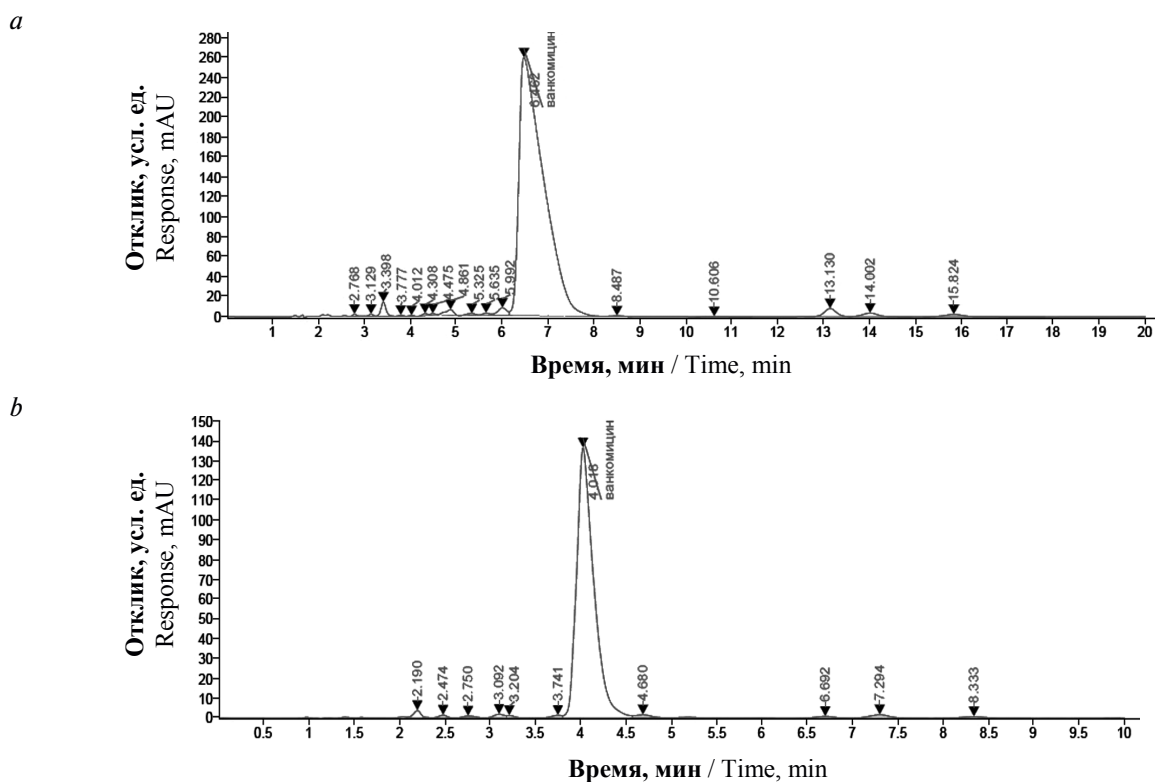


Рис. 3. Типичные хроматограммы испытуемого раствора, полученные по методике ВЭЖХ/Chr (a) и по методике УЭЖХ (b). Условия анализа указаны в тексте

Fig 3. Typical chromatograms of the test solution, obtained by the HPLC/Chr (a) and UPLC (b) procedures. The test conditions are specified in the text

В качестве критерия пригодности разработанных методик ВЭЖХ/Chr и УЭЖХ рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD) площади и времени удерживания пика ванкомицина В по пяти последовательным инъекциям. Полученные результаты определения содержания ванкомицина В и примесей сопоставимы по методикам ВЭЖХ, ВЭЖХ/Chr и УВЭЖХ. Для исследуемых растворов в диапазоне от 0,001 до 0,2 мг/мл ванкомицина В зависимость площади пика основного компонента от его концентрации описывается линейным уравнением. Для методики с использованием колонки Chromolith® $y = 4817,2x - 5,6795$, коэффициент корреляции (R^2) составил 0,9996. Для методики с использованием колонки Kinetex C18 $y = 861,46x - 0,5946$, $R^2 = 0,9998$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования было показано возможное применение ВЭЖХ с использованием колонки Chromolith® и ультраэффективной жидкостной хроматографии для определения ванкомицина В и его родственных примесей. Предлагаемая методика проведения испытания на колонке Chromolith® позволяет сократить время анализа на 10 мин по сравнению с методикой, описанной в Фармакопее США (USP), и на 15 мин

по сравнению с методикой, описанной в Британской фармакопее (BP). Возрастает эффективность хроматографической системы: число теоретических тарелок увеличивается в 1,5 раза по сравнению с методикой BP и в 0,8 по сравнению с методикой USP. При этом разрешение между пиками ванкомицина В и его ближайшей примеси соответствует фармакопейным требованиям и составляет 1,9.

Применение УЭЖХ с использованием хроматографической колонки Kinetex C18 (50×4,6 мм, 2,6 мкм) в разработанных условиях позволило сократить время анализа в 3 раза по сравнению с методикой BP и использовать изократическое элюирование, что значительно упростило анализ. Время анализа в отработанных условиях хроматографирования составило 10 мин. Число теоретических тарелок получено более 5000. Разрешение между пиками ванкомицина В и его ближайшей примеси составило 4,5.

Предлагаемые условия проведения испытания для методик ВЭЖХ на колонке Chromolith® и УЭЖХ позволяют значительно уменьшить время анализа, свести к минимуму расход дорогостоящих реагентов, увеличить эффективность хроматографической системы при определении родственных примесей ванкомицина и его основного компонента ванкомицина В.

Вклад авторов. *С. И. Кулешова* — идея, общая концепция исследования, анализ результатов, написание текста статьи; *Е. П. Симонова* — идея и планирование работы, разработка условий проведения испытаний, анализ и интерпретация полученных результатов; *О. Н. Высочанская* — выбор условий проведения испытаний, проведение испытаний, расчеты, интерпретация полученных результатов, написание текста статьи и ее графическое оформление.

Authors' contributions. *Svetlana I. Kuleshova*—elaboration of the idea, general concept of the study, analysis of the results, writing of the text; *Elena P. Simonova*—elaboration of the idea of the study, planning of the study, development of the test conditions, analysis and interpretation of the results; *Olga N. Vysochanskaya*—selection of the test conditions, performing the tests and calculations, interpretation of the results, writing of the text, preparation of the figures and tables.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Javorska L, Kujovska Krcmova L, Solichova D, Solich P, Kaska M. Modern methods for vancomycin determination in biological fluids by methods based on high-performance liquid chromatography. *J Sep Sci.* 2016;39(1):6–20. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500600>
- Голубицкий ГБ, Куликов АЛ. UPLC vs. HPLC: Реальное ускорение. В кн.: *Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез*. Материалы Всероссийской конференции. Краснодар; 2013. С. 24. [Golubitsky GB, Kulikov AL. UPLC vs. HPLC: real acceleration. In: *Analytical Chromatography and Capillary Electrophoresis*. Materials of the All-Russian conference. Krasnodar; 2013. P. 24 (In Russ.)]
- Magreault S, Leroux S, Touati J, Storme T, Jacqz-Aigrain E. UPLC/MS/MS assay for the simultaneous determination of seven antibiotics in human serum — application to pediatric studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2019;174:256–62. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.004>
- Levine DP. Vancomycin: a history. *Clin Infect Dis.* 2006;42(Suppl 1): S5–12. <https://doi.org/10.1086/491709>
- Archer GL. Antimicrobial susceptibility and selection of resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with infections of indwelling foreign devices. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978;14(3):353–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.14.3.353>
- Блатун ЛА, Крутиков МГ, Гришина ИА, Бобровников АЕ, Алексеев АА, Светухин АМ, Яковлев ВП. Клинико-лабораторная оценка эффективности ванкомицина (эдицин) при лечении гнойных ран кожи и мягких тканей, ожоговых ран и инфекционных осложнений ожоговой болезни. *Антибиотики и химиотерапия*. 2000;45(2):22–7. [Blatun LA, Krutikov MG, Grishina IA, Bobrovnikov AE, Alekseev AA, Svetukhin AM, Yakovlev VP. Clinical and laboratory evaluation of vancomycin (Edicin) efficacy in the treatment of purulent wounds of the skin and soft tissues, burn wounds and infectious complications of burn disease. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2000;45(2):22–7 (In Russ.)]
- Cao Yu, Yu J, Chen Yu, Zhang J, Wu X, Zhang Y, Li G. Development and validation of a new ultra-performance liquid chromatographic method for vancomycin assay in serum and its application to therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 2014;36(2):175–81. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3182a458bc>
- Nirmala K, Ramesh Raju R. Determination of vancomycin by using RP-HPLC method in pharmaceutical preparations. *Int J Res Ayurveda Pharm.* 2013;4(1):116–9. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.04139>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Кулешова Светлана Ивановна, канд. биол. наук. *Svetlana I. Kuleshova*, Cand. Sci (Biol). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9103-9239>

Симонова Елена Павловна. *Elena P. Simonova*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-2221-5534>

Высочанская Ольга Николаевна. *Olga N. Vysochanskaya*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-4327-6640>

Статья поступила 21.05.2020

После доработки 25.10.2021

Принята к печати 13.12.2021

Article was received 21 May 2021

Revised 25 October 2021

Accepted for publication 13 December 2021

АКТУАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Европейский директорат по лекарственным средствам и здравоохранению (EDQM) проведет Международную конференцию, посвященную публикации 11 изд. Европейской фармакопеи. Мероприятие будет проходить с 19 по 21 сентября 2022 года в г. Страсбурге. В программу конференции планируется включить два пленарных заседания и серию семинаров по направлениям деятельности Комиссии Европейской фармакопеи. В ходе конференции у специалистов, деятельность которых связана с контролем качества лекарственных средств, будет возможность лично пообщаться с ключевыми представителями экспертных групп Комиссии Европейской фармакопеи. Дополнительная информация будет публиковаться на сайте EDQM по мере ее поступления.

Публикуется по: <https://www.edqm.eu/en/news/about-us> от 15 ноября 2021 г.