

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. Н.Н. ВОРОЖЦОВА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
МИНОБРНАУКИ РОССИИ**

На правах рукописи

ЛАСТОВКА Анастасия Валерьевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ,
РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ
ПРОИЗВОДНОГО (-)-ИЗОПУЛЕГОЛА –
СОЕДИНЕНИЯ С ВЫСОКОЙ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

02.00.02 – аналитическая химия

диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Фадеева Валентина Павловна

Новосибирск – 2019

Оглавление	
Перечень условных обозначений и сокращений	7
ВВЕДЕНИЕ	10
Глава 1. Литературный обзор. Разработка и валидация аналитических методик контроля фармацевтических продуктов	18
1.1 Органические примеси	18
1.2 Остаточные органические растворители	23
1.2.1 Испытания лекарственных препаратов по показателю «остаточные органические растворители» согласно требованиям фармакопеи	23
1.2.1.1 Определение остаточных растворителей в соответствии с фармакопеей Российской Федерации	23
1.2.1.2 Определение остаточных растворителей в соответствии с Международными фармакопеями	24
1.2.2 Определение остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии	26
1.2.2.1 Введение пробы в испаритель	27
1.2.2.2 Выбор неподвижной фазы	29
1.2.2.3 Сравнение методов детектирования	31
1.2.2.4 Пробоподготовка при определении остаточных растворителей в фармацевтических продуктах	33
1.2.2.5 Альтернативные методы определения остаточных органических растворителей	33
1.3 Элементные примеси	34
1.3.1 Терминология и допустимые суточные воздействия элементных примесей на организм человека при разных способах введения лекарственного средства	34
1.3.2 Испытания по показателю «тяжелые металлы» согласно требованиям фармакопеи	35
1.3.2.1 Определение показателя «тяжелые металлы» в соответствии с фармакопеей Российской Федерации	35
1.3.2.2 Определение показателя «тяжелые металлы» в соответствии с фармакопеей Соединенных Штатов Америки	36
1.3.2.3 Определение показателя «тяжелые металлы» в соответствии с Европейской фармакопеей	39
1.3.3 Методы определения элементных примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах	40

1.3.3.1	Спектрофотометрический метод	41
1.3.3.2	Метод атомно-абсорбционной спектроскопии	41
1.3.3.3	Рентгенофлуоресцентный анализ	43
1.3.3.4	Нейтронно-активационный анализ	43
1.3.3.5	Метод атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой	44
1.3.3.6	Метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой	45
1.3.3.7	Метод атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой.	
	Сравнение методов определения элементных примесей	47
1.3.5	Пробоподготовка при определении элементных примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах	49
1.3.6	Чистая химия при установлении содержания элементных примесей	51
1.4	Роль высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии в изучении фармакокинетики и метаболизма лекарственных препаратов	53
1.4.1	Определение лекарственных препаратов в плазме крови/цельной крови животных	54
1.5	Валидация аналитических методик контроля качества лекарственных средств	60
1.5.1	Валидация спектрометрических методик	61
1.5.2	Валидация хроматографических методик	62
ГЛАВА 2. Экспериментальная часть. Исследование физико-химических свойств, разработка и валидация аналитических методик контроля (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола64		
2.1	Изучение физико-химических свойств физиологически активного вещества (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола	64
2.1.1	Описание (внешний вид, цвет, запах)	64
2.1.2	Растворимость фармацевтического соединения в растворителях разной полярности	65
2.1.3	Показатели «прозрачность», «цветность» и «рН» раствора соединения 1	66
2.1.4	Влага	67
2.1.4.1	Определение содержания воды по методу К. Фишера	67
2.1.4.2	Потеря в массе при высушивании	68
2.1.5	Термические характеристики	68

2.1.6 Установление состава и строения методами элементного и спектрального анализа	69
2.1.7 Качественный анализ	72
2.2 Разработка и валидация аналитических методик контроля чистоты физиологически активного соединения (2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2 <i>H</i> -хромен-4-ола	74
2.2.1 Аналитический контроль производного (-)-изопулегола по показателям «технологические примеси» и «действующее вещество»	74
2.2.2 Разработка методики идентификации технологических примесей и определения содержания действующего вещества	75
2.2.2.1 Реактивы и оборудование	75
2.2.2.2 Выбор условий хроматографического определения	76
2.2.3 Валидация хроматографической методики определения содержания действующего вещества	80
2.2.3.1 Специфичность аналитической методики	80
2.2.3.2 Предел обнаружения и количественного определения	81
2.2.3.3 Линейность градуировочных графиков	83
2.2.3.4 Правильность и прецизионность аналитической методики	85
2.2.3.5 Устойчивость анализируемых растворов	89
2.2.3.6 Надежность хроматографической системы	90
2.3 Анализ чистоты физиологически активного вещества (2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2 <i>H</i> -хромен-4-ола по показателю «остаточные органические растворители»	91
2.3.1 Реактивы и оборудование	92
2.3.2 Условия газохроматографического определения	92
2.3.3 Приготовление растворов для анализа	93
2.3.4 Результаты определения остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии	94
2.3.5 Валидация методики определения остаточных растворителей методом газовой хроматографии	99
2.3.5.1 Специфичность аналитической методики	99
2.3.5.2 Правильность методики	99
2.3.5.3 Прецизионность методики	100
2.3.5.4 Надежность хроматографической системы	101
2.4 Разработка методики определения элементных примесей	102

2.4.1	Определение содержания сульфатной золы	102
2.4.2	Разработка методики определения элементных примесей методом атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой	104
2.4.2.1	Реактивы и оборудование	104
2.4.2.2	Разложение органического соединения	104
2.4.2.3	Инструментальные параметры для определения элементных примесей методом МП-АЭС	105
2.4.2.4	Приготовление растворов. Пределы обнаружения и количественного определения. Линейность	108
2.4.2.5	Результаты определения содержания элементных примесей методом МП-АЭС	112
2.5	Разработка стандартного образца предприятия (2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2 <i>H</i> -хромен-4-ола	115
2.5.1	Общие сведения о СОП	115
2.5.2	Метрологические характеристики	115
2.5.3	Технические данные	115
2.5.4	Порядок применения	115
2.5.5	Условия хранения	117
2.6	Аттестация СОП состава (2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2 <i>H</i> -хромен-4-ол в физиологически активном соединении	117
2.6.1	Исследование однородности СОП	117
2.6.2	Вычисление метрологических характеристик СОП	118
2.7	Разработка и валидация методик определения (2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>aR</i>)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2 <i>H</i> -хромен-4-ола в плазме крови и цельной крови крыс с применением методов экстракции сухого пятна матрицы и экстракции на модифицированном целлюлозном носителе в сочетании с ВЭЖХ-МС/МС анализом	119
2.7.1	Реактивы	119
2.7.2	Приготовление растворов	120
2.7.2.1	Рабочие растворы	120
2.7.2.2	Приготовление спайк-растворов	121
2.7.3	Пробоподготовка	121
2.7.3.1	Механизм экстракции	121

2.7.3.2 Растровая электронная микроскопия в сочетании с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией для исследования свойств экстракционных материалов	122
2.7.3.3 Загрузочная емкость и воспроизводимость золь-гель процесса	124
2.7.3.4 Метод экстракции сухого пятна плазмы крови или цельной крови	124
2.7.3.5 Метод экстракции на модифицированном целлюлозном носителе	124
2.7.4 Оборудование и условия ВЭЖХ-МС/МС анализа	125
2.7.5 Разработка методики определения соединения 1 в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС/МС	125
2.7.6 Валидация биоаналитической методики	128
2.7.6.1 Специфичность	128
2.7.6.2 Предел обнаружения и нижний предел количественного определения	138
2.7.6.3 Линейность	139
2.7.6.4 Правильность и прецизионность	139
2.7.6.5 Извлечение и стабильность анализируемых растворов	142
2.7.6.6 Перенос соединения 1 в методе экстракции сухого пятна матрицы	144
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	145
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	146
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	149

Перечень условных обозначений и сокращений

Физико-химические методы

Спектральные и другие оптические методы

ААС атомно-абсорбционная спектрометрия
ДРСДВ дисперсионная рентгеновская спектроскопия по длине волны

ИК-спектроскопия инфракрасная спектроскопия

ИСП-АЭС атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

МП-АЭС атомно-эмиссионная спектрометрия с микроволновой плазмой

РФА рентгенофлуоресцентный анализ

Хроматографические методы

ВЭЖХ высокоэффективная жидкостная хроматография

ГХ газовая хроматография

ЖХ жидкостная хроматография

КЭ капиллярный электрофорез

ТСХ тонкослойная хроматография

Методы термического анализа

ДСК дифференциальная сканирующая калориметрия

ДТА дифференциальный термический анализ

ТГА термогравиметрический анализ

Масс-спектрометрические методы

МС/МС тандемная масс-спектрометрия

ИСП-МС масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

ЛА-ИСП-МС масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой и лазерной абляцией

Радиометрические методы

НАА нейтронно-активационный анализ

Методы рентгеноструктурного анализа

ПРД порошковая рентгеновская дифракция

Методы ядерного магнитного резонанса

ЯМР ядерный магнитный резонанс

Методы пробоподготовки

DMS dried matrix spots (англ. метод сухих пятен матрицы)

DPS dried plasma spots (англ. метод сухих пятен плазмы крови)

FPSE fabric phase sorptive extraction (англ. метод экстракции с применением модифицированного целлюлозного носителя)

ПФА парофазный анализ

ТФМЭ твердофазная микроэкстракция

ТФЭ твердофазная экстракция

Методы ионизации в масс-спектрометрии

ФИ фотоионизация

ХИ	химическая ионизация
ЭИ	ионизация электронным ударом
ЭСИ	электроспрей ионизация

Аппаратура и ее элементы

ВМС	времяпролетный масс-анализатор
ДТИ	детектор термоионный
ДТП	детектор по теплопроводности
ДТЭ	детектор по тепловой энергии
ДЭП	детектор по электролитической проводимости Холла
НФ	неподвижная фаза
ПИД	пламенно-ионизационный детектор
ПФ	подвижная фаза
ПФД	пламенно-фотометрический детектор
ФИД	фотоионизационный детектор
ЭЗД	электронно-захватный детектор

Соединения

АПДК	аммоний пирролидиндитиокарбамат
ДДТК	диэтилдитиокарбонат
ДМАА	N,N-диметилацетамид
ДМСО	диметилсульфоксид
ДМФА	N,N-диметилформамид
ДХМ	дихлорметан
КБД	каннабидиол
МТБЭ	метил- <i>трет</i> -бутиловый эфир
ТАС	такролимус
ТГК	тетрагидроканнабинол
ТГФ	тетрагидрофуран
ФМС	фенилметилсилоксан
ЭА	этилацетат

Нормативная документация

ГФ	Государственная фармакопея
ЕАЛС	Европейское агентство лекарственных средств
ЕФ	Европейская фармакопея
ОФС	общая фармакопейная статья
ЯФ	Японская фармакопея

Метрологические характеристики

RSD	относительное стандартное отклонение
SD	стандартное отклонение
ПКО	предел количественного определения
ПО	предел обнаружения
СОП	стандартный образец предприятия

Общая медицинская терминология

Д	допустимое суточное воздействие с учетом разбавления
ГЛФ	готовая лекарственная форма
ДСВ	допустимое суточное воздействие
ЛП	лекарственный препарат
ЛС	лекарственное средство
ТЛФ	твердая лекарственная форма
ФА	фармацевтический агент
ФАВ	физиологически активное вещество
ФП	фармацевтический препарат
ФС	фармацевтическая субстанция

Другое

MRM	multiple reaction monitoring
SRM	selected reaction monitoring
Т	температура
АРВ	антиретровирусный
ВС	внутренний стандарт
НИОТ	нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы
ННИОТ	ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы
НтИОТ	нуклеотидный ингибитор обратной транскриптазы
ООР	остаточный органический растворитель
ОР	органический растворитель
ПДС	предельно допустимое содержание
ФД	фармакодинамика
ФК	фармакокинетика
ЭДС	электродвижущая сила

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Боль является наиболее распространенным симптомом, причиняющим страдания миллионам людей. Имеющиеся в настоящее время на рынке такие болеутоляющие средства, как ацетилсалициловая кислота, анальгин и диклофенак натрия (по фармакологическому действию являются ненаркотическими анальгетиками), либо недостаточно эффективны, либо обладают серьезными побочными эффектами [1]. Таким образом, актуальной задачей является разработка и исследование анальгетиков нового структурного типа, сочетающих высокую эффективность с низкой токсичностью.

В отделе медицинской химии Новосибирского института органической химии СО РАН было получено новое производное монотерпеноида (–)-изопулегола – (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ол (**1**) (Рис. 1). Соединение сочетает высокую анальгетическую активность в тестах висцеральной боли «уксусные корчи» и «горячая пластинка» и низкую острую токсичность, имеет эффект пролонгированного действия при пероральном введении. Анальгетический эффект при введении соединения мышам в дозе всего 1 мг/кг сохранялся в течение 24 ч [2].

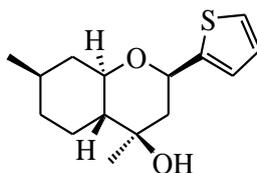


Рис. 1. Структурная формула (**1**) (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола (производное монотерпеноида (–)-изопулегола, производное 2*H*-хромена, фармацевтический агент, физиологически активное вещество)

Внедрение нового анальгетического соединения включает два больших этапа – открытие и разработку. Основными функциями разработки лекарственного препарата (ЛП) является полная характеристика соединения, на начальном этапе – это изучение физико-химических свойств и доказательство чистоты с определением всех возможных примесей, далее доклинические и клинические испытания.

Испытания по показателям контроля качества, согласно фармакопее РФ, охватывают информацию о цвете, запахе, гигроскопичности, полиморфизме; растворимости в растворителях разной полярности; подлинности (физико-химические, химические методы и специфические качественные реакции); термических и спектральных характеристиках; прозрачности, цветности и pH растворов соединения; родственных примесей (хроматографические или реже спектральные методы); неорганических анионах и катионах; потере в массе при высушивании; содержании сульфатной золы и тяжелых металлов; остаточных

количества органических растворителей (**ОР**) (хроматографические методы); процентном содержании действующего вещества (физико-химические и химические методы) [3].

Безопасность лекарственного средства (**ЛС**) зависит не только от фармако-токсикологических свойств, но и от примесей, которые оно содержит. Состав ЛП обязательно должен быть стабильным в течение всего срока годности. Контроль примесей должен осуществляться на всех этапах от физиологически активного вещества (**ФАВ**) до готовой лекарственной формы (**ГЛФ**). Совершенно очевидно, что ЛП, предназначенные для потребления человеком, должны быть наиболее полно охарактеризованы. Определение и контроль примесей практически во всех случаях дает гарантию безопасности ЛС. Таким образом, аналитическая деятельность, касающаяся определения примесей в лекарствах, является одной из наиболее важных и актуальных проблем современного фармацевтического анализа.

Цель работы. Настоящая работа посвящена исследованию физико-химических свойств физиологически активного вещества (*2R,4R,4aR,7R,8aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола, обладающего анальгетической активностью; разработке и валидации комплекса аналитических методик контроля чистоты; разработке и валидации методик определения производного 2*H*-хромена в плазме крови и цельной крови крыс с целью последующего исследования фармакокинетического профиля.

В рамках поставленной цели решали **следующие задачи:**

- исследование физико-химических свойств с получением данных по:
 - ✓ внешнему виду, запаху, цвету;
 - ✓ структуре, кристаллическая или аморфная по результатам рентгеноструктурного анализа (**РСА**);
 - ✓ растворимости в растворителях разной полярности;
 - ✓ цветности, прозрачности и степени мутности растворов соединения **1**;
 - ✓ показателям рН растворов исследуемого соединения;
 - ✓ спектральным характеристикам;
 - ✓ термической устойчивости с применением методов термогравиметрического анализа (**ТГА**) и дифференциальной сканирующей калориметрии (**ДСК**);
- установление состава и строения соединения **1** с применением методов элементного анализа, инфракрасной (**ИК-**) спектроскопии, спектроскопии ¹H- и ¹³C-ядерного магнитного резонанса (**ЯМР**);
- идентификация технологических примесей в анализируемом соединении, разработка и валидация методики определения действующего вещества методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ВЭЖХ**) с УФ-детектированием;

– исследование возможности определения элементных примесей в соединении **1** методом атомно-эмиссионной спектрометрии с микроволновой плазмой (МП-АЭС);

– разработка и валидация методики определения остаточных органических растворителей (ООР): дихлорметана (ДХМ), этилацетата (ЭА), метил-*трет*-бутилового эфира (МТБЭ), *n*-гексана в исследуемом соединении методом газовой хроматографии (ГХ) с пламенно-ионизационным детектированием (ПИД);

– разработка стандартного образца предприятия (СОП) соединения **1** с получением его метрологических характеристик;

– разработка и валидация биоаналитических методик определения производного *2H*-хромена в плазме крови и цельной крови крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) с целью изучения фармакокинетического (ФК) профиля; проведение сравнения способов пробоподготовки необходимых для извлечения исследуемого соединения из биологических матриц.

Научная новизна работы

1. Впервые исследованы физико-химические свойства (*2R,4R,4aR,7R,8aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-*2H*-хромен-4-ола, обладающего анальгетической активностью. Методами элементного и рентгеноструктурного анализа подтвержден состав и пространственное расположение атомов в исследуемом соединении. Определена растворимость в растворителях разной полярности. Соединение **1** можно отнести к легко растворимым в ацетонитриле, ацетоне, хлороформе и метиловом спирте; растворимым в этиловом спирте; практически нерастворимым в воде. Получены термические и спектральные характеристики. Температура плавления вещества равна 143°C, энтальпия плавления составила 123.1 Дж/г. Охарактеризованы цветность, прозрачность, степень мутности и pH растворов соединения **1** в различных растворителях. Проведено исследование производного *2H*-хромена на присутствие механических включений, сульфатной золы и воды. Разработан качественный способ определения подлинности исследуемого соединения реакцией с изатином в сильноокислой среде.

2. Разработанная ВЭЖХ-УФ методика позволяет идентифицировать технологические примеси и определять содержание действующего вещества в соединении **1**. Специфичность методики доказана отсутствием посторонних пиков при сравнении хроматограмм чистого растворителя и раствора аналита в этом же растворителе. С использованием разработанной методики возможно определение 6 технологических примесей с пределами обнаружения, мкг/мл: 0.056 для тиофен-2-карбальдегида; 0.32 для (–)-изопулегола; 0.22 для стереоизомера; 0.18, 0.22 и 0.37 для продуктов дегидратации. Пределы обнаружения и количественного определения соединения **1** составили 0.032 и 0.10 мкг/мл, соответственно.

Показано, что методика обладает достаточной линейностью, правильностью и прецизионностью в диапазонах малых и больших концентраций ~0.05-1 и ~70-130% от номинального количества соединения **1**. Установлено, что содержания возможных технологических примесей находились ниже найденных пределов обнаружения, а среднее значение процентного содержания действующего вещества было не менее 99.6%. Представленная методика является простой, точной и может быть применена при получении для контроля анализируемого соединения по показателям «технологические примеси» и «действующее вещество».

3. Исследована возможность одновременного определения элементных примесей методом МП-АЭС в соединении **1**. Разработан способ пробоподготовки в микроволновой системе автоклавного растворения. Подобранные условия позволяют определить 15 элементных примесей с пределами обнаружения, ppb: 1.9 для Al, 27 для V, 27 для Fe, 10 для Co, 1.4 для Ni, 2.6 для Cu, 11 для As, 2.1 для Mo, 2.2 для Ru, 4.8 для Pd, 2.0 для Ag, 6.6 для Cd, 37 для Pt, 2.6 для Hg, 5.1 для Pb. Для каждой элементной примеси установлен рабочий интервал концентраций в пределах, которого определена прецизионность.

4. Разработана и валидирована методика определения четырех остаточных органических растворителей: дихлорметана, этилацетата, метил-*трет*-бутилового эфира и *n*-гексана в соединении **1** методом ГХ-ПВД. Впервые для определения растворителей в фармацевтических продуктах использовали неподвижную фазу (**НФ**) на основе модифицированного поли(1-триметилсилил-1-пропин)а (**ПТМСП**), не применявшуюся ранее для таких целей.

5. Разработаны биоаналитические методики определения соединения **1** в плазме крови и цельной крови крыс методом ВЭЖХ-МС/МС. Проведено сравнение методов экстракции сухого пятна матрицы (англ. **Dried Matrix Spots, DMS**) и экстракции на модифицированном целлюлозном носителе (англ. **Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE**) для извлечения образца из биологических сред. Пределы обнаружения соединения **1** были равны 20 нг/мл для плазма-DMS, 20 нг/мл для кровь-DMS, 20 нг/мл для плазма-FPSE и 50 нг/мл для кровь-FPSE. Средние значения извлечения вещества методом экстракции сухого пятна плазмы крови и цельной крови крыс составили 27 и 25%, соответственно. Средние значения извлечения вещества из плазмы крови и цельной крови с применением метода экстракции на модифицированном целлюлозном носителе были выше и составили 38 и 31%, соответственно. Методики были валидированы, критерии соответствовали требованиям российских и международных регламентирующих документов.

Практическая значимость

На основе полученных данных, оптимизирован процесс очистки соединения **1**. В общую схему получения введены два дополнительных этапа, которые включают пропускание исходных реагентов через хроматографическую колонку для уменьшения содержания элементных примесей и перекристаллизацию из этилацетата для удаления остатков органических растворителей.

Найдена новая область применения неподвижной фазы на основе модифицированного поли(1-триметилсилил-1-пропин)а для определения остаточных органических растворителей в фармацевтических продуктах методом ГХ-ПВД. Данная фаза для фармацевтического анализа ранее не использовалась.

Разработанная ВЭЖХ-УФ методика определения действующего вещества и идентификации технологических примесей является простой, быстрой, специфичной, правильной, прецизионной и готова для внедрения при получении субстанции соединения **1**.

Процедура, включающая разложение органического вещества в микроволновой системе автоклавного растворения с последующим анализом на спектрометре с микроволновой плазмой, может быть применена для установления содержания элементных примесей в нерастворимых в воде физиологически активных соединениях.

Таким образом, разработанный комплекс аналитических методик позволяет контролировать содержание примесей различной природы на всех этапах синтеза рассматриваемого вещества.

Изготовлен стандартный образец предприятия, который может быть использован в качестве стандартного вещества для аналитических методик контроля содержания действующего вещества и примесей; получены его метрологические характеристики.

В представленной работе проведено сравнение методов пробоподготовки экстракции сухого пятна матрицы и экстракции на модифицированном целлюлозном носителе для извлечения соединения **1** из биологических жидкостей с последующим определением аналита методом ВЭЖХ-МС/МС. Предложенные и валидированные методики определения анализируемого соединения в плазме крови и цельной крови крыс дают перспективу для исследования фармакокинетического профиля.

Методология и методы диссертационного исследования

Предложенный методологический подход заключается в создании комплекса чувствительных и точных аналитических методик для получения полной информации о свойствах и чистоте физиологически активного соединения (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола.

Состав и строение соединения **1** определили методами элементного анализа, ИК-спектроскопии, спектроскопии ¹H- и ¹³C-ЯМР. Пространственное расположение атомов установили методом РСА. Термические характеристики были получены с применением методов ТГА и ДСК.

Идентификацию технологических примесей и определение содержания действующего вещества в соединении **1** выполнили методом ВЭЖХ-УФ. Сбор и обработку хроматограмм провели программой МультиХром 2.4. Разработали и валидировали методику определения остаточных органических растворителей методом ГХ-ПИД. Элементные примеси в исследуемом соединении были определены методом МП-АЭС с предварительным разложением органической матрицы в микроволновой системе автоклавного растворения. Управление прибором, сбор первичных экспериментальных данных и построение градуировочных графиков выполнили с применением программного обеспечения MP Expert 1.5.1.6821.

Определение соединения **1** в биологических средах провели методом ВЭЖХ-МС/МС. Извлечение образца выполнили методами экстракции сухого пятна матрицы или экстракции с применением модифицированного целлюлозного носителя. Программное обеспечение Analyst 1.6.2 использовали для управления прибором и сбора первичных данных. С помощью программного обеспечения MultiQuant 2.1 обработали полученные хроматограммы. Далее разработанные методики были валидированы в соответствии с требованиями Международных организаций (Европейское агентство лекарственных средств, англ. **European Medicines Agency, EMA**; Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов, англ. **Food and Drug Administration, FDA**).

На защиту выносятся следующие положения:

– новые данные о физико-химических свойствах перспективного физиологически активного соединения анальгетического действия;

– валидированная ВЭЖХ-УФ методика идентификации технологических примесей и определения процентного содержания действующего вещества в новом соединении; данные о содержании действующего вещества и технологических примесей;

– способ пробоподготовки в микроволновой системе автоклавного растворения для перевода определяемых элементных примесей в раствор; условия работы на спектрометре для определения элементных примесей методом МП-АЭС; условия гидридной генерации для определения As и Hg на уровнях 3.0 и 11 ppb, соответственно;

– методика и ее валидация для определения остаточных органических растворителей методом ГХ-ПИД с применением новой неподвижной фазы на основе модифицированно-

го поли(1-триметилсилил-1-пропин)а; данные о содержании органических растворителей в соединении **1**;

–разработка и получение метрологических характеристик стандартного образца предприятия исследуемого соединения;

–валидированные методики определения физиологически активного соединения анальгетического действия в плазме крови и цельной крови крыс методом ВЭЖХ-МС/МС: условия пробоподготовки, параметры хроматографирования и масс-спектрометрического детектирования.

Личный вклад автора

Сбор и анализ литературных источников выполнен автором самостоятельно. Вклад соискателя в диссертационную работу заключался в планировании экспериментов; выполнении пробоотбора и пробоподготовки рассматриваемых образцов; разработке и валидации аналитических методик исследования анализируемого объекта различными физико-химическими методами; сборе, обработке и анализе полученных данных. В диссертационную работу вошли результаты экспериментальных исследований, полученные автором лично. Интерпретация результатов, подготовка материалов статей и тезисов проводилась совместно с научным руководителем и соавторами.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на II Всероссийской конференции «Аналитическая Спектроскопия» с международным участием (г. Краснодар, Россия, 2015), X Всероссийской научной конференции с международным участием «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (г. Барнаул, Россия, 2016), II Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием (г. Краснодар, Россия, 2017), Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы органической химии» (г. Новосибирск, Россия, 2017), Третьем съезде аналитиков России (г. Москва, Россия, 2017), конкурсе молодых ученых НИОХ СО РАН 2017 года (1 место, стипендия Н. Н. Ворожцова), Всероссийской молодежной научной школе-конференции «Актуальные проблемы органической химии» с международным участием (п. Шерегеш, Россия, 2018), VI Международной научной конференции «New functional materials and high technology» (г. Тиват, Черногория, 2018).

Публикации

По результатам работы опубликованы 4 статьи из них 2 – в российских рецензируемых и 2 – зарубежных рецензируемых журналах, все входят в перечень индексируемых в международной информационно-аналитической системе научного цитирования Web of

Science. В материалах всероссийских и зарубежных конференций опубликованы тезисы 8 докладов.

Соответствие специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Диссертационная работа соответствует пункту 2 «Методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др)», пункту 3 «Аналитические приборы», пункту 4 «Методическое обеспечение химического анализа», пункту 6 «Метрологическое обеспечение химического анализа», пункту 7 «Теория и практика пробоотбора и пробоподготовки в аналитической химии», пункту 8 «Методы маскирования, разделения и концентрирования», пункту 15 «Анализ лекарственных препаратов» паспорта специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Структура и объем работы

Работа состоит из 167 страниц печатного текста, 53 рисунков и 53 таблиц. Работа включает введение, литературный обзор, экспериментальную часть, основные результаты, заключение, выводы и список литературы, который содержит 197 работ российских и зарубежных авторов.

Глава 1. Литературный обзор

Разработка и валидация аналитических методик контроля фармацевтических продуктов

Согласно стандартам Международной конференции по гармонизации [4] для регистрации лекарственного препарата (ЛП) требуется оценка содержания органических, неорганических примесей и остаточных растворителей. Органические примеси могут возникать в результате синтеза и/или хранения ЛП. К примесям данного класса относятся: исходные реагенты, продукты побочных реакций, промежуточные соединения, продукты разложения при хранении, органические лиганды и катализаторы. Класс неорганических примесей включает реагенты, тяжелые металлы или другие остаточные металлы, неорганические соли, лиганды, катализаторы и другие материалы (например: фильтры, уголь). Остаточные растворители могут быть как органические, так и неорганические, используемые для приготовления растворов или суспензий при синтезе и выделении новой субстанции.

1.1 Органические примеси

К органическим примесям относятся исходные реагенты, родственные примеси, промежуточные соединения и продукты разложения при хранении. Под исходными реагентами понимают соединения, которые используются в реакции для получения физиологически активного вещества (ФАВ). Родственные примеси – соединения с близкой структурой, которые могут проявлять сходную биологическую активность. Промежуточные соединения образуются в процессе синтеза ФАВ, которые в дальнейшем будут выделены и охарактеризованы. Формирование продуктов разложения происходит при хранении или под воздействием внешних факторов.

Для анализа примесей, получения информации о стабильности и продуктах разложения применяются высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез (КЭ), газовая хроматография (ГХ), жидкостная хроматография (ЖХ) и тонкослойная хроматография (ТСХ). Безоговорочным лидером среди всех аналитических методов является ВЭЖХ в сочетании с различными видами детектирования. В настоящее время более 80% препаратов анализируются хроматографическими методами. В таблице 1 предлагается обзор аналитических методик определения органических примесей в ряде продуктов фармацевтической индустрии методом ВЭЖХ за период времени с 2008 по 2019 год.

ВЭЖХ-методики для определения органических примесей за период времени с 2008 по 2019 год

№	Наименование препарата	Примеси	Колонка	Подвижная фаза	Детекция	[]
1	Беклометазона дипропионат	Продукты разложения	C18 (15см×19мм,5мкм)	ACN:вода изократика	¹ УФ	5
2	Беназеприл	Продукты разложения	C18 (25см×4.6мм,5мкм)	ACN:буфер(pH=3.0) градиент	² МС ³ ЯМР	6
3	Полипилл	Продукты разложения	C8 (25см×4.6мм,5мкм)	ACN:буфер(pH=2.3) градиент	УФ МС	7
4	Невирапин	Продукты разложения	C18 (10см×2.1мм,2.7мкм)	ACN:вода градиент	⁴ МС ⁿ	8
5	Эналаприл малеат	Продукты разложения	C18 (25см×4.6мм,5мкм)	ACN:буфер(pH=3.0) градиент	УФ МС	9
6	Атомoksetина гидрохлорид	Органические примеси	C8 (15см×4.6мм,3.5мкм)	ACN:CF ₃ COOH(в) градиент	УФ	10
7	Глимепирид	Продукты разложения	C8 (15см×4.6мм,5мкм)	ACN:буфер(pH=3.0) изократика	УФ МС	11
8	Ламивудин	Продукты разложения	C18 (25см×4.6мм,5мкм)	MeOH:буфер(pH=3.8) градиент	МС ⁿ ⁵ ВМС	12
9	Атенолол	Наполнители	C8 (25см×4.6мм,5мкм)	ACN:буфер	ВМС	13
10	Кандесартан цилексетил	Продукты разложения	C18 (15см×4.6мм,5мкм)	ACN:буфер(pH=2.8) градиент	ВМС	14
11	Ирбесартан	Продукты разложения	C8 (25см×4.6мм,5мкм)	MeOH:буфер(pH=3.0) градиент	ВМС МС ⁿ , ЯМР	15
12	Палонсетрона гидрохлорид	Органические примеси	нафталильная НФ, cosmosil π Nap (25см×4.6мм,5мкм)	буфер(pH=2.5): буфер(pH=2.5)-ACN градиент	МС	16
13	Лорноксикам	Продукты разложения	C18 (25см×4.6мм,5мкм)	MeOH:буфер(pH=3.3) градиент	ВМС МС ⁿ	17
14	Эсликарбазепина ацетат	Органические примеси	RP8 (25см×4.6мм,5мкм)	(УФ) буфер(pH=5.0)- NaOH(в)-ACN: ACN-вода; (МС ⁿ) NH ₄ HCO ₃ -ACN:ACN- вода градиент	УФ МС ⁿ	18
15	Битеспирамицин	Органические примеси	C18 (15см×2.0мм,5мкм)	ACN:CH ₃ COONH ₄	МС	19
16	Эстрадиол	Органические примеси	C18 (25см×4.6мм,5мкм)	ACN-MeOH-вода: ACN-вода градиент	МС МС ⁿ	20
17	Гризеофульвин	Органические примеси	C18 (25см×4.6мм,5мкм)	вода-HCOOH:ACN- вода-HCOOH (pH=4.5) градиент	УФ	21
18	Цилазаприл	Продукты разложения	C18 (25см×4.6мм,5мкм)	ACN:буфер(pH=3.0) градиент	ВМС МС ⁿ , ЯМР	22
19	Вортиоксетин	Органические примеси	C18 (25см×4.6мм,5мкм)	CF ₃ COOH(в):ACN градиент	УФ МС	23
20	Омепразол	Органические примеси	RP18 (10см×2.1мм,1.7мкм)	буфер(pH=8.9)-ACN: ACN-MeOH градиент	ВМС	24
21	Трелаглиптин	Органические примеси	C18 (25см×4.6мм,5мкм)	(УФ) буфер(pH=3.5): ACN градиент (МС) буфер(pH=3.5): ACN градиент	УФ МС	25

№	Наименование препарата	Примеси	Колонка	Подвижная фаза	Детекция	□
22	Левотироксин натрия	Органические примеси	C18 (15см×4.0мм,3мкм)	(УФ) вода-НСООН: ACN градиент (МС) вода-НСООН: ACN-НСООН градиент	УФ МС	26
23	Акривастин	Органические примеси	C18 (25см×4.6мм,5мкм)	буфер(рН=4.7)- NaOH(в):MeOH градиент	УФ МС	27
24	Прасугрела гидрохлорид	Продукты разложения	(УФ) C8 (15см×4.6мм,5мкм) (МС) C18 (25см×4.6мм,5мкм)	(УФ) ACN:буфер (рН=4.5) изократика (МС) ACN:вода	УФ МС	28

Примечание: ¹УФ – ультрафиолетовый, ²МС – масс-спектрометрический, ³ЯМР – ядерный магнитный резонанс, ⁴МСⁿ – тандемная масс-спектрометрия, ⁵ВМС – времяпролетный масс-анализатор

Проанализировав работы, посвященные определению органических примесей в фармацевтических субстанциях (ФС) и ЛП, можно констатировать, что наиболее применяемым вариантом анализа является обращено-фазовая ВЭЖХ. При этом в качестве неподвижной фазы исследователи отдают предпочтение классической октадецильной фазе (C18), оставляя позади октильную фазу (C8) (Рис. 2). Среди органических модификаторов преобладают ацетонитрил и метанол. Так как часто требуется определение большого количества примесей с требуемым разрешением пиков, авторы работ применяют градиентный режим элюирования. Детектирование аналитического сигнала проводят с использованием ультрафиолетового (УФ) детектора, ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрического (МС) детектора, времяпролетного масс-анализатора (ВМС) и тандемной масс-спектрометрии (МСⁿ) (Рис. 3).

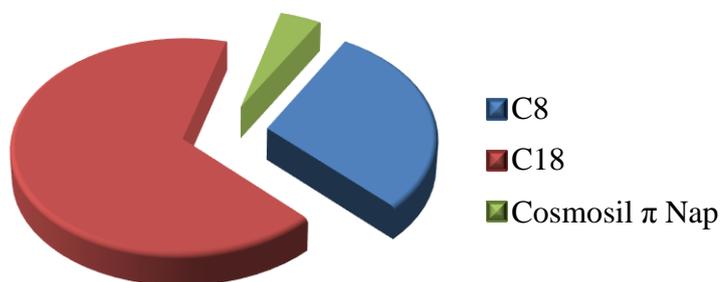


Рис. 2. Распределение неподвижных фаз при определении органических примесей

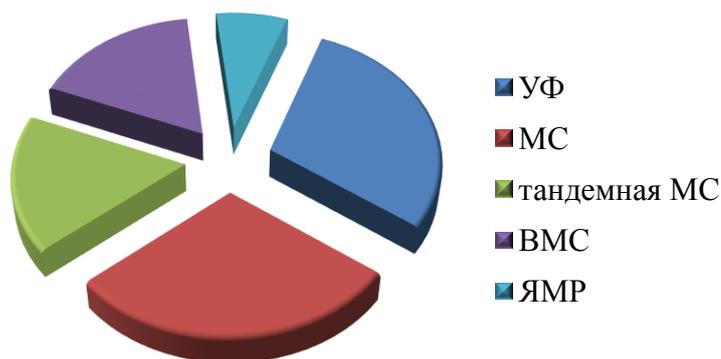


Рис. 3. Распределение способов детектирования при определении органических примесей

Твердые лекарственные формы (ТЛФ) являются самыми практичными для применения лекарственными средствами (ЛС) из-за удобства введения, точности и воспроизводимости дозирования, повышения стабильности и возможности массового производства. В связи с этим приобретают актуальность методы для анализа ТЛФ, исключая этап пробоподготовки. Несмотря на то, что фармацевтический анализ в твердом состоянии очень информативен и во многих случаях незаменим, данные методы имеют ряд недостатков, из которых наиболее значимыми являются низкая чувствительность и невозможность разделения гомогенных компонентов. Однако только анализ в твердом состоянии может дать информацию о полиморфных формах компонентов. Порошковая рентгеновская дифракция (ПРД), инфракрасная- (ИК-) и ЯМР-спектроскопия твердого тела являются самыми популярными аналитическими методами, применяемыми в области фармацевтического анализа ТЛФ. Эти методы могут использоваться как для идентификации, так и определения действующего и вспомогательных веществ. Но из-за перечисленных недостатков они, как правило, используются в качестве вспомогательных методов. Многочисленные применения ЯМР-спектроскопии твердого тела в фармацевтической индустрии приведены в литературе и включают идентификацию действующего вещества [29, 30, 31, 32, 33], определение полиморфных форм [34, 35, 36], изучение стабильности ЛС [37, 38], исследование взаимодействия между действующим и вспомогательными веществами и количественный анализ [29].

Таким образом, исходные материалы, побочные продукты, промежуточные соединения, лиганды и катализаторы можно отнести к примесям, образованным в процессе синтеза и очистки лекарственного соединения (или технологические примеси). Эти примеси не увеличиваются в стабильном состоянии и не формируются при воздействии внешних факторов. К аналитическим методам определения примесей данной группы можно отнести разные варианты ЖХ и ГХ с различным

детектированием. Если максимальная суточная доза субстанции ≤ 2 г/день, то допустимое содержание примесей составляет 0.15% или 1 мг/день. Если максимальная суточная доза субстанции > 2 г/день, то содержание примесей не должно превышать 0.05% [4]. Примеси, которые увеличиваются при изучении стабильности и образуются во время исследования принудительного разложения, классифицируют как примеси или продукты разложения. Большинство путей разложения включают химические реакции такие, как гидролиз/дегидратация, окисление, изомеризация/эпимеризация, перегруппировка, декарбоксилирование, димеризация/полимеризация, фотолит и реакции с наполнителями. Разные варианты ЖХ и ГХ с различным детектированием рекомендуются для количественной оценки продуктов разложения. Критерии приемлемости содержания примесей в ФС аналогичны требованиям для примесей, образованных в процессе синтеза. Для ГЛФ, максимальная суточная доза которых составляет < 10 мг, содержание примесей не должно превышать 1.0% или 50 мкг суточного потребления. Если доза лежит в интервале от 10 до 100 мг, то содержание примесей не должно быть более 0.5% или 200 мкг суточного потребления. Если доза препарата включает диапазон от 100 мг до 2 г, то содержание примесей должно быть менее 0.2% или 3 мг суточного потребления. Суточная доза от 2 г, содержание – не более 0.15% [39]. Также можно выделить класс оптически активных примесей. К передовым аналитическим методам для разделения и определения оптически активных соединений можно отнести ГХ, ВЭЖХ, КЭ и жидкофазный ЯМР. Оценка оптически активных примесей требуется только для ФС и критерии приемлемости аналогичны остальным примесям [4].

1.2 Остаточные органические растворители

Определение остаточных органических растворителей (ООР) в ФС и ЛП необходимо не только потому, что ООР представляют, очевидно, потенциальную опасность для здоровья человека, но также и потому, что они могут влиять на физико-химические свойства фармацевтических продуктов и наполнителей [40]. Предельно допустимые содержания (ПДС) для ООР в ЛС определяются токсичностью растворителя и суточной дозой препарата.

1.2.1 Испытания лекарственных препаратов по показателю «остаточные органические растворители» согласно требованиям фармакопей

ПДС и методики определения ООР приводятся в ведущих фармакопеях мира. Далее в литературном обзоре будут рассмотрены основные положения и требования фармакопей и Международных документов.

1.2.1.1 Определение остаточных растворителей в соответствии с фармакопейей Российской Федерации

Заметим, что в фармакопее XIII [41] и XIV [3] РФ нет рекомендаций по определению ООР методом ГХ. ПДС органических растворителей в ЛП определяются степенью их возможного риска для здоровья человека. Эти факторы положены в основу разделения ООР на классы. 1 класс – высокотоксичные растворители, применяемые в исключительных случаях, 2 класс – негенотоксичные растворители, 3 класс – растворители низкой токсичности. В фармакопее XIII РФ [41] к ООР второго класса добавляется кумол с ПДС равным 70 ppm, хотя в фармакопее XII РФ [42] кумол относится к растворителям третьего класса токсичности и ПДС для него составляет 5000 ppm. Этилацетат (ЭА), один из наиболее распространенных растворителей в органическом синтезе, отсутствует в перечне растворителей в фармакопее XIII РФ, но в Государственной фармакопее (ГФ) XII РФ, как и в основных фармакопеех мира, ЭА относят к растворителям низкой токсичности с ПДС равным 5000 ppm. В общей фармакопейной статье (ОФС) ОФС.1.1.0008.15 ГФ XIII выделены растворители с недостаточно обоснованной токсичностью и использование этих растворителей производитель должен обосновать.

1.2.1.2 Определение остаточных растворителей в соответствии с Международными фармакопеями

Первым аналитическим методом для определения ООР, описанным в фармакопее США (ФСША), является потеря в массе при высушивании. Этот метод проводится при нормальном давлении и/или под вакуумом. Данная процедура является простой в исполнении и не требует высокой квалификации аналитика. Помимо явных преимуществ присутствует ряд недостатков, включающих низкую специфичность и высокий предел обнаружения (ПО) (0.1%), а также относительно большие затраты вещества для проведения анализа (1-2 г). Кроме того, атмосферная влажность может значительно исказить полученные результаты [43].

ГХ является естественным выбором среди методов для определения ООР, так как большинство растворителей имеют низкие температуры кипения и относятся к термически стабильным соединениям [44]. Определение ООР в ФС и ЛП с помощью ГХ является сложной задачей ввиду того, что возникает необходимость определять разные по свойствам сочетания растворителей с низкими ПО. В статье <467> фармакопее XXXI США [45] приведены 3 процедуры (А, В, С) для растворимых и нерастворимых в воде соединений. Техники А и Б используются, если информация о присутствии растворителей в ЛП недоступна. С деталями методик можно ознакомиться в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Условия определения остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии [45]

	Техника А	Техника В	Техника С
Пробоподготовка			
Растворимые в воде	Точную навеску препарата ~250 мг поместить в колбу объемом 25 мл, добавить 10 мл воды, тщательно перемешать до полного растворения и довести объем колбы до метки водой. Аликвоту получившегося раствора $V = 5$ мл добавить к 1 мл воды в вialsе		
Нерастворимые в воде	Точную навеску препарата ~500 мг поместить в колбу объемом 10 мл, растворив в небольшом количестве N,N-диметилформамида (ДМФА), довести объем колбы до метки растворителем. Аликвоту получившегося раствора $V = 1$ мл добавить к 5 мл воды в вialsе		
Параметры для парофазного анализа			
Температура равновесия, °С	80	105	80
Установление равновесия, мин	60	45	45
Температура поточной линии, °С	85	110	105
Газ-носитель	Азот или гелий при соответствующем давлении		
Время нагнетания	30 с		
Объем ввода	1 мл		

	Техника А	Техника В	Техника С
Тип колонки	¹ G43 (только для водорастворимых) 30м×0.32мм×1.8мкм 30м×0.53мм×3.0мкм	² G16 30м×0.32мм×0.25мкм 30м×0.53мм×0.25мкм	¹ G43 30м×0.32мм×1.8мкм 30м×0.53мм×3.0мкм
Газ-носитель	Азот или гелий		
Скорость газа-носителя	Около 35 см ³ /с		
Температура инъекционного порта	140°C		
Коэффициент деления потока	1:5 для растворимых и 1:3 для нерастворимых (может изменяться для повышения чувствительности)		1:5 (может оптимизироваться)
Градиент температуры	40°C 20 мин, 240°C со скоростью 10°C/мин, 240°C 20 мин	50°C 20 мин, 165°C со скоростью 6°C/мин, 165°C 20 мин	40°C 20 мин, 240°C со скоростью 10°C/мин, 240°C 20 мин
Тип детектора	Пламенно-ионизационный детектор (ПИД)		
Температура детектора	250°C		

Примечание: ¹6%-цианопропилфенил-94%-диметилполисилоксан; ²полиэтиленгликоль

Перечень растворителей, которые можно определить методом ГХ в соответствии с процедурами А, В, С, ограничен и не включает специфические органические растворители. В статье <467> [45] также предложены 4 методики (Методика I, IV, V, VI) для определения трихлорметана, 1,4-диоксана, дихлорметана (ДХМ) и трихлорэтилена (Табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Условия определения специфических остаточных органических растворителей методом ГХ [45]

	Методика I	Методика IV	Методика V	Методика VI
Пробоподготовка	Растворить навеску препарата в воде или другом соответствующем растворителе, чтобы получить концентрацию 20 мг/мл (В методике IV помещать аликвоту объемом 5 мл в вials для хроматографа)			
Способ введения	Прямой	Парофазный анализ	Прямой	
Тип колонки	¹ G27 30м×0.53мм×5мкм 25м×0.53мм	³ G43 30м×0.32мм×3мкм, 25м×0.53мм		Одна из 9 колонок в [3]
Газ-носитель	Гелий			*
Скорость газа-носителя	Около 35 см ³ /с			*
Температура инъекционного порта	70°C	70°C закрытая вials при 80°C 60 мин	140°C	*
Коэффициент деления потока	Неспецифично			
Градиент температуры	35°C 5 мин, до 175°C 8°C/мин, до 260°C 35°C/мин, 260°C 16 мин	40°C 20 мин, до 240°C 10°C/мин, 240°C 20 мин		*
Тип детектора	ПИД			
Температура детектора	260°C			*

Примечание: ¹5%-фенил-95%-метилполисилоксан; ²дезактивированная фенилметилсилоксаном (ФМС), ³6%-цианопропилфенил-94%-диметилполисилоксан; *соответствует выбору колонки

Последняя, на данный момент, ХХХХ ФСША [46] в статье <467> не выделяет специфические растворители, а относит трихлорметан, 1,4-диоксан, ДХМ, трихлорэтилен к растворителям второго класса токсичности и использует процедуры А, В, С для их определения. Также добавлена температура шприца для ввода пробы в методике А – 80-90°С, В – 105-115°С, С – 80-90°С. Время нагнетания в параметрах системы ввода равновесного пара увеличено до 60 с.

Европейская фармакопея (ЕФ) [47] немногим отличается от ФСША. Она включает три способа пробоподготовки. Первый способ предназначен для препаратов растворимых в воде, для чего навеску препарата растворяют в колбе объемом 20 мл. Второй способ используют для препаратов нерастворимых в воде, в качестве растворителя применяют ДМФА; пробоподготовка аналогична первой методике. Если в препарате присутствуют такие остаточные растворители, как N,N-диметилацетамид (ДМАА) и ДМФА, то в качестве растворителя соединения используют 1,3-диметил-2-имидазолидинон, и это третий способ пробоподготовки. Параметры системы ввода равновесного пара и хроматографические условия полностью совпадают с параметрами техник А и В в Американской фармакопее [45].

Подводя итог, можно констатировать, что фармакопея РФ не приводит условий пробоподготовки и не решает задачу определения ООР в ЛП методом ГХ. В статье «остаточные органические растворители» приведено разделение растворителей по классам токсичности и соответствующие ПДС. Статья <467> ФСША, в отличие от фармакопеи РФ, включает условия пробоподготовки, параметры работы ГХ и предложения по выбору неподвижной фазы (НФ) в зависимости от анализируемых ООР. Также выделены условия определения специфических растворителей, к которым относятся трихлорметан, 1,4-диоксан, ДХМ и трихлорэтилен. В более поздней версии ФСША данные растворители отнесены ко второму классу токсичности. ЕФ немногим отличается от ФСША.

1.2.2 Определение остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии

Для разработки методики определения ООР методом ГХ необходимо подобрать технику введения анализируемой пробы, режим хроматографического разделения и способ детектирования.

1.2.2.1 Введение пробы в испаритель

Прямой способ используется при введении жидкой пробы в испаритель с помощью шприца. Одним из недостатков данного метода является влияние матрицы ЛП на определение летучих компонентов [48]. Помимо этого матрица может содержать нелетучие или коррозионные соединения, которые значительно сокращают эксплуатационное время колонки [40, 49]. Поэтому такой способ ввода применяют для ФС, которые содержат исключительно действующее вещество без наполнителей. В исследовании [50] сообщалось, что при введении бензилового спирта в качестве растворителя солей ЛП в результате взаимодействия при высоких температурах образуется бензол. Таким образом, температура испарителя должна быть достаточно высокой, чтобы удалось перевести все компоненты в газообразное состояние, и низкой, чтобы избежать проблем с реакционной способностью и разложением соединений. Как правило, температура испарителя составляет 200°C и ниже [49].

В работе [51] разработана методика определения метанола, ДХМ, *n*-гексана, ЭА, тетрагидрофурана (ТГФ), (изо)октана, 1,4-диоксана, толуола и ДМФА методом ГХ с прямым вводом для нерастворимого в воде ЛП. Многими авторами отмечается простота и надежность данного способа введения пробы в испаритель.

Одним из предпочтительных методов определения ООР в паровой фазе является парофазный анализ (ПФА), который также нашел широкое применение в фармацевтической индустрии [52, 53, 54, 55, 56, 57, 58]. Очень часто требуется отделение нелетучих компонентов или продуктов разложения от анализируемой пробы, чтобы увеличить срок службы хроматографической колонки. Сейчас доступно два типа парофазного анализа: динамический и статический [59, 60, 61]. В динамическом режиме непрерывный поток газаносителя собирает летучие соединения с поверхности матрицы образца и переносит в ловушку, где эти примеси аккумулируются и концентрируются, затем начинается цикл термической десорбции и ООР попадают на хроматографическую колонку. Динамический режим отличается более низкими ПО по сравнению со статическим режимом, не требует установления равновесия между газом и матрицей образца, характеризуется отсутствием пика растворителя на хроматограмме.

В статическом режиме жидкость или, иногда, твердый образец помещают в герметичный флакон, далее флакон нагревают, после установления равновесия отбирается газовая фаза и вводится в хроматограф. Этот режим предпочтителен, если препарат растворим в воде, бензиловом спирте, ДМФА, диметилсульфоксиде (ДМСО). В статье [62] сообщается о простой и быстрой методике определения следовых растворителей, включая этанол, изопропанол, *n*-бутанол, 1,4-диоксан, ТГФ, ацетонитрил, метанол и ацетон, которые, пре-

имущественно, используются при синтезе и выделении ФС и ЛП. Разработана и валидирована методика с использованием метода ГХ в сочетании со статическим парофазным анализом для определения ООР в активных ФС дигидрохлорид прамипексола, ривароксана, лизиноприла, рамиприла, иматиниба и ситаглиптина. Авторы [63] предлагают определение петролейного эфира, ацетона, ТГФ, ЭА, метанола, ДХМ и пиридина в линезолиде с использованием статического режима, проведена валидация методики. Известно применение парофазного анализа не только для твердых субстанций и препаратов, но и для разнообразных жидких лекарственных форм. В исследовании [64] проводится определение этанола в коммерческих медицинских сиропах для детей. В работе [65] указывается важность определения остаточного бензола при добавлении бензоата натрия для антимикробного действия в пероральных фармацевтических жидкостях.

Твердофазная микроэкстракция (ТФМЭ), как и динамический режим, имеет преимущество в том, что происходит концентрирование аналитов, тем самым значительно уменьшаются ПО определяемых ООР. Устройство для ТФМЭ представляет собой шприц, к плунжеру которого присоединяется кварцевый стержень, покрытый соответствующим полимером. Проба, находящаяся в герметично закрытой вials, отбирается при прокалывании иглой мембраны. При введении жидкой пробы в хроматограф, стержень с полимером опускается в анализируемый раствор, а при парофазном анализе, стержень находится над поверхностью исследуемой жидкости. Время экстракции подбирается экспериментально. Затем плунжером стержень втягивается в иглу, игла прокалывает септу хроматографа, с помощью плунжера стержень выходит из иглы и далее происходит десорбция внутри испарителя [66]. Возможность уменьшения матричных помех делает парофазный анализ в сочетании с ТФМЭ – одним из наиболее распространенных методов при определении остаточных растворителей в фармацевтической индустрии [67].

Авторами [68] получен патент на новый нанокompозитный материал для ПФА в сочетании с ТФМЭ при определении ООР в фармацевтических препаратах. В статье [69] приводится методика определения пиридина, ацетона, ДХМ, диэтиламина в антибиотике цевтазидиме методами ГХ и ГХ-МС в сочетании с ТФМЭ. В работе [70] доказывается отсутствие таких остаточных растворителей, как метанол, этанол, ацетон, ацетонитрил и ДМАА в антибиотике широкого спектра действия – тамицине методом ГХ с ТФМЭ. Техника ТФМЭ разработана и оптимизирована для определения полярных растворителей в фармацевтических препаратах. Интересные результаты получены в исследовании [71]; изучено влияние условий экстракции на чувствительность и воспроизводимость методики для пяти различных полимеров. Исходя из полученных зависимостей, для каждого лекар-

ственного препарата и соответствующего набора растворителей подобраны подходящий способ пробоподготовки и полимер.

1.2.2.2 Выбор неподвижной фазы

Сердцем хроматографа является колонка. Выбор колонки во многом определяется поставленной задачей. Капиллярные колонки состоят из длинной трубки (металл, стекло или кварц) диаметром от 50 до 500 мкм и длиной от 5 до 200 м. Капиллярные колонки покрыты внутри тонким слоем пленки НФ. Большинство НФ являются высокомолекулярными соединениями с высокой термической стабильностью. Самыми распространенными НФ являются полисилоксаны и полиэтиленгликоли. Перечень наиболее применяемых НФ в фармацевтическом анализе представлен в таблице 4.

Неподвижные фазы для газовой хроматографии в фармацевтическом анализе

Неподвижная фаза	Производитель/марка хроматографической колонки								
	Phenomenex Zebron [72]	Agilent Technologies [73]	Restek [74]	Supelco [75]	Alltech [76]	SGE [77]	Machery-Nagel [78]	Quadrex [79]	П* USP
6%-цианопропилфенил- 94%-диметилполисилоксан	ZB-624	DB-1301, DB-624, VF-1301ms, VF-624ms, CP-Select624Hexane, CP-Select624CB	Rxi-624Sil MS Rtx-1301, Rtx-624	SPB-624, OVI-G43	AT-624, AT-1301	BP624, BPX- VOL- ATILE S	OPTIMA 1301, OPTIMA 624, OPTIMA 624 LB	007-1301, 007-624	H/C G43
полиэтиленгликоль	ZB-WAX plus, ZB-WAX	VF-WAXms, DB-WAXUltraInert, HP-INNOWax, DB-WAXetr, DB-WAX, CP-Wax52CB	Stabilwax, Rtx-Wax	Omegawax, SUPEL- COWAX 10	AT-WAXms, AT-WAX, AT-AquaWax, EC-WAX	BP20 (Wax)	OPTIMA WAX, OPTIMA WAX- plus	007-CW	B G16
5%-фенил-95%-диметил- полисилоксан	ZB-5, ZB-5MSi, ZB-5HT Inferno, ZB-5ms	DB-5ms, DB-5, DB-5ht, VF-5ms, HP-5, DB-5msUltraInert, VF-5ht, HP-5ms, CP-Sil8CB, HP-5msUltraInert	Rtx-5, Rtx-5MS, Rxi-5ms	SLB-5ms, Equity-5, SPB-5	AT-5, EC-5, AT-5ms	BP5, BP5MS	OPTIMA 5, OPTIMA 5MS	007-5	HP G27
диметилполисилоксан	ZB-1, ZB-1ms, ZB-1HT	HP-1msUltraInert, Ultra 1, HP-1ms, HP-1, DB-1ms, VF-1ms, DB-1msUltraInert, DB-1,CP-Sil5CB,Ultra2	Rtx-1	Equity-1, SPB-1	AT-1ms, AT-1ht, AT-1, EC-1	BP1	OPTIMA 1	007-1	HP G2
50%-трифлуоропропил- метилполисилоксан	-	DB-210, VF-200ms, DB-200	Rtx-200, Rtx-200 MS	-	AT-210	-	OPTIMA 210	-	C/B G6

Примечание: *П-полярность, Н-низкая, С-средняя, В-высокая, HP-неполярная

1.2.2.3 Сравнение методов детектирования

Детекторы для ГХ (Табл. 5) на 4-5 порядков более чувствительны по сравнению с детекторами для ЖХ, что делает их незаменимыми для анализа ЛП на присутствие в них ООР [44].

Характеристики ПИД, МС, ИК, ^{63}Ni электрозахватного (^{63}Ni ЭЗД), фотоионизационного (ФИД), термоионного (ДТИ), пламенно-фотометрического (ПФД) детекторов и детекторов по теплопроводности (ДТП), по элетролитической проводимости (ДЭП), по тепловой энергии (ДТЭ) для ГХ [80]

Детектор	Тип	Предел обнаружения	Селективность	Лин. диап.	T, °C
ПИД	Универсальный (для углеродных соединений, за исключением CS_2 , CO)	2×10^{-12} г/с	-	$> 10^7$	420
МС	Универсальный или селективный	ЭИ: 10-100 пг ХИ: 25 фг	*	10^5	350
^{63}Ni ЭЗД	Селективный (галогены и другие электронно-захватные группы)	$\sim 5 \times 10^{-15}$ г	-	10^4	420
ФИД	Универсальный	2×10^{-13} г/с	**	$> 10^7$	350
ДТП	Универсальный	4×10^{-10} г/мл (пропан)	-	$> 10^5$	400
ДТИ	Селективный (азот- и фосфорсодержащие органические соединения)	N 1×10^{-13} г/с P 5×10^{-14} г/с	N/P 1:5 N/C 5×10^4 :1 P/C 10^5 :1	10^5	420
ПФД	Селективный (сера и фосфор)	S $< 1 \times 10^{-11}$ P $< 1 \times 10^{-12}$	S/C 10^3 - 10^6 :1 P/C $> 10^5$:1	$\geq 10^3$ $\geq 10^4$	420
ДЭП	Селективный (галогены, сера, азот и соединения с эфирной группой)	Cl 5×10^{-13} г/с N 2 - 4×10^{-12} г/с S 2 - 4×10^{-12} г/с	Cl/C $> 10^6$:1 N/C $> 10^6$:1 S/C $> 5 \times 10^4$:1 NO/N $> 10^2$:1	10^6 Cl 10^4 N 10^4 S	400
ДТЭ	Селективный (нитрозоамины)	100 пг (диметилнитрозоамин)	N-NO/C ∞ N-NO/NO 1-4:1	10^6	***
ИК	Универсальный или селективный	200 пг-40 нг	*	10^4	280-375

Примечание: *разные значения, зависящие от многих факторов; **зависит от энергии ионизации; ***соответствует пределу газохроматографической колонки

1.2.2.4 Пробоподготовка при определении остаточных растворителей в фармацевтических продуктах

Выбор растворителя для растворения ФС и ЛС при определении ООР играет немаловажную роль. В работе [81] рассматриваются следующие растворители для ЛП: ДМСО, ДМФА, ДМАА, бензиловый спирт, 1,3-диметил-2-имидазолидинон и вода при определении семнадцати ООР, которые используются при синтезе и очистке. Было установлено, что форма пика не зависит от растворителя, в то время как среда оказывает сильное влияние на интенсивность сигнала метанола. При растворении препарата в бензиловом спирте интенсивность в 4 раза выше, чем при растворении в ДМСО. Также интенсивности пиков удваиваются при повышении равновесной температуры на 20°C в интервале от 80 до 140°C, и нет различий в поведении среди шести исследуемых матриц. Перед растворением, если необходимо, ТЛФ измельчают в ступке с пестиком или в лабораторной мельнице.

1.2.2.5 Альтернативные методы определения остаточных органических растворителей

К другим методам для определения остаточных растворителей в фармацевтических препаратах относятся термогравиметрический анализ (ТГА) [82], анализ хлора в хлорсодержащих органических растворителях [83], дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) [84], ИК-спектроскопия [85], ¹H-ЯМР-спектроскопия [86]. ТГА имеет ПО 100 ppm и требует небольшое количество исследуемого материала (5-20 мг). Не только ТГА и ДСК в термическом анализе используются, но и дифференциальный термический анализ (ДТА). Применяя эти методы, были определены ДХМ [87], хлороформ [88], изопропанол [82]. ИК-спектроскопия может также использоваться для идентификации и определения ООР, только ПО значительно уступает методу ГХ и составляет 100 ppm. Такой же ПО показал метод ЯМР при определении остаточных бензола, толуола, метилэтилкетона, этилового эфира, ДХМ и ЭА [86].

Таким образом, при разработке методики определения ООР необходимо выбрать технику введения образца в испаритель, НФ, чтобы определяемые растворители делились с требуемым разрешением, условия хроматографирования, детектор и растворитель для перевода ЛП в раствор. Рассмотренные методы для определения ООР в ФС и ЛП значительно уступают методу ГХ в чувствительности.

1.3 Элементные примеси

1.3.1 Терминология и допустимые суточные воздействия элементных примесей на организм человека при разных способах введения лекарственного средства

Термин «тяжелые металлы» включает группу металлов, металлоидов и некоторые неметаллы, которые относятся к загрязнителям и обладают потенциальной токсичностью. Однако, в разных источниках термин «тяжелые металлы» не всегда связывают с химическими и токсикологическими свойствами, поэтому употребление этого термина иногда бывает ошибочным. Более того, термин «тяжелый» подразумевает высокую плотность и не всегда это соотносится с токсичностью элемента. Фармакопея РФ [3] включает в перечень тяжелых металлов Pb, Hg, Bi, Sb, Sn, Cd, Ag, Cu, Mo, V, Ru, Pt и Pd, при этом в списке отсутствует Co и Ni, которые являются весьма токсичными элементами. Металлоид As в фармакопее РФ вынесен в отдельную ОФС.1.2.2.2.0004.15. Фармакопея США [89] относит к тяжелым металлам Ag, As, Bi, Cd, Cu, Hg, Mo, Pb, Sb и Sn, в то время как некоторые элементы, обладающие токсичностью, не охватываются. В качестве примера можно привести группу платиновых металлов, которые используются как катализаторы в синтезе фармацевтических соединений. Термин «металлические примеси» также является менее подходящим, поскольку он может указывать на примеси из металлов или металлических сплавов и не охватывает примеси из неметаллов и металлоидов, таких как As. Можно использовать термин «неорганические примеси», как рекомендует Международная конференция по гармонизации [4], но он исключает металлоорганические соединения, которые могут быть более токсичными, чем неорганические загрязнители. Авторы [90] предлагают применять термин «элементные примеси» и включить в эту группу загрязнители, основываясь на их токсичности и риске для здоровья человека. Далее нами в данном обзоре будет применен термин «элементные примеси».

Каждый элемент имеет свой класс токсичности и суточную дозу в зависимости от способа введения препарата в организм (Табл. 6) [91]. Эти значения регулируются статьями <232> фармакопее США [89], Q3D Международной конференции по гармонизации [91] и другими фармакопеями мира.

Допустимое суточное воздействие элементных примесей с максимальной суточной дозой ЛС ≤ 10 г/сут [91]

Элемент	Класс	Пероральные, мкг/день	Парентеральные, мкг/день	Ингаляционные, ЛС, мкг/день
Cd	1	0.5	0.2	0.2
Pb	1	0.5	0.5	0.5
As	1	1.5	1.5	0.2
Hg	1	3	0.3	0.1
Co	2A	5	0.5	0.3
V	2A	10	1	0.1
Ni	2A	20	2	0.5
Tl	2B	0.8	0.8	0.8
Au	2B	10	10	0.1
Pd	2B	10	1	0.1
Ir	2B	10	1	0.1
Os	2B	10	1	0.1
Rh	2B	10	1	0.1
Ru	2B	10	1	0.1
Se	2B	15	8	13
Ag	2B	15	1	0.7
Pt	2B	10	1	0.1
Li	3	55	25	2.5
Sb	3	120	9	2
Ba	3	140	70	30
Mo	3	300	150	1
Cu	3	300	30	3
Sn	3	600	60	6
Cr	3	1100	110	0.3

Не всегда требуется характеристика всех 24 элементов. Если препарат предназначен для перорального введения, то необходимо определить загрязнители 1 и 2A класса токсичности, в сумме 7 загрязнителей. Элементы в список определяемых примесей вводятся только по необходимости. Если в ходе синтеза применяется катализатор, тогда в зависимости от состава катализатора, вводятся дополнительные элементы, в основном, загрязнители класса 2B. Таким образом, если препарат пероральный и в процессе синтеза используется катализатор, то требуется характеристика 17 элементов из 24.

1.3.2 Испытания по показателю «тяжелые металлы» согласно требованиям фармакопеи

1.3.2.1 Определение показателя «тяжелые металлы» в соответствии с фармакопеей Российской Федерации

ОФС.1.2.2.2.0012.15 «Тяжелые металлы» XIV фармакопеи РФ [3] посвящена определению таких примесей, как Pb, Hg, Bi, Sb, Sn, Cd, Ag, Cu, Mo, V, Ru, Pt, Pd. Метод анализа примесей в ЛП основан на образовании окрашенных сульфидов. В фармакопее РФ, как и в

ведущих фармакопеех мира, приведены сульфидный и тиацетамидный методы. После проведения реакции окраску испытуемого раствора сравнивают с окраской эталонного раствора. ПДС металлов и способ пробоподготовки должны быть указаны в фармакопейной статье препарата. В ОФС описаны условия определения тяжелых металлов в растворах ЛС и в зольном остатке органических ЛС. В статье также отмечается, что данные методы не являются специфичными и позволяют характеризовать суммарное содержание тяжелых металлов в Рв-эквиваленте. Для количественного определения отдельных ионов следует использовать атомно-абсорбционную спектрометрию (ААС), атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-АЭС) и масс-спектрометрию с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) (Табл. 7). Хотя условия определения отсутствуют.

Т а б л и ц а 7

Определение некоторых элементных примесей согласно фармакопее РФ

Элемент	Метод
Алюминий ОФС.1.2.2.2.0001.15	Флуориметрия (метод 1) или ААС (метод 2)
Мышьяк ОФС.1.2.2.2.0004.15	Восстановление соединений As до мышьяковистого водорода с последующим получением желто-бурого продукта реакции (метод 1) или до металлического As (метод 2) (визуальные методы)
Ртуть ОФС.1.2.2.2.0005.15	Экстракционно-фотометрическое определение ртути (II)-иона с дитизоном (метод 1) или ААС с беспламенной атомизацией – метод «холодного пара» (метод II)
Цинк ОФС.1.2.2.2.0010.15	Основано на образовании с раствором калия ферроцианида белого помутнения или белого осадка (визуальный метод – оценка помутнения)
Железо ОФС.1.2.2.2.0011.15	Образование окрашенных растворов с сульфосалициловой кислотой в аммиачной среде (метод 1) или с тиогликолевой кислотой в аммиачной среде (метод 2) или с аммония тиоцианатом в кислой среде (метод 3) (визуально-колориметрические методы)
Тяжелые металлы ОФС.1.2.2.2.0012.15	Образование окрашенных осадков с сульфидным реактивом (метод 1) и с тиацетамидным реактивом (метод 2) (визуально-колориметрические методы)

1.3.2.2 Определение показателя «тяжелые металлы» в соответствии с фармакопеей Соединенных Штатов Америки

Статья <231> «Heavy metals» ФСША при определении тяжелых металлов рекомендует визуальное сравнение окраски осадка сульфида или тиацетамида металла со стандартным раствором. Пробоподготовка ФС и ЛП включает три способа, выбор которого зависит от растворимости препарата и возможности образовывать окрашенные растворы в слегка кислых условиях (Табл. 8). Этот метод появился в ФСША в 1905 году и имел ряд недостатков: неспецифичность; не позволяет идентифицировать отдельные элементы; невоспроизводимость результатов, связанная с изменением окраски стандартного раствора при стоянии; большие затраты образца (~1 г); трудоемкая пробоподготовка; потеря лету-

чих компонентов при высоких температурах. Доказательства несостоятельности условий пробоподготовки, указанных в статье <231> ФСША, приведены в работе [92]. Авторы отмечают, что плохое извлечение элементов не является неожиданностью, учитывая высокие температуры (~500-600°C), которым образец подвергается во время пробоподготовки. Для нескольких элементов, включая Se, Sn, Sb, Ru, Hg, извлечение при озолении составило менее 10%. Не менее тревожными оказались показатели извлечения для Pb, As, Cd, Mo, Pd, Pt, In, средние значения которых лежали в интервале от 30 до 50%. Серебро было единственным элементом, извлечение которого составило 97%. В апреле 2009 года ставится задача разработать приемлемые методики для определения элементных примесей в ФС и ЛП и, в результате, вводятся две новые статьи <232> «Elemental impurities – limits» (перевод с англ. «Элементные примеси – пределы») и <233> «Elemental impurities – procedures» (перевод с англ. «Элементные примеси – процедуры»). В <232> статье указаны ограничения на содержания элементных примесей в ЛП и добавках. В <233> перечислены методики ИСП-АЭС и ИСП-МС, при этом допускается использование альтернативных процедур.

Т а б л и ц а 8

Определение примесей согласно фармакопее США [89]

Элемент	Особенности приготовления посуды и реактивов	Пробоподготовка препарата	Метод
Алюминий <206>	Не требует специального приготовления	Если нет указаний в частной статье, то точную навеску препарата помещают в пластиковую колбу, добавляют воду, обрабатывают ультразвуком. Прибавляют HNO ₃ , доводят до метки и перемешивают.	Определение Al методом ААС (λ=309.3 нм)
Мышьяк <211>	Используют мышьяковый испытательный аппарат	Если нет указаний в частной статье, в генератор арсина помещают рассчитанную навеску и растворяют в воде.	Получают комплекс арсина с ДДТК красного цвета, сравнивают визуально или спектрофотометрически
		Если нет указаний в частной статье, в генератор арсина помещают рассчитанную навеску препарата, добавляют конц. H ₂ SO ₄ , также несколько стеклянных шариков, накрывают колпаком и нагревают на плитке. Добавляют по каплям 30%-ную H ₂ O ₂ при нагревании. Далее промывают и разбавляют водой.	
Тяжелые металлы в Рв экв. <231>	Метод I: прозрачные растворы, препараты растворимы в воде Условия: рН=3.0-4.0	Если нет указаний в частной статье, навеску препарата растворяют сначала в небольшом количестве конц. HNO ₃ , далее разбавляют водой.	Визуальный метод, тиацетамид-глицириновый реактив

Элемент	Особенности приготовления посуды и реактивов	Пробоподготовка препарата	Метод
Тяжелые металлы в Рв экв. <231>	Метод II: непрозрачные растворы, препараты нерастворимы в воде Не подходит для Hg Условия: рН=3.0-4.0	Если нет указаний в частной статье, навеску препарата помещают в тигель, добавляют конц. H ₂ SO ₄ , осторожно сжигают до полного обугливания. К полученной массе добавляют HNO ₃ и H ₂ SO ₄ и повышают температуру. Сжигают в муфельной печи при 500-600°C. Охлаждают, прибавляют HCl, выпаривают на водяной бане, охлаждают и количественно переносят в пробирку.	Визуальный метод, тиацетамид-глицериновый реактив
	Метод III Используют, если не подходит метод I, II Условия: рН=3.0-4.0	Если нет указаний в частной статье, разложение навески препарата проводят смесью конц. HNO ₃ и H ₂ SO ₄ при нагревании. Далее раствор охлаждают, затем нагревают с конц. HNO ₃ . При неполном разложении используют 30%-ную H ₂ O ₂ . Далее остаток промывают и растворяют в воде.	
Железо <241>	Не требует специального приготовления	Если нет указаний в частной статье, навеску препарата растворяют в воде. Прибавляют HCl и перемешивают.	Визуальный метод, аммония персульфат и аммония тиоцианат
Свинец <251>	Реактивы хранят в посуде из боросиликатного стекла. Все стекло промывают теплой HNO ₃ (1:2), а затем водой	Аналогично методике разложения препарата при определении мышьяка. Разложение конц. H ₂ SO ₄ и 30%-ной H ₂ O ₂ при нагревании. Вместо генератора арсина используют подходящую колбу.	Экстракция Рв раствором дитиона
Ртуть <261>	Исследование проводят при слабом освещении	Навеску препарата помещают в коническую колбу, прибавляют смесь конц. H ₂ SO ₄ и HNO ₃ , присоединяют конденсатор, нагревают смесь в течение часа, охлаждают, разбавляют водой, переносят в мерную колбу перемешивают и фильтруют.	Экстракция Hg раствором дитиона
	Стекло промывают теплой HNO ₃ (1:2), а затем водой. Требуется аппарат для аэрации	Навеску препарата помещают в химический стакан, прибавляют воду, перемешивают и нагревают до растворения. Доводят до необходимого значения рН. Добавляют конц. H ₂ SO ₄ и KMnO ₄ , накрывают стакан часовым стеклом, кипятят несколько секунд и охлаждают.	Определение Hg методом ААС (λ=253.6)
	Стекло промывают теплой HNO ₃ (1:2), а затем водой. Требуется аппарат для аэрации. Аппарат для перегонки	Навеску препарата помещают в коническую колбу, добавляют смесь конц. H ₂ SO ₄ и HNO ₃ и несколько стеклянных шариков, перегоняют (Т не превышает 120°C). Далее по каплям добавляют 30%-ную H ₂ O ₂ при нагревании. Продолжают реакцию до полного разложения вещества, охлаждают, промывают водой. Добавляют раствор KMnO ₄ , кипятят несколько секунд и охлаждают.	

1.3.2.3 Определение показателя «тяжелые металлы» в соответствии с Европейской фармакопеей

В перечень пятнадцати элементных примесей, согласно статье 2.4.8 «Heavy metals» («Тяжелые металлы») ЕФ [93], входят Pb, Hg, Bi, As, Sb, Sn, Cd, Ag, Cu, Mo, V, Pd, Pt, Au и Ru. В статье указаны условия семи способов пробоподготовки для растворения/разложения ФС и ЛП (Табл. 9) перед визуальным сравнением окрашенных осадков элементов с окраской осадка в стандартном растворе. Помимо тиацетамидного реактива, в ЕФ и ФСША применяется натрия сульфид, в Японской фармакопее (**ЯФ**) XVII [94] используется только сульфидный метод.

В 2013 году в ЕФ вводится две новые статьи 5.20 «Metal catalyst or metal reagent residues» (перевод с англ. «Остатки металлических катализаторов или металлосодержащих реактивов») и 2.4.20 «Determination of metal catalyst or metal reagent residues» (перевод с англ. «Определение остатков металлических катализаторов или металлосодержащих реактивов»). Статья 5.20 ЕФ воспроизводит руководство по спецификации остаточных количеств металлических катализаторов или металлосодержащих реактивов, опубликованное Европейским агентством по лекарственным препаратам (**ЕМА**), которое применимо для ЛП, ФС и вспомогательных веществ, за исключением препаратов, предназначенных только для ветеринарного применения. В статье 2.4.20 указаны все рекомендуемые способы пробоподготовки и методы определения элементных примесей в ЛП: 2.2.22 «Atomic emission spectrometry» (перевод с англ. «Атомно-эмиссионная спектрометрия»), 2.2.23 «Atomic absorption spectrometry» (перевод с англ. «Атомно-абсорбционная спектрометрия»), 2.2.37 «X-ray fluorescence» (перевод с англ. «Рентгенофлуоресцентная спектрометрия»), 2.2.57 «Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry» (перевод с англ. «Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой»), 2.2.58 «Inductively coupled plasma-mass spectrometry» (перевод с англ. «Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой»), 2.4.2 «Arsenic» (перевод с англ. «Мышьяк»), 2.4.9 «Iron» (перевод с англ. «Железо»), 2.4.10 «Lead in sugars» (перевод с англ. «Свинец»), 2.4.15 «Nickel in polyols» (перевод с англ. «Никель в полиолах»), 2.4.31 «Nickel in hydrogenated vegetable oils» (перевод с англ. «Никель в гидрогенизированных растительных маслах») [95].

**Способы пробоподготовки фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов
в соответствии с требованиями ЕФ [93]**

Назначение метода пробоподготовки	Описание
Метод А – прозрачные растворы/растворимые в воде препараты	Приготовление водного раствора препарата
Метод В – прозрачные растворы/растворимые в органических растворителях препараты	Приготовление раствора препарата в органических растворителях с минимальным содержанием воды
Метод С	Озольнение препарата с добавкой $MgSO_4$ в H_2SO_4 при $T < 800^\circ C$ в течение 2-х часов. Остаток растворить в воде
Метод D	Озольнение препарата с добавкой MgO при $T < 800^\circ C$ в течение часа. Остаток растворить в воде
Метод Е	Приготовление водного раствора/фильтрование
Метод F	Мокрое разложение в колбе Кьельдаля
Метод G	Микроволновое разложение

Рассмотрев требования по определению элементных примесей в фармакопеях мира можно отметить, что они весьма отличаются. В фармакопее РФ необходимо контролировать содержание тринадцати тяжелых металлов, а в ФСША и ЕФ – десяти и пятнадцати примесей, соответственно. Переходные металлы Co и Ni имеют 2А класс токсичности, согласно Международной конференции по гармонизации, при этом данные элементные примеси не включены ни в один перечень тяжелых металлов. Также, стоит отметить, что в ФСША и ЕФ более подробно описаны физико-химические методы для спектрального анализа, тогда как в фармакопее РФ условия определения этими методами полностью отсутствуют. Методики, основанные на осаждении металлов в виде сульфидов, характеризуются невоспроизводимостью, трудоемкостью и большими затратами времени. Рекомендованные условия пробоподготовки являются несостоятельными, из-за высокого нагрева образца и, как следствие, потери летучих компонентов.

1.3.3 Методы определения элементных примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах

Выбор инструментального метода является весьма трудоемким процессом, требующим оценки селективности, прецизионности, времени и стоимости анализа и особенностей пробоподготовки. Многие методы определения элементных примесей в объектах различной природы представлены в литературе. В данном обзоре проведено сравнение методов определения примесей в разных формах ЛС. Для определения элементных примесей в ФС и ЛП применяют спектрофотометрию, ААС, рентгенофлуоресцентный анализ (РФА), нейтронно-активационный анализ (НАА), ИСП-АЭС, ИСП-МС, МП-АЭС. Далее

в литературном обзоре рассмотрены преимущества и недостатки каждого из методов и приведены примеры анализа объектов фармацевтической индустрии.

1.3.3.1 Спектрофотометрический метод

Преимуществами метода спектрофотометрии является простота в использовании, отсутствие дорогостоящего оборудования и быстрота – это делает данный метод доступным для фармацевтического анализа не только в лаборатории, но и на производстве.

В статье [96] разработана и валидирована простая и быстрая спектрофотометрическая методика определения гидрохлорида цисплатина – важного хемотерапевтического ЛП для лечения рака. Авторами проведена дериватизация реакцией с о-фенилендиамином и определение поглощения комплекса зеленого цвета ($\lambda = 706$ нм) методом спектрофотометрии. Выполнена валидация по следующим характеристикам: градуировочные графики линейны в диапазоне от 0.4 до 1.4 мкг/мл, доказана специфичность, результаты лежат в интервале от 98.0 до 102% при оценке правильности, относительное стандартное отклонение (**RSD**) не превышает 2.5% при оценке прецизионности, определены ПО и предел количественного определения (**ПКО**) методики. В работе [97] тяжелые металлы определены как примеси методом спектрофотометрии в сочетании с мембранной фильтрацией, в качестве лиганда применяли тиоацетамид. Результаты сопоставимы с данными сульфидного метода.

В настоящее время в литературе редко встречаются методики по определению элементных примесей на спектрофотометре, так как в спектральном анализе появилось оборудование значительно превосходящее данный метод по чувствительности.

1.3.3.2 Метод атомно-абсорбционной спектрометрии

ААС широко применяется для определения содержания металлов на уровне мкг/мл и ниже в различных формах ЛС.

В исследовании [98] проведено определение двенадцати различных металлов в ЛП под торговыми марками «Cozaag», «Peprazol», «Zocor» методом ААС высокого разрешения с источником сплошного спектра. Разложение таблеток или капсул выполнено методом мокрой минерализации в колбе Кьельдаля. Авторы отмечают, что добавление $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ позволяет достичь полного разложения пробы в присутствии TiO_2 , который добавляют в ЛС для придания препарату белизны. Трехмерные спектры поглощения, включающие время и длину волны вблизи основной линии элемента, дают возможность с уверенностью определить наличие или отсутствие анализируемого металла. В результате проведенных измерений, содержания Cr, Ni и Cu превышают рассчитанные ПО. Помимо

TiO₂, в качестве наполнителя, часто используют стеарат Mg, который придает форму и соединяет плохо смешивающиеся компоненты капсул и таблеток. Для определения стеарата Mg разработана и валидирована методика определения Mg методом ААС [99]. Mg из капсул и таблеток экстрагируют 0.1 М HNO₃.

В работе [100] проведено определение Pd, Pt, Rh, Be, V, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Sn, Tl, Pb методами ИСП-МС, ААС в графитовой печи, РФА с полным внешним отражением в препаратах «кальция фолинат», «леводопа», «эналаприл малеат». При этом для каждого препарата применяют разные способы пробоподготовки. ЛС «леводопа» растворяют в 0.2 М HNO₃, «эналаприл малеат» – в HNO₃ (1:1). «Кальция фолинат» озоляют при 550°C в течение 1-2 ч, охлаждают, растворяют в смеси HNO₃ и HCl (1:3), раствор нагревают и упаривают досуха, остаток растворяют в 0.2 М HNO₃.

В сухих дрожжах для фармацевтического применения в статье [101] определяют Fe, Zn, Ca, Mg, Na, K методами пламенной ААС и ИСП-АЭС с использованием семи техник разложения. Метод I заключается в растворении образца в HNO₃ при дальнейшем упаривании досуха и растворении остатка в деионизованной воде. Авторы отмечают, что данный способ разложения подходит в большей степени к неорганическим объектам. В методе II образец обрабатывается сначала конц. HNO₃, а затем конц. HCl при нагревании. Применение этого метода предпочтительно для неорганических объектов, например, металлов, сплавов и др. Метод III включает разложение конц. HNO₃ и H₂SO₄ при нагревании, при этом порядок прибавления кислот не имеет значения, эффективность разложения в обоих вариантах сохраняется. Метод IV состоит из последовательного добавления HNO₃, затем HClO₄, порядок добавления кислот очень важен для органических соединений, ввиду их взрывоопасности при разложении HClO₄. В оставшихся трех способах используют сухое озоление в муфельной печи при 550°C: первый – без добавок, второй – с добавкой Mg(NO₃)₂, третий – с добавкой SrCl₂, далее остаток растворяют в разбавленной HNO₃. В органических соединениях при разложении углерод является преобладающим матричным элементом, поэтому требуется подобрать такие условия разложения, чтобы получить прозрачный раствор для введения в спектрометр. Методы сухого озоления показали удовлетворительные результаты с получением чистых и прозрачных растворов, в отличие от методов мокрого озоления, которые потребовали дополнительного центрифугирования проб.

Не все ФС и ЛП растворяются в конц. HNO₃, а также использование кислот приводит к коррозии некоторых металлических элементов оборудования. Большим преимуществом метода ААС перед ИСП-МС или ИСП-АЭС является возможность анализа проб как в водной, так и в органической матрице. Авторами [102] проведено определение Pd в ЛП

методом ААС в графитовой печи. Образцы растворяют в 2%-ной HNO_3 , конц. HNO_3 , ACN -0.1%-ной H_3PO_4 , DMCO , а также для образцов нерастворимых в воде применяют микроволновое разложение. При этом содержание Pd при растворении в конц. HNO_3 и при использовании микроволнового разложения получается несколько заниженным по сравнению с результатами при растворении в водно-органических смесях. Авторы отмечают неполное растворение различных форм Pd в конц. HNO_3 .

50 различных детских сиропов проанализированы на содержание Pb и Cd методом ААС с предварительным разложением смесью $\text{HCl}:\text{HNO}_3$ (3:1). Результаты показывают, что в 60 и 98% сиропов присутствует Pb и Cd , соответственно. Содержание Pb в сиропях варьируется от 0.01 до 1.08 мг/л. Самый высокий уровень Cd обнаружен в препарате под торговым названием «Magcid Suspension» и составляет 2.45 мг/л. Около 41% сиропов содержат Pb ниже ПО, в то время как содержание Cd во всех образцах лежит выше ПО [103].

1.3.3.3 Рентгенофлуоресцентный анализ

РФА основан на облучении исследуемого образца рентгеновским излучением и детектировании флуоресценции определяемого элемента. Образец при этом может находиться в твердом, порошкообразном или жидком состоянии. Так как метод является неdestructивным, появляется большое преимущество повторного использования навесок FC и ЛП . Метод дисперсионной рентгеновской спектроскопии по длине волны (ДРСДВ) успешно применен для определения примесей Cu , Zn , Fe и Cr в ЛП [104]. Авторы [105] также предлагают альтернативу существующим методам определения примесей в фармацевтических статьях, Zn , Fe и Ni определены методом ДРСДВ , при этом в работе отмечают влияние матрицы препарата.

Метод РФА отличается более высокими ПО и значениями погрешностей в сравнении с другими спектральными методами, также отмечается влияние матричных помех на результаты анализа, поэтому данный метод не нашел широкого применения в фармацевтической индустрии.

1.3.3.4 Нейтронно-активационный анализ

НАА относится к неdestructивным методам, требует небольшого количества анализируемого образца, исключает пробоподготовку, включает одновременный анализ 40 элементов. Метод не требует растворения образца, что является большим преимуществом перед такими техниками, как ААС, ИСП-АЭС, ИСП-МС. К недостаткам метода можно отнести трудоемкость, наличие дорогостоящего оборудования и продолжительное время определения для некоторых элементов.

ЛП растительного происхождения, состоящий из трех сухих порошкообразных компонентов, в статье [106] анализируют на присутствие 31 элемента методом НАА с использованием 5-минутной и 6-часовой бомбардировки нейтронами с последующим определением металлов γ -спектрометрией высокого разрешения. Kamath и др. [107] используют методы ИСП-АЭС и НАА для определения Hg в некоторых растительных препаратах. НАА также применяется для определения следовых содержаний Na, Mg, Al, Cl, K, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb, Sr, Zr, Mo, Ag, Cd, Sb, I, Cs, Ba, La, Ce, Nd, Sm, Eu, Tb, Dy, Yb, Lu, Hf, Ta, Hg, Th и U в трех радиоактивных препаратах для медико-биологического использования [108].

1.3.3.5 Метод атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой

ИСП-АЭС позволяет определять одновременно более 60 элементов с высокой чувствительностью и широким линейным диапазоном концентраций. ИСП-АЭС, в отличие от ААС, обеспечивает более низкие ПО, возможность одновременного анализа ряда элементов и широкий динамический диапазон концентраций.

В исследовании [109] проведено определение 17 металлов в аспирине и лизиноприле методом ИСП-АЭС с применением кислотного разложения в микроволновой системе автоклавного растворения. В исследовании предложено использование ультразвукового распыления, что позволяет снизить ПО при анализе примесей. Проведена полная валидация и доказано, что разработанная методика является достоверной, точной и правильной для анализа ЛП на содержание примесей металлов. Также отмечено завышение результатов по Os. Авторы объясняют это тем, что на стадии пробоподготовки мог образоваться OsO₄, что неоднократно отмечалось и другими исследователями.

В работе [110] предложена методика определения тяжелых металлов в антибиотиках в виде порошков методом ИСП-АЭС с использованием образования суспензий. Формирование суспензий проводится в разбавленной HNO₃ в присутствии поверхностно-активного вещества (ПАВ) – Тритон X-100. Две различные конфигурации распылительной камеры и распылителя тестируются для прямого введения суспензии в плазму: распылительная камера циклонного типа в сочетании с распылителем Бабингтона, распылительная камера Скотта в сочетании с распылителем с поперечным сечением. Последний тип распылительной камеры менее эффективен для введения суспензий в плазму. Проведена оптимизация концентрации для приготовления суспензии и рабочих параметров спектрометра, выполнена валидация по требуемым характеристикам. Данный подход позволяет полу-

чить удовлетворительные результаты в сравнении с мокрым разложением кислотами, при этом затраты времени на пробоподготовку являются минимальными.

В статье [111] отмечается, что метод лазерной абляции (ЛА) находит широкое применение для анализа твердых образцов в различных областях, не требуя больших временных затрат на пробоподготовку, но в фармацевтической индустрии для определения тяжелых металлов в таблетках данному методу уделяется недостаточное внимание. Проведено исследование метода ЛА-ИСП-АЭС и ЛА-ИСП-МС для определения Mg и Al в таблетках. RSD для точечного ИСП-АЭС анализа лежит в интервале от 12 до 31%, улучшения от 1 до 6% удастся добиться при использовании отношения сигналов. Для непрерывного сканирования точность варьируется в диапазоне от 1 до 7%. ПО при определении Al и Mg методом ЛА-ИСП-АЭС составляют 70 и 20 мкг/г, соответственно. ПО при определении Al и Mg методом ЛА-ИСП-МС составляют 40 и 6 мкг/г, соответственно. Исходя из полученных результатов, авторы рекомендуют методы ЛА-ИСП-АЭС и ЛА-ИСП-МС для определения металлов в фармацевтических таблетках.

1.3.3.6 Метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой

ИСП-МС значительно превосходит многие методы по значениям ПО, поэтому находит широкое применение для определения примесных элементов в продуктах фармацевтической индустрии (Табл. 10).

Т а б л и ц а 10

Примеры применения ИСП-МС в анализе фармацевтических субстанций и препаратов

Объект/Метод	Металлы	Пробоподготовка	П
Субстанция/ИСП-МС	Ru	Водные растворы: 10 мг субстанции или 100 мкл раствора субстанции + 10 мл 80% HNO ₃	112
Таблетки эналаприла и рамиприла/ИСП-МС	Pd, Pt, Rh	Микроволновая экстракция в «точке помутнения»: 40 мл 0.5% (m/v) Triton X-100 с 2-меркаптобензотиазолом нагревают при 600 Вт до Т помутнения (примерно до 72°C, 5 мин), 1 мин – 0 Вт, 5-мин циклы непрерывного облучения, 1 мин – охлаждение при 360 Вт, далее растворяют в 1 М HCl	113
Субстанция/ ¹ ПИ-ИСП-МС	Cr, Pd, Rh	Растворение в этаноле с использованием твердых адсорбентов	114
Субстанция/ИСП-МС	Pd	Растворение в органических растворителях: 20-500 мг препарата + 20 г моноэтилового эфира диэтиленгликоля + 200 мг тиацетамида	115
Парентеральные растворы/ ¹ ИСП-МС; 2. ИСП-МС с динамической реакционной ячейкой; 3. ПИ- ² ХГП-ИСП-МС	1. As, Cd, Mo, Pb 2. Cr, Mn, Ni, V 3. Hg	Водные растворы, 5% HNO ₃	116
Изосульфат синий/ИСП-МС	Cd, Cu, Cr, Pb, Sn	УФ-фотолиз: 75 мг препарата + 3 мл HNO ₃ в течение 10 мин + 200 мкл H ₂ O ₂ + 2 мл воды + УФ-облучение при 85±5°C в течение 1 часа (с добавлением 0.1 мл H ₂ O ₂ + 1 мл HNO ₃ во время разложения)	117

Объект/Метод	Металлы	Пробоподготовка	□
Таблетки ацетилсалициловой кислоты/ИСП-МС	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, V	Микроволновое горение: 400-700 мг препарата + 5 мл 20% (v/v) HNO ₃ + 20 бар O ₂ ; в течение 5 мин	118
Антигипертензивные таблетки/1. ³ ЭТИ-ИСП-МС с динамической реакционной ячейкой; 2. ИСП-МС с динамической реакционной ячейкой	Cd, Cr, Mo, Pb, Pd, Pt	1. Твердые вещества → получение суспензии: 0.1 г препарата + 10 мл воды + 1% (m/v) АПДК + 0.025% (m/v) 8-оксихинолин + 5 мин обработка ультразвуком 2. Микроволновое разложение в закрытых сосудах: 200 мг препарата + 3 мл HNO ₃ + 1 мл HCl. Программа микроволного разложения указана в источнике. После охлаждения обработка 2 мл H ₂ SO ₄ + 1 мл HNO ₃ + 1 мл HCl + нагрев	119
Микрокристаллическая целлюлоза/ИСП-МС	Os	Кислотное разложение в микроволновой системе автоклавного растворения: 100 мг препарата + 3 мл HNO ₃ , 280°C в течение 30 мин. Раствор уксусной кислоты (0.5%), содержащий тиомочевину (0.01 М) и аскорбиновую кислоту (0.1 г/л), добавляют для стабилизации раствора	120
Активные вещества о-ацетилсалициловая кислота, l-сирин/ПИ-ИСП-МС; ПИ-ИСП- ⁴ МСМА	As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, V, Zn	Водорастворимые: 100 мг + 10 г 1% HNO ₃ /0.15% (v/v) HCl Микроволновое разложение: 100 мг + 3 мл HNO ₃ . Hg и Os стабилизируют HCl и раствором тиомочевины, соответственно. Программа микроволнового разложения указана в источнике	121
Арбидол/1. ЛА-ИСП-МС; 2. ИСП-МС	Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb	1. 100 мг гранулированного образца 2. Микроволновое разложение в закрытых сосудах: 100 мг + 6 мл HNO ₃ + 2 мл H ₂ O ₂ ; 125°C 30 мин	122
Карбамазепин, гидрохлорид амитриптилина, гидрохлорид имипрамина/ИСП-МС	As, Cd, Hg, Pb	Микроволновое горение: 500 мг + 6 мл 7 М HNO ₃ + 20 бар O ₂ ; в течение 5 мин	123
Леводопа, примахин дифосфат, пропранолола гидрохлорид, сульфаметоксазол/1. ИСП-МС; 2. ИСП-МС с динамической реакционной ячейкой; 3. ПИ-ХГП-ИСП-МС	1. Cd, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru 2. Cr, Cu 3. As, Hg	Микроволновое разложение: 10 мин линейное изменение T и выдерживание при 270°C в течение 20 мин, давление до 199 бар (a) 500 мг + 6 мл HNO ₃ для определения As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, V (b) 250 мг + 4.5 мл HNO ₃ + 1.5 мл HCl для определения Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru	124
Субстанция/1. ЭТИ-ИСП-АЭС; 2. ИСП-МС	As, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, V	1. Прямое введение твердого образца: 2.5 мг препарата + фреон в качестве газа-носителя 2. Микроволновое горение: 125 мг + 6 мл HNO ₃ + 20 бар O ₂ , 5 мин	125
Субстанция или конечные продукты (таблетки)/1. ИСП-МС; 2. ИСП-АЭС	1. Cd, Co, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Ru, Rh, Sn, Sb, V 2. Cu, Fe, Zn	Микроволновое разложение в закрытых сосудах: 400 мг препарата + 2 мл воды + 4 мл HNO ₃ и HCl (1:1). Программа микроволного разложения указана в источнике	126
Мультивитаминные, минеральные добавки/ ИСП-МС	As, Cd	Мокрое разложение HNO ₃ и H ₂ O ₂ в нагревательном блоке. Трехступенчатая процедура соосаждения для одновременного отделения As и Cd от матричных солей, которые входят в состав добавок. Пробоподготовка: двухстадийное соосаждение Mg(OH) ₂ , третья стадия – соосаждение HF + NH ₄ OH	127

Примечание: ¹ПИ – проточная инъекция; ²ХГП – химическая генерация паров; ³ЭТИ – электротермическое испарение; ⁴МСМА – магнитный секторный масс-анализатор

1.3.3.7 Метод атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой.

Сравнение методов определения элементных примесей

Последним методом, который описан в данном литературном обзоре, является МП-АЭС. Преимуществом метода МП-АЭС по сравнению с ИСП-АЭС является минимальное использование дорогостоящих газов. В сравнении с ААС метод МП-АЭС обеспечивает более безопасную лабораторную практику, не используя баллоны с легковоспламеняющимися газами. Так как метод появился в 2011 году, методик по определению элементных примесей в ФС и ЛП в литературе практически нет.

В зависимости от поставленной цели выбирается метод определения с необходимыми характеристиками (Табл. 11, 12).

Т а б л и ц а 11

Пределы обнаружения методов определения элементных примесей в фармацевтических продуктах

Элементы	Предел обнаружения (нг/мл)					
	ААС [128]	РФА [129]	НАА [130]	МП-АЭС [131]	ИСП-АЭС [132]	ИСП-МС [133]
Ag	1.0	-	-	5.0×10^{-1}	1.0	5.0×10^{-3}
Al	3.0×10^1	-	2.2×10^{-1}	6.0×10^{-1}	3.0	1.0×10^{-2}
As	-	-	-	-	2.0×10^1	5.0×10^{-3}
Bi	-	-	-	2.4×10^1	-	-
Cd	5.0×10^{-1}	-	-	1.4	1.0	5.0×10^{-3}
Cu	1.0	2.7×10^3	2.2	6.0×10^{-1}	1.0	5.0×10^{-3}
Fe	5.0	-	2.0	1.6	2.0	5.0×10^{-1}
Hg	-	-	-	-	-	-
Mo	3.0×10^1	1.7×10^3	-	1.5	3.0	8.0×10^{-2}
Pb	1.0×10^1	3.1×10^3	-	2.1	1.0×10^1	1.2×10^{-3}
Pd	-	-	-	3.8	-	1.0×10^{-2}
Pt	4.0×10^1	-	-	4.5	-	5.0×10^{-3}
Ru	-	-	-	-	-	1.0×10^{-2}
Sb	-	-	-	-	1.0×10^1	-
Sn	-	-	-	-	3.0×10^1	-
V	-	-	-	-	5.0×10^{-1}	1.0×10^{-2}

Т а б л и ц а 12

Характеристики спектральных методов компанией Agilent Technologies

Критерий	Пламенная ААС	ААС с графитовой печью	МП-АЭС	ИСП-АЭС	ИСП-МС
Диапазон измерений					
> 10%	-	-	-	+	-
1-10%	+	-	-	+	-
1-10000 ppm	+	-	+	+	+
100-1000 ppb	+	+	+	+	+
1-100 ppb	-	+	+	+	+

Критерий	Пламенная ААС	ААС с графитовой печью	МП-АЭС	ИСП-АЭС	ИСП-МС
Число образцов					
Мало	+	+	+	+	+
Несколько	+	-	+	+	+
Много	-	-	-	+	+
Количество элементов в образце					
Единственный	+	+	+	+	+
Мало (2-5)	+	+	+	+	+
Средне (5-10)	+	-	+	+	+
Много (> 10)	-	-	-	+	+
Матрица образца					
< 3% твердые вещества	+	+	+	+	+
3-10%	+	+	-	+	-
> 10%	-	+	-	+	-

Таким образом, для определения элементных примесей, согласно литературным данным, возможно применение методов спектрофотометрии, ААС, РФА, НАА, ИСП-АЭС, ИСП-МС и МП-АЭС. Спектрофотометрия, несмотря на простоту и быстроту анализа, не получила широкого распространения в фармацевтическом анализе, из-за низкой чувствительности метода. ААС отличается экспрессностью, простотой, широким диапазоном определяемых концентраций и возможностью анализа ЛП, растворенных в органической матрице, но при этом метод не позволяет определять несколько элементов одновременно и требует перевода анализируемых образцов в раствор. РФА относится к неdestructивным методам и позволяет повторно использовать образец, но характеризуется высокими значениями погрешностей и результаты анализа подвержены влиянию матричных помех. НАА также является неdestructивным методом, сокращая тем самым время пробоподготовки, но применение данного метода ограничивается дороговизной оборудования. Метод ИСП-АЭС в отличие от ААС позволяет анализировать более 30 элементов одновременно с более низкими ПО. Так как спектрометр рассчитан на работу с жидкими образцами, необходимо проводить пробоподготовку, чтобы перевести определяемые элементы в раствор. Возможен и анализ твердых образцов при сочетании ИСП-АЭС или ИСП-МС с методом ЛА, но при этом резко возрастает влияние матричных помех. ИСП-МС характеризуется самыми низкими ПО среди перечисленных методов и воспроизводимыми результатами. Методу МП-АЭС в литературе посвящено недостаточное количество работ, так как метод появился сравнительно недавно. МП-АЭС относится к оборудованию нового поколения, который направлен на безопасность работы и низкие эксплуатационные расходы. Отличается стабильностью сигнала и простотой в эксплуатации.

1.3.5 Пробоподготовка при определении элементных примесей в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах

Как отмечалось ранее, пробоподготовка является важным этапом при определении элементных примесей в ФС и ЛП. Фармакопейные способы не отвечают требованиям анализа в фармацевтической промышленности (трудоемкость, низкая воспроизводимость и потеря летучих компонентов при высоких температурах). Поэтому в данном обзоре рассмотрены способы и условия разложения органических препаратов, описанные в литературе. Все способы пробоподготовки можно разделить на три основных группы: прямое растворение в воде и органических растворителях или экстракция, растворение кислотами, сжигание органической матрицы. Кислотное растворение и сжигание органического вещества часто проводят в закрытых сосудах микроволновой системы автоклавного растворения. Такой подход позволяет минимизировать загрязнение образцов и устранить проблему потери летучих компонентов. Для анализа твердых образцов без пробоподготовки применяют электротермическое испарение или лазерную абляцию [119, 122, 125].

Большинство методов, несмотря на возможность анализа твердых образцов, рассчитаны на работу с растворами, поэтому требуется пробоподготовка. Растворение образца в воде или органических растворителях является простой и быстрой процедурой, но перед анализом необходимо оценить возможные помехи. Образец обычно растворяют в разбавленных HNO_3 и HCl , но навеска образца ограничивается несколькими десятками миллиграмм (~10-100 мг), чтобы минимизировать помехи, вызванные содержанием углерода. Уменьшение навески приводит к ухудшению ПО, снижая содержание органических веществ, вводимых в плазму. Другой альтернативой способа введения небольших проб образца является использование проточно-инжекционной распылительной системы для получения кратковременного, вместо непрерывного сигнала [114, 116, 121, 124]. Основным ограничением способа растворения препарата в водных растворах является то, что большинство органических соединений нерастворимы в воде.

Решением проблемы низкой растворимости ЛП в водных растворах кислот может быть растворение в органических растворителях, но данный подход до сих пор остается спорным. Безусловно, самым главным преимуществом является простота и быстрота пробоподготовки. Этилкарбитол, ДМФА и этанол входят в число органических растворителей, о которых сообщалось в литературе, для растворения нерастворимых в воде субстанций и препаратов с последующим определением спектральными методами [114, 115, 134].

Кислотное растворение наиболее эффективный способ разрушения органической матрицы; разложение происходит при нагревании или при действии микроволнового из-

лучения. HNO_3 обладает высокой окисляющей способностью и большинство элементов после разложения проб находится в растворе в виде нитратов. Смеси HNO_3 с HCl , HF , HClO_4 , H_3PO_4 , H_2SO_4 и H_2O_2 также используются в зависимости от матрицы и аналитов [135, 136]. Закрытые автоклавы более предпочтительны, так как можно значительно повысить температуру для эффективного разложения пробы, но при этом приходится уменьшать навеску, что естественным образом ухудшает значения ПО и снижает чувствительность. Пригодность такого способа разложения была продемонстрирована в многочисленных работах [119, 120, 121, 122, 124, 126]. Способы пробоподготовки должны гарантировать полное разложение органических соединений и сохранение элементов в растворе в стабильной форме для анализа. Выбор состава разлагающей смеси является важным аспектом при определении таких элементов, как Hg, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru [124, 137]. В частности, для стабилизации Os добавляется KBrO_3 в HCl [137] или тиомочевина в качестве комплексообразующего агента [120, 121], для Hg используется HCl [121].

Поскольку большинство субстанций – органические соединения, метод сжигания является удобным способом для разложения образцов, при этом полностью разрушается органическая матрица, снижая влияние углерода. Превращение органических соединений при сгорании приводит к образованию, главным образом, CO_2 и H_2O в качестве продуктов реакции, а также неорганического остатка (золы), который обычно растворяется разбавленными кислотами перед анализом. Методы сжигания можно рассматривать как относительно простые и быстрые в зависимости от используемого оборудования. Основные проблемы данного метода связаны с загрязнением пробы и потерей аналитов. Методы сжигания, проводимые в открытых емкостях, имеют некоторые преимущества, связанные с массой и безопасностью образца. Наиболее используемые методы сжигания, выполняемые в закрытых сосудах, включают сжигание с использованием колбы Шенигера [138], бомб сгорания [138] и систем микроволнового сгорания [118, 123, 139, 140, 141]. Несмотря на широкое использование колбы Шенигера и бомб для сжигания органических образцов, эти системы не применялись для разложения ФС и ЛП с последующим спектральным анализом в отличие от микроволнового горения [138].

В результате, в настоящее время микроволновые системы находят широкое применение для разложения органических соединений. Большинство спектрометров рассчитаны на работу с растворами, поэтому требуется провести пробоподготовку. Использование закрытых автоклавов дает возможность уберечь оператора от вдыхания едких паров кислот, требующихся для разложения органической матрицы. Такая обработка образца позволяет избежать потерь летучих компонентов и перекрестного загрязнения проб. Для разложения органических соединений применяют смесь конц. HNO_3 и H_2O_2 .

К недостаткам можно отнести ограничение в навесках ФС или ЛП. Методами ЛА-ИСП-АЭС и ЛА-ИСП-МС возможен анализ порошков препаратов, характеризующийся отсутствием пробоподготовки, но многими исследователями отмечается влияние матричных помех на результаты определения.

1.3.6 Чистая химия при установлении содержания элементных примесей

Использование ИСП-МС, ИСП-АЭС и МП-АЭС для определения элементных примесей накладывает требования чистоты на процедуры отбора проб, хранения, пробоподготовки и измерения. Примеси находятся повсюду в окружающей среде и необходимо постоянно контролировать их содержание. Например, в полупроводниковой промышленности, где требуется определение на уровне следовых содержаний, желательно устанавливать высокоэффективные воздушные фильтры в комнатах для пробоподготовки и измерения. В фармацевтической же индустрии вопрос чистоты химии остается открытым и должно быть проведено дополнительное исследование.

Основными источниками элементных примесей при анализе являются реактивы, окружающая атмосфера, лабораторное оборудование и даже сам аналитик. При определении примесей, как правило, используют различные кислоты для очистки лабораторного оборудования и посуды, микроволнового разложения в качестве разлагающей смеси, приготовления стандартных растворов и переноса испытуемой пробы, поэтому степень чистоты применяемых кислот играет важную роль. Кислота либо проходит дополнительный этап очистки – перегонку, либо лаборатория закупает ультрачистые реактивы. Для достижения более низких ПО, кроме перегнанных кислот, применяют деионизованную воду. Требования, предъявляемые к воде, заключаются в низком удельном сопротивлении, не менее 18 МОм при комнатной температуре, и содержании общего органического углерода не более 10 ppb.

Следующий источник – это воздух рабочей зоны. Для доказательства того, что проба может быть загрязнена из окружающей атмосферы, авторы [142] оставляли чистый сосуд, заполненный 10%-ной HNO_3 , в течение пяти суток в атмосфере рабочей зоны. Далее проба была проанализирована на содержание элементных примесей, в результате, содержания Pb и Ig в 5 и 8 раз, соответственно, были выше по сравнению с холостой пробой. Решением данной проблемы является хорошая вентиляция и установка высокоэффективных фильтров. Если препарат находится в виде таблетки, появляются новые источники загрязнения – пестик и ступка, либо мельница с охлаждением. Занесение примесей таким способом не является значительным и вносит минимальный вклад в общую сумму загрязнителей. Аналогичным источником с минимальным влиянием является пластиковая посуда

из полиэтилена, полиметилпентена и полипропилена, которая часто используется в элементном анализе. Иногда для снижения ПО такую посуду ополаскивают 10%-ной HNO_3 или деионизованной водой. Значительный вклад в содержание загрязнителей вносит посуда для микроволнового разложения. Материал, из которого изготавливают закрытые автоклавы, может быть тефлоном, кварцем или боросиликатным стеклом. Тефлоновая посуда хорошо сорбирует Ni, Cu и Pb, а боросиликатное стекло – As, Cu и Pb. Очищать автоклавы рекомендуется 10%-ным раствором HNO_3 при стоянии в течение ночи [142].

Таким образом, для соблюдения «чистой химии» при определении элементных примесей необходимо выполнение ряда требований: вентиляция воздуха рабочей зоны, отсутствие металлических деталей оборудования, высокая чистота реактивов, минимальный контакт проб с воздухом и чистая посуда.

1.4 Роль высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии в изучении фармакокинетики и метаболизма лекарственных препаратов

Разработка ЛП – длительный и дорогостоящий процесс, с момента синтеза до ГЛФ проходят десятки лет. С ростом библиотек новых ЛП возникает необходимость в быстром точном, чувствительном аналитическом методе, доступном для крупномасштабного и высоко воспроизводимого анализа.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (**ВЭЖХ-МС/МС**) применяется на всех этапах разработки ЛП, начиная с идентификации белков-мишеней и массового скрининга, далее проверка *in vitro* селективности, токсичности и биологической активности соединения, затем *in vitro* и ускоренные *in vivo* исследования фармакокинетики (**ФК**). На следующем этапе выполняют более детальное изучение токсикологии и ФК оптимизированной формы ЛП на разных видах животных. В последние годы, *in silico* (компьютерное моделирование) и экспериментальное моделирование фармакокинетики/фармакодинамики (**ФД**) становится актуальным среди исследователей. Объединение ФК и ФД данных дает ключевое понимание режима дозирования и терапевтического эффекта потенциального ЛП.

Многочисленные достижения в скорости, чувствительности, точности, дополненные достижениями в автоматизации МС, позволяют разносторонне использовать данный метод в биоанализе.

Электроспрей или ионизация распылением в электрическом поле (**ЭСИ**) [143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152], химическая ионизация (**ХИ**) [151, 152, 153, 154, 155, 156] и фотоионизация (**ФИ**) [151] при атмосферном давлении являются доступными методами ионизации, как для идентификации, так и для определения небольших молекул фармацевтических продуктов.

Главным преимуществом ЭСИ является прямое получение ионов в газовой фазе из раствора. Метод ЭСИ позволяет анализировать низкомолекулярные соединения, дает возможность «мягкой» ионизации и отличается воспроизводимостью и высокой чувствительностью. К аналогам ЭСИ можно отнести метод ХИ, который также позволяет осуществить незначительную фрагментацию аналита. Спектр, полученный методом ХИ, является простым в интерпретации, в отличие от традиционного метода ионизации электронным ударом (**ЭИ**), масс-спектр которого малоинформативен. Методы ХИ и ЭСИ можно отнести к методам «мягкой» ионизации, в то время как, ЭИ оказывает высокоэнергетическое воздействие на образец. Летучие и термически стабильные

соединения детектируются с применением ХИ. В количественном анализе ХИ отличается более широким динамическим диапазоном концентраций, в сравнении с ЭСИ, простотой в обслуживании и небольшими значениями матричных эффектов. ХИ становится важным способом ионизации, потому что она генерирует ионы непосредственно из раствора и способна к анализу относительно неполярных соединений [157].

ФИ при атмосферном давлении вводится как дополнительный способ ионизации к уже зарекомендовавшим себя методам ХИ и ЭСИ. МС детекторы с ФИ являются коммерчески доступными, на рынке они представлены корпорациями Agilent Technologies, Applied Biosystems (Sciex), Waters (Micromass) и Thermo Electron (Finnigan). Ионы аналитов при ФИ генерируются прямо из раствора. Основным отличием ХИ от ФИ является прохождение парообразного образца через ультрафиолетовое облучение (как правило, это криптоновая лампа, 10 эВ). В связи с этим, ФИ становится более чувствительным способом ионизации, из-за низкого соотношения сигнал/шум. Низкое значение шума обусловлено тем, что растворители (метанол, вода) не ионизируются криптоновой лампой [157].

Виды масс-анализаторов, используемых ВЭЖХ-МС при определении ЛП: квадрупольный, ионная ловушка, времяпролетный, tandemная масс-спектрометрия (МСⁿ). В современном биоанализе для определения ЛС в биологических жидкостях самым распространенным анализатором является МСⁿ. Объясняется это тем, что tandemная масс-спектрометрия имеет высокую селективность и низкие ПО.

Пробоподготовка является одним из самых важных этапов при разработке аналитической методики определения ЛП в различных биологических средах и может влиять на специфичность, чувствительность, прецизионность и правильность аналитической процедуры. Далее в обзоре приведен ряд примеров использования ВЭЖХ-МС/МС метода для определения ЛП в плазме крови/цельной крови животных с использованием различных способов пробоподготовки. Разработка аналитической методики и условий пробоподготовки является неотъемлемым шагом на пути к получению ФК данных.

1.4.1 Определение лекарственных препаратов в плазме крови/цельной крови животных

Плазма крови – это надосадочная жидкость после центрифугирования цельной крови с добавлением антикоагулянтов (ЭДТА, цитрата натрия или гепарина). Цельная кровь – биологическая жидкость более сложного состава, в сравнении с плазмой или сывороткой крови. В качестве пробоподготовки при определении ЛС в плазме крови/цельной крови

животных в литературе предлагаются жидко-жидкостная и твердофазная экстракция (ТФЭ), сочетание этих подходов и наиболее применяемый метод осаждения белков ацетонитрилом. Далее приведены некоторые примеры условий пробоподготовки и анализа при определении ЛП в плазме крови/цельной крови животных.

Канаглифлозин является первым ингибитором натрий-глюкозного ко-транспортера-2, рекомендованный Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (англ. **Food and Drug Administration, US FDA**, 2013 год) и Европейским агентством лекарственных средств (ЕАЛС, англ. **European Medicines Agency, EMA**, 2013 год), для лечения диабета второго типа у взрослых пациентов. Для проведения ФК исследований требуется разработка чувствительной и надежной аналитической методики определения канаглифлозина в крысиной плазме крови. Подробности условий пробоподготовки и анализа суммированы в таблице 13. Проведена полная валидация разработанной методики, которая была успешно применена для ФК исследований [158].

Афатиниб, также известен как В1ВW2992, является селективным и необратимым ингибитором рецептора эпидермального фактора роста и рецептора-2 эпидермального фактора роста человека и используется для лечения немелкоклеточного рака легкого. Афатиниб рекомендован US FDA в качестве первостепенной терапии в 2013 году [159]. В литературе сообщаются методики определения афатиниба в различных биологических жидкостях. В работе [160] разработана методика определения препарата в крысиной плазме методом ВЭЖХ-МС/МС. Обработка образцов проводится методом жидко-жидкостной экстракции с применением эффекта высаливания. Для анализа требуется всего 10 мкл плазмы. Методика валидирована в диапазоне концентраций от 0.5 до 500 нг/мл. Анализ успешно применен для ФК исследований на крысах (Табл. 13).

Т а б л и ц а 13

Определение лекарственных препаратов в плазме крови крыс методом ВЭЖХ-МС/МС

ЛП/[]	Биологическая среда	Пробоподготовка	Хроматографические условия	Условия МС детектирования
Канаглифлозин [158]	Плазма крови крысы	Осаждение белков АСN	Колонка: Acquity ВЕН С18 (100×2.1мм, d=1.7мкм) Система растворителей: АСN : вода (80:20, v/v); Скорость ПФ: 0.3 мл/мин; Изократика	ЭСИ, режим отрицательных ионов MRM переходы: ЛП: m/z 443.16→364.96 ВС: m/z 574.11→462.07

ЛП/[]	Биологическая среда	Пробоподготовка	Хроматографические условия	Условия МС детектирования
Афатиниб [160]	Плазма крови крысы	Жидко-жидкостная экстракция	Колонка: Aquity UPLC® BEH C18 (30×2.1мм, d=1.7 мкм) с предколонкой Aquity UPLC® BEH C18 VanGuard (5×2.1мм, d=1.7) Система растворителей: 0.1% NH ₄ OH (в) (А) : ACN (В); Скорость ПФ: 0.6 мл/мин; Градиент: (В): 35 → 50%, 1 мин (В): 100%, 0.25 мин (В): 35%, 0.75 мин	ЭСИ, режим положительных ионов SRM-переходы: ЛП: m/z486.1→305.1;343.1;371.1 BC: m/z492.1→377.1

Такролимус (ТАС) является иммунодепрессантом, широко используемым при трансплантации органов, но его чрезвычайно низкая растворимость в воде, вызывает плохую кишечную всасываемость. Предприняты попытки разработать альтернативную композицию ТАС с улучшенной скоростью растворения и пероральной биодоступностью. В связи с этим, возникает необходимость в быстрой и чувствительной аналитической методике для ФК исследований *in vivo*. Для определения такролимуса методом ВЭЖХ-МС/МС в цельной крови крыс и человека разработана простая, чувствительная и высоко воспроизводимая методика (Табл. 14). Метод был апробирован в динамическом диапазоне концентраций 0.200–200 нг/мл и имеет время хроматографирования 1.2 мин. Степень извлечения ТАС составляет > 96% на трех уровнях контроля качества. Метод применен для доклинических исследований на 25 крысах и для исследования биоэквивалентности на 20 здоровых людях. Воспроизводимость анализа успешно продемонстрирована повторным анализом 80 образцов [161]. В работе [162] описывается новая методика определения ТАС в цельной крови крыс методом ВЭЖХ-МС/МС в сочетании с жидко-жидкостной экстракцией под воздействием ультразвука при умеренной температуре. Для быстрого и эффективного отделения ТАС от других гидрофобных соединений применяется колонка С8 с элюированием в изократическом режиме (Табл. 14). Следовательно, настоящая методика может способствовать быстрой оценке *in vivo* новых составов ТАС и разработке ТАС с более высокой биодоступностью.

В исследовании [163] описывается быстрая, селективная и чувствительная ВЭЖХ-МС/МС методика для определения противовирусного средства, на основе камфоры, в цельной крови крыс. Камфецин и внутренний стандарт (BC) экстрагируются методом экстракции сухих пятен крови (англ. **Dried Blood Spots, DBS**), который включает нанесение на бумагу 20 мкл цельной крови, высушивание и извлечение аналита с

последующей отгонкой растворителя и анализом остатка. Несмотря на низкое извлечение аналита (менее 2%), чувствительности метода достаточно для определения в диапазоне концентраций от 50 до 2500 нг/мл. Методика валидирована и успешно применена для ФК исследований. Подробности условий хроматографирования и детектирования приведены в таблице 14.

Каннабидиол (**КБД**) один из 142 фитоканнабиноидов. КБД не обладает психоактивными свойствами в отличие от Δ^9 -тетрагидроканнабинола (**ТГК**). Поэтому использование КБД в медицине всегда оставалось спорным вопросом, требующим дополнительного изучения. В последние годы, некоторые фармакологические свойства КБД были открыты и доисследованы, например, анальгетическая, противовоспалительная, антиоксидантная, противорвотная, успокоительная, антипсихотическая, противосудорожная и цитотоксическая активности [164, 165]. Из литературных источников известно, что КБД способен превращаться в ТГК под действием желудочного сока [166]. В связи с этим, усиливается интерес исследователей к соединениям данного класса. В статье [167] сообщается о разработке и валидации высокочувствительной и селективной методики ВЭЖХ-МС/МС для одновременного определения КБД, Δ^9 -ТГК и его метаболитов в цельной крови крыс после перорального введения препарата. Условия пробоподготовки, хроматографирования и детектирования представлены в таблице 14. Ни ТГК, ни его метаболиты не были обнаружены в образцах цельной крови крыс.

Гипертония считается одной из основных проблем общественного здравоохранения и наиболее распространенным фактором риска инфаркта миокарда, сердечной и почечной недостаточности [168]. В работе [169] описывается методика для получения ФК профилей и распределения в тканях внутривенного антигипертензивного средства – клевидипина и его основного метаболита Н152/81 (Табл. 14). При разработке методики следует учитывать то, что клевидипин может быть легко гидролизован до неактивного метаболита Н152/81 в присутствии эстеразы, входящей в состав крови. Продолжительность сбора образцов должна быть как можно короче, чтобы избежать недооценки клевидипина и переоценки метаболита Н152/81 *in vitro*. Экспериментальные данные показывают, что клевидипин относительно быстро выводится из крови с периодом полувыведения около 4.3 мин и распределяется во всех исследованных тканях. Самая высокая концентрация препарата обнаружена в сердце, тогда как самая низкая – в печени. Кроме того, клевидипин практически не обнаруживается в большинстве тканей, за исключением сердца и головного мозга, через 90 минут после дозирования, что свидетельствует об отсутствии явного долгосрочного накопления в тканях крыс. Для Н152/81 пиковая концентрация 3714 ± 319 нг/мл наступает через 0.129 ± 0.048 ч, период полураспада

составляет 10.08 ± 1.45 ч. N152/81 обнаружен в легких, почках, сердце, печени, селезенке и мозге в каждый момент времени. ПКО каждого анализа как в ФК исследованиях, так и в исследованиях распределения анализов в тканях был наименьшим из зарегистрированных до настоящего времени.

Т а б л и ц а 14

Определение лекарственных препаратов в цельной крови крыс методом ВЭЖХ-МС/МС

ЛП/[]	Биологическая среда	Пробоподготовка	Хроматографические условия	Условия МС детектирования
Такролимус [161]	Цельная кровь крысы и человека	Осаждение белков и твердофазная экстракция	Колонка: Waters Acquity UPLC BEH C18(50×2.1мм, d=1.7 мкм); Система растворителей: 10 мМ CH ₃ COONH ₄ (pH=6.0) : CH ₃ OH (5:95, v/v); изократика; Скорость ПФ: 0.35 мл/мин	ЭСИ, режим положительных ионов MRM-переходы: ЛП: m/z 821.3→768.3 BC: m/z 931.5→864.6
Такролимус [162]	Цельная кровь крысы	Жидко-жидкостная экстракция	Колонка: Phenomenex Luna C8 column (150×2.0мм, 5 мкм); Система растворителей: 2 мМ CH ₃ COONH ₄ в 95%-ном водном растворе ACN : 0.1%-ная HCOOH; изократика Скорость ПФ: 0.25 мл/мин	ЭСИ, режим положительных ионов MRM-переходы: ЛП: m/z 821.1→768.0 BC: m/z 809.1→756.1
Камфецин [163]	Цельная кровь крысы	Метод сухих пятен крови	Колонка: Eksigent C18 (50×0.5мм, d= 3.0 мкм); Система растворителей: 0.1%-ный водный (А) : 0.1%-ный метанольный (В) растворы HCOOH; Скорость ПФ: 20 мкл/мин; градиент: (В): 0%, 0 мин (В): 100%, 0.7 мин (В): 100%, 1.7 мин	ЭСИ, режим положительных ионов MRM-переходы: ЛП: m/z 196.4→122.2/153.3 BC: m/z 152.2→93.1/107.2
Каннабидиол [167]	Цельная кровь крысы <i>in vivo</i>	Твердофазная экстракция	Колонка: Kinetex EVO C18 column (100×2.1мм, d=5 мкм); Система растворителей: 2 мМ водный раствор CH ₃ COONH ₄ (А) : ACN (В); Скорость ПФ: 0.35 мл/мин Градиент: (В): 30 → 90%, 0-10 мин (В) 90%, 10-15 мин (В): 90 → 30%, 15-18 мин	ЭСИ, в режиме положительных/отрицательных ионов MRM-переходы: ЛП: m/z 315.3→193.2 BC: m/z 332.1→270.0
Клевадипин [169]	Цельная кровь крысы <i>in vivo</i>	Осаждение белков ACN	Колонка: Heder ODS-2 (150×2.1мм, d=5 мкм); Система растворителей: 5 мМ водный CH ₃ COONH ₄ , содержащий 0.1%-ную HCOOH (А) : CH ₃ OH (В); Скорость ПФ: 0.5 мл/мин; Градиент: (А): 35%, 0-3 мин (А): 35-20%, 3-3.1 мин (А): 20%, 3.1-8.3 мин (А): 20-0%, 8.3-8.4 мин (А): 0%, 8.4-9.9 мин (А): 0-35%, 9.9-10 мин (А): 35%, 10-12 мин	ЭСИ, в режиме положительных ионов MRM-переходы: ЛП: m/z 473.2→338.0 BC: m/z 322.0→212.0

В данном разделе рассмотрены методики определения ЛС различного действия в биологических средах методом ВЭЖХ и тандемной масс-спектрометрии. Следует, в первую очередь, отметить высокую точность анализа небольших молекул, селективность, чувствительность и производительность метода ВЭЖХ-МС/МС. Обзор литературных источников показал важность выбора условий пробоподготовки. Все методы обработки образца можно разделить на осаждение белков, жидко-жидкостную и твердофазную экстракцию. Биологические матрицы представляют собой смесь белков, солей и липидов, которые могут взаимодействовать с аналитами и адсорбироваться на колонке, сокращая срок ее эксплуатации. Первый подход – осаждение белков относится к простым, быстрым и недорогим методам удаления белков из биологических сред. Самыми распространенными растворителями являются ацетонитрил [158], метанол [170] и их смесь [171]. Соосаждение некоторых аналитов с белками – один из главных недостатков данного метода, который отмечают несколько авторов. Жидко-жидкостная экстракция также отличается простотой и селективностью. В рассмотренных работах в качестве экстрагента применяются МТБЭ [162, 172, 173, 174] и ацетонитрил [160]. К основному недостатку данного метода можно отнести большое количество манипуляций с образцом. Для ТФЭ характерна более высокая селективность и количественное концентрирование, в сравнении с жидко-жидкостной экстракцией. Но при этом данный метод отличается трудоемкостью и относительной дороговизной [161, 167, 175]. Среди методов ионизации и видов масс-анализаторов лидирующие позиции занимают электроспрей ионизация в сочетании с тандемной масс-спектрометрией.

1.5 Валидация аналитических методик контроля качества лекарственных средств

Валидация становится неотъемлемой частью разработки аналитических методик (АМ). Под валидацией понимают экспериментальное доказательство того, что при использовании методики можно получить достоверные результаты. При валидации проводится оценка АМ по следующим характеристикам, выбираемым с учетом типовых рекомендаций (Табл. 15): специфичность, ПО, ПКО, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность, стабильность анализируемых растворов, надежность методики [3].

Т а б л и ц а 15

Характеристики, определяемые при валидации методик [3]

Наименование характеристики	Основные типы методик				
	Испытание на подлинность	Посторонние примеси		Количественное определение	
		Количественные методики	Предел содержания	Основного действующего вещества, нормируемых компонентов	Действующего вещества в тесте «растворение»
Специфичность **	Да	Да	Да	Да	Да
Предел обнаружения	Нет	Нет	Да	Нет	Нет
Предел количественного определения	Нет	Да	Нет	Нет	Нет
Аналитическая область	Нет	Да	Нет	Да	Да
Линейность	Нет	Да	Нет	Да	Да
Правильность	Нет	Да	*	Да	Да
Устойчивость	Нет	*	*	*	*
Прецизионность					
– Повторяемость (сходимость)	Нет	Да	Нет	Да	Да
– Промежуточная прецизионность	Нет	Да	Нет	Да	Нет

Примечание: * может определяться при необходимости; ** отсутствие специфичности одной АМ может быть компенсировано использованием другой АМ

1.5.1 Валидация спектрометрических методик

В последнее время производителями лабораторного оборудования и научными исследователями был опубликован ряд ИСП-МС и ИСП-АЭС методик [121, 176, 177, 178], которые были валидированы в соответствии с рекомендациями недавно вышедшей статьи <233> фармакопеи США [179].

При определении элементных примесей важным понятием является «допустимое суточное воздействие» (ДСВ) токсичных элементов на человека весом 50 кг, которые согласуются с нормами Международной конференции по гармонизации (Табл. 6) [91]. Не стоит забывать, что ДСВ должен быть скорректирован в соответствии с коэффициентом разбавления пробы на этапе пробоподготовки. Например, для определения Pb с коэффициентом разбавления 250 (образец 0.40 г, окончательный объем разбавления равен 100 мл), J (ДСВ с учетом разбавления) будет равен 10 нг/мл или 10 ppb. Точное извлечение необходимо продемонстрировать на уровне $0.5 \times J$ (5 ppb), а ПО должен быть, по крайней мере, в 10 раз меньше этого значения (0.5 ppb).

Методики определения должны быть специфичными, правильными и воспроизводимыми. Это можно проверить, определив валидационные показатели. Оценка правильности проводится тремя способами: анализ стандартных образцов, сравнение с результатами другого метода, правильность которого доказана, и способ «введено-найденно». Результаты считаются правильными, если удалось выявить систематическую погрешность. Остановимся подробнее на методе «введено-найденно» или методе добавок (второе название). Растворы необходимые для оценки правильности методом добавок: стандартные растворы в диапазоне концентраций от $0.5 \times J$ до $1.5 \times J$, испытуемые растворы без добавок и с добавками всех определяемых аналитов в интервале концентраций от $0.5 \times J$ до $1.5 \times J$, прошедшие этапы анализа от отбора пробы до измерения аналитического сигнала. По разности аналитических сигналов находят количество введенной добавки. Если известное количество введенной добавки попадает в доверительный интервал, методику можно считать правильной. Критерием приемлемости, согласно фармакопее США [179], является величина извлечения пиков аналитов в интервале от 70 до 150% для среднего значения трех повторов в диапазоне концентраций от 50 до 150%.

Оценку прецизионности проводят на уровнях повторяемости и внутрилабораторной прецизионности. Для определения повторяемости выполняют анализ шести независимых проб испытуемого раствора с добавками аналитов в пределах концентрации $1 \times J$. RSD должно быть меньше или равно 20%. Тест на внутрилабораторную прецизионность

проводится либо другим аналитиком, либо на другом оборудовании, либо в другой день. Далее анализируется возможность объединения результатов с результатами, полученными при оценке повторяемости. Если различие между выборками не значимо, то RSD рассчитывается для 12 определений. Критерий приемлемости: RSD должно быть меньше или равно 25% (n=12).

Специфичность оценивается для каждого целевого элемента в присутствии компонентов, которые могут мешать определению. Для этого выбирают длину волны аналита так, чтобы интенсивность сигнала была максимальной, а вклад интенсивностей от посторонних элементов был минимальным.

ПО аналита рассчитывается с использованием 3σ критерия для n=10 измерений бидистиллированной воды или холостой пробы, которая проходит все стадии анализа. ПКО в 3.3 раза превышает ПО. Аналитическая область включает диапазон концентраций от $0.5 \times J$ до $1.5 \times J$ для ИСП-МС и ИСП-АЭС методик [179]. Согласно фармакопее РФ [3], методики испытаний на чистоту должны быть применимы в интервале концентраций от ПКО до 120% от допустимого содержания определяемой примеси. В большинстве случаев применяют линейные зависимости, отвечающие условию коэффициент корреляции ≥ 0.99 . Для альтернативных ИСП-МС и ИСП-АЭС методик в фармакопее США нет необходимости оценивать ПКО, аналитическую область и линейность так, как требования к точности после оценки прецизионности уже выполнены.

Таким образом, в фармакопее РФ перечислены валидационные характеристики методик и даны критерии приемлемости при количественном определении и испытаниях на чистоту. ФСША описывает анализ элементных примесей методами ИСП-АЭС и ИСП-МС и дает рекомендации и критерии приемлемости для валидационных показателей альтернативных методик определения отдельно элементных примесей.

1.5.2 Валидация хроматографических методик

К основным типам ВЭЖХ методик относятся идентификация, определение действующего вещества и примесей. В зависимости от типа испытания выбираются условия и критерии приемлемости при валидации. До начала испытаний требуется определить валидационные характеристики и ввести критерии приемлемости. При идентификации необходимо доказать специфичность методики, привести относительные времена выхода и коэффициенты разделения пиков.

При определении количественного содержания действующего вещества, чтобы доказать линейность, необходимо отсутствие отклонения от линейного отклика, доверительный интервал сводного члена в уравнении градуировочной кривой должен

содержать ноль и коэффициент корреляции должен быть ≥ 0.999 . Зависимость строится в интервале концентраций от 40 до 130% от заявленного содержания. Выполнение теста по Манделю, применение квадратичной регрессии не должно приводить к значительному улучшению результатов. Для методик определения примесей методом ВЭЖХ необходимо соблюдение аналогичных требований. Исключением является коэффициент корреляции, который не должен быть ≥ 0.99 .

Правильность методик определения количественного содержания и примесей устанавливается по трем добавкам в трех концентрационных диапазонах (80, 100, 120%), значения степеней извлечения должны лежать в интервале $100 \pm 2\%$ и $100 \pm 10\%$, соответственно.

Прецизионность оценивается на уровнях прецизионности системы, сходимости и внутрилабораторной прецизионности. Прецизионность системы определяется при повторном введении одной и той же пробы семь раз в хроматографическую систему. Считают RSD, которое не должно превышать 1.0%. Сходимость оценивается при введении семи образцов, для каждой пробы выполняют семь параллельных определений. Рассчитывают RSD, которое не должно превышать 2.0%. В тестах на внутрилабораторную прецизионность рассматривается вариабельность в зависимости от времени, исполнителя или оборудования, RSD не должно превышать 3.0% [180].

Согласно фармакопее РФ [3] при определении содержания действующего вещества не требуется оценивать ПО и ПКО, в отличие от методик определения примесей, где необходимо установить ПКО. Устойчивость оценивается при необходимости. Аналитическая область выбирается аналогично спектрометрическим методикам, от ПКО до 120% от допустимого содержания примеси. Для методик определения содержания действующего вещества от 80 до 120% от номинального значения определяемой аналитической характеристики.

Таким образом, в зависимости от типа хроматографической методики выбираются характеристики и критерии приемлемости для валидации.

Переходя к экспериментальной части работы напомним, что для дальнейшего внедрения исследуемого ФАВ необходимо всестороннее изучение физико-химических свойств, учитывая рекомендации фармакопеи.

ГЛАВА 2. Экспериментальная часть

Исследование физико-химических свойств, разработка и валидация аналитических методик контроля

(2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола

Соединение (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ол сочетает высокую анальгетическую активность, низкую острую токсичность и пролонгированное действие, что делает перспективной его дальнейшую разработку.

В связи с этим, актуальными задачами являются всестороннее изучение физико-химических свойств, которое включает описание внешнего вида соединения, получение данных о растворимости в растворителях разной полярности, установление спектральных и термических характеристик, доказательство состава и строения ФАВ. Далее разработка и валидация АМ контроля чистоты нового соединения для определения содержаний технологических и элементных примесей, а также ООР. Следующий этап включает разработку и валидацию АМ определения вещества в биологических жидкостях с целью дальнейшего получения фармакокинетических данных.

2.1 Изучение физико-химических свойств физиологически активного вещества (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола

2.1.1 Описание (внешний вид, цвет, запах)

При проведении описания ФАВ указывают характеристики физического состояния, цвет, если необходимо, приводят информацию о запахе и гигроскопичности [41].

Фракционный состав определяли в соответствии с ОФС.1.1.0015.15 [41]. Ситовой анализ осуществляли просеиванием проб образца через набор стандартных сит, размер отверстий которых уменьшали с 0.4 (US номер сита – 45) до 0.2 (US номер сита – 80) мм, в результате чего материал делился на фракции.

Предварительно выбирали оптимальную массу пробы и время просеивания. Точную навеску испытуемого вещества **1** (~1.0 г) помещали на сито с размером отверстий 0.4 мм. Проводили просеивание в течение 5 мин, затем снова взвешивали сито и определяли массу вещества **1** на сите. 64% частиц порошка были меньше 0.4 мм. По определению ОФС.1.1.0001.15 [41] в крупнокристаллическом порошке не более 40% частиц должно быть размером менее 0.4 мм. Исходя из этого, испытуемый образец нельзя отнести к данному типу твердых порошков. Частицы меньше 0.4 мм далее пропускали через сито размером 0.2 мм в течение 5 мин. Получили 65% частиц порошка меньше 0.2 мм. По ОФС.1.1.0001.15 [41] в кристаллическом порошке не менее 95% частиц порошка

должно быть размером менее 0.4 мм и не более 40% – размером менее 0.2 мм. Таким образом, можно констатировать, что испытуемый образец не попадает ни под одно определение и представляет собой смесь крупнокристаллического и кристаллического порошков.

Цвет твердого вещества **1** определяли на матово-белом фоне (белая плотная бумага) при рассеянном дневном свете. Небольшое количество вещества **1** помещали на белую бумагу и без нажима равномерно распределяли по поверхности бумаги. Образец по цвету отнесли к желтовато-белому порошку.

Запах образца определяли по ОФС.1.1.0001.15 [41]. ~0.50-2.0 г вещества **1** равномерно распределяли на часовом стекле диаметром 6-8 см; через 15 мин определяли запах на расстоянии 4-6 см. Запах отсутствовал.

2.1.2 Растворимость фармацевтического соединения в растворителях разной полярности

В фармакопейном анализе понятие растворимости приводится в качестве характеристики растворимости ФС и вспомогательных веществ при фиксированной температуре.

В ОФС.1.2.1.0005.15 [41] растворимость вещества выражена в следующих терминах, приведенных в таблице 16.

Т а б л и ц а 16

Обозначения растворимости субстанций и вспомогательных веществ согласно фармакопее РФ

Термин	Примерное количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1 г вещества
Очень легко растворим	до 1 включительно
Легко растворим	от 1 до 10 включительно
Растворим	от 10 до 30 включительно
Умеренно растворим	от 30 до 100 включительно
Мало растворим	от 100 до 1000 включительно
Очень мало растворим	от 1000 до 10000 включительно
Практически нерастворим	более 10000

Ввиду того, что мы определяли растворимость нового соединения, исследования проводили в соответствии с требованиями ГФ для субстанций и препаратов с неизвестной растворимостью по следующей методике.

К навеске ФАВ прибавляли растворитель и непрерывно встряхивали в течение 10 мин при $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Соединение **1** считали растворившимся, если в растворе при наблюдении в проходящем свете не обнаруживались частицы вещества. Далее действовали в соответствии со схемой на рисунке 4.

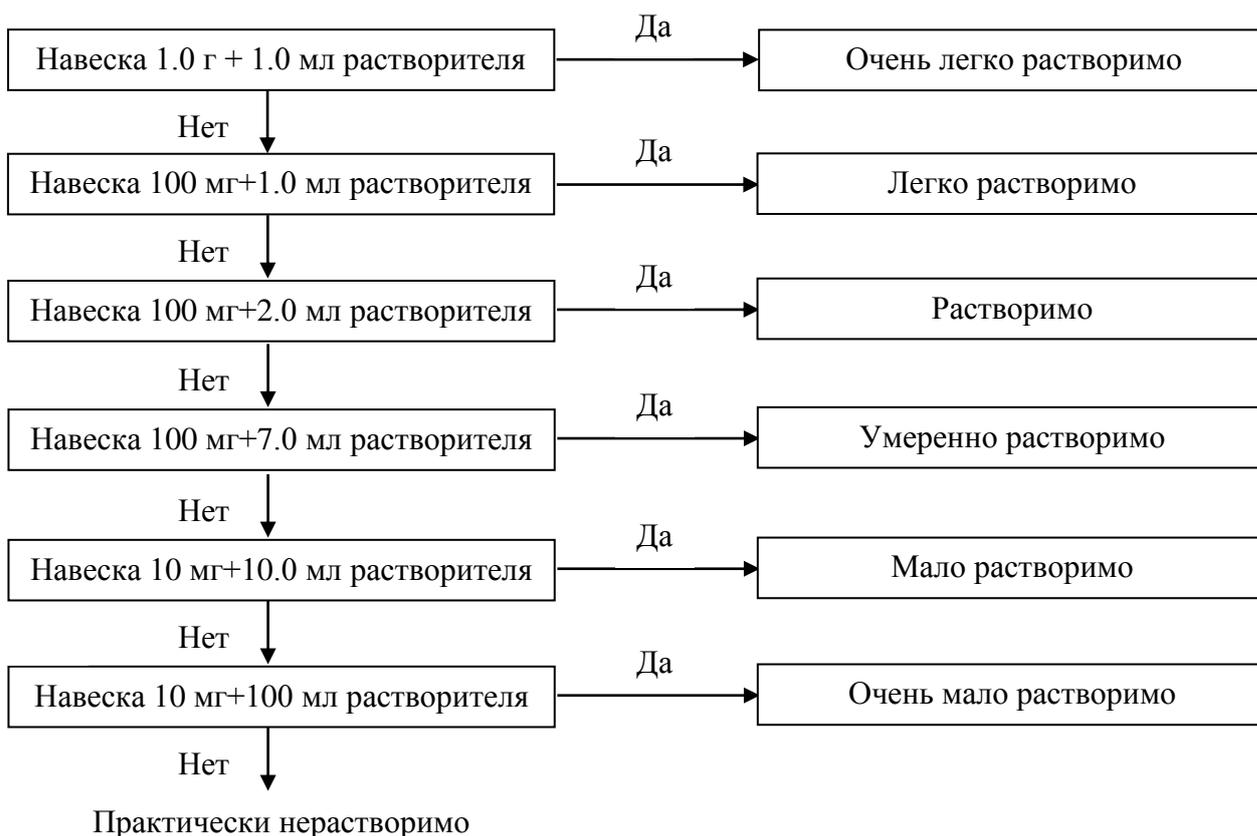


Рис. 4. Схема эксперимента при определении растворимости физиологически активного вещества

Т а б л и ц а 17

Результаты определения растворимости исследуемых образцов соединения 1

Партия	Растворимость					
	в воде	в 95%-ном этаноле	в CHCl_3	в MeOH	в ACN	в ацетоне
321-0	Практически нерастворим	Растворим	Легко растворим			
321-1						
321-2						

2.1.3 Показатели «прозрачность», «цветность» и «рН» раствора соединения 1

Показатели «прозрачность» и «цветность» определяли для 0.20%-ного раствора соединения 1 в метиловом спирте. По показателю «прозрачность» все образцы были прозрачными и не отличались от растворителя в соответствии с ОФС.1.2.1.0007.15 [41]. По показателю «цветность» образцы были бесцветными по сравнению с растворителем или не превышали эталон ВУ₇ в соответствии с ОФС.1.2.1.0006.15 [41].

В УФ-спектре, записанном на спектрофотометре Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США), для метанольного раствора соединения **1** в области от 800 до 200 нм присутствовал один максимум при длине волны 234 нм (Рис. 5). Коэффициент экстинкции $\sim 10^4 \text{ л} \times \text{см}^{-1} \times \text{моль}^{-1}$.

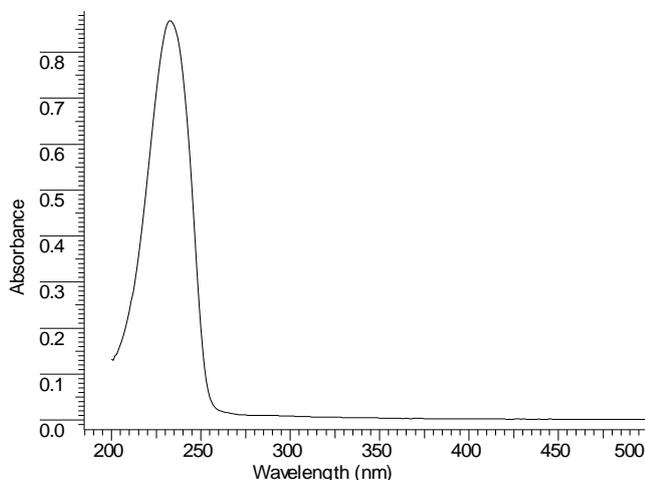


Рис. 5. УФ-спектр физиологически активного вещества в метиловом спирте

Также измеряли показатель «рН» в растворах метилового и этилового спиртов (Табл. 18). Содержание воды в этиловом спирте не превышало 5%, в метиловом спирте – 0.05%. Определение рН проводили при $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Значения рН раствора записывали на иономер-кондуктометре АНИОН-4154 (Инфраспак-Аналит, Россия).

Т а б л и ц а 18

Показатель рН для этанольного и метанольного растворов соединения **1**

№ п/п	Навеска образца, мг	рН водного раствора этанола ($V_{\text{этанол}} = 30 \text{ мл}$, $V_{\text{вода}} = 20 \text{ мл}$)	рН этанольного раствора 1 ($V_{\text{этанол}} = 30 \text{ мл}$, $V_{\text{вода}} = 20 \text{ мл}$)
1	4.5	6.20	6.06
2	103		6.99
3	531		6.70
№ п/п	Навеска образца, мг	рН водного раствора метанола ($V_{\text{метанол}} = 10 \text{ мл}$, $V_{\text{вода}} = 20 \text{ мл}$)	рН метанольного раствора 1 ($V_{\text{метанол}} = 10 \text{ мл}$, $V_{\text{вода}} = 20 \text{ мл}$)
1	3.8	6.00	5.99
2	121		6.36
3	502		6.42

2.1.4 Влага

2.1.4.1 Определение содержания воды по методу К. Фишера

Метод К. Фишера позволяет определить гигроскопическую, кристаллизационную, сорбированную и окклюдированную воду в веществе. В качестве растворителя использовали метанол. Содержание воды в метиловом спирте не превышало 0.05%. Титрование проводили на автоматическом объемнометрическом титраторе TitroLine KF (Германия). Точную навеску ($\sim 10\text{-}11 \text{ г}$) ФАВ растворяли в 15-20 мл метанола и титровали реактивом

К. Фишера. Методика определения не противоречила ОФС.1.2.3.0002.15 [41]. Процентное содержание воды в исследуемых образцах не превышало 0.25%.

2.1.4.2 Потеря в массе при высушивании

Под понятием «потеря в массе при высушивании» подразумевают потерю в массе за счет гигроскопической влаги и летучих веществ, которую определяют в веществе при высушивании до постоянной массы. Методика соответствовала ОФС.1.2.1.0010.15 [41]. Результат выражают в виде массовой доли в процентах.

Потерю в массе при высушивании (X) в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \%, \text{ где}$$

m_1 – масса бюкса, доведенного до постоянной массы, г; m_2 – масса бюкса с испытуемым образцом до высушивания, г; m_3 – масса бюкса с испытуемым образцом после высушивания, г.

Т а б л и ц а 19

Исследование соединения 1 по показателю «потеря в массе при высушивании»

Навеска, г	m_1 , г	m_2 , г	m_3 , г	X, %	Среднее значение X, %
1.0844	16.0553	17.1397	17.1381	0.15	0.14
0.9267	15.5567	16.4834	16.4823	0.12	

Среднее значение показателя «потеря в массе при высушивании» составило 0.14%.

2.1.5 Термические характеристики

Температура плавления была измерена на термосистеме FP900 (Mettler Toledo, Швейцария) со скоростью нагрева 1 и 5°C/мин. Термическое разложение проводили на синхронном термическом анализаторе STA 409 PC Luxx (Netzsch, Германия), который позволяет одновременно регистрировать изменение массы образца и определять характеристические температуры и теплоты реакций.

Значения температуры плавления соединения **1** при скоростях нагрева 1 и 5°C/мин, определенные на термосистеме FP900, составили 141.8 – 142.1 и 141.7°C, соответственно. При термоаналитическом исследовании в токе инертного газа He со скоростью нагрева 10°C/мин температура плавления вещества **1** была равна 143.0°C. Энтальпия плавления составила 123.1 Дж/г (Рис. 6). Температура начала разложения вещества соответствовала температуре 174.5°C на кривой ТГ, а температура конца разложения была равна 263.0°C.

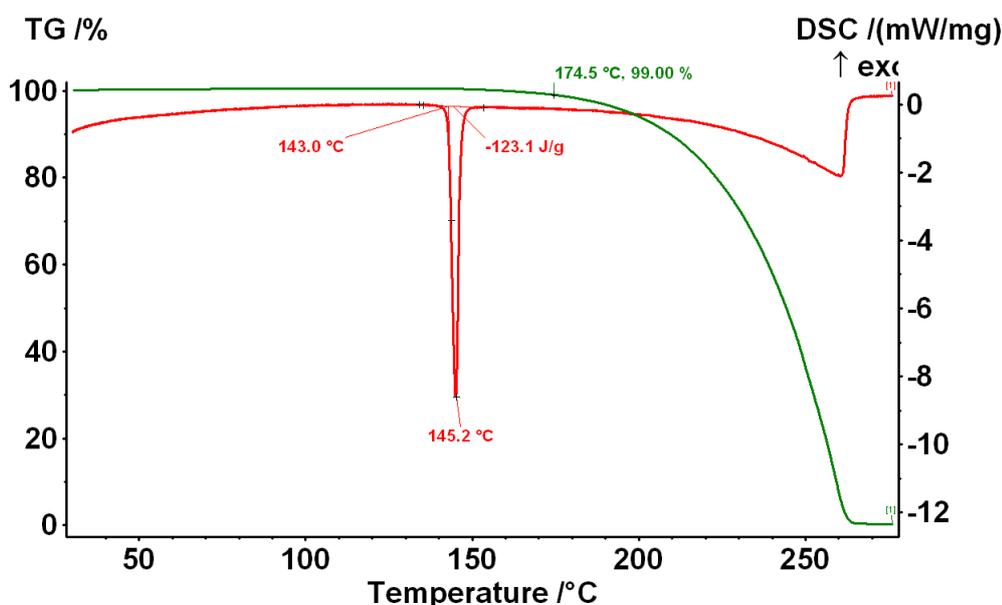


Рис. 6. Термические кривые соединения **1**
(в токе инертного газа *Ne* при скорости нагрева $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$)

2.1.6 Установление состава и строения методами элементного и спектрального анализа

Состав и строение синтезированного соединения (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола доказаны данными элементного анализа, ИК-, ^1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии, РСА.

Элементный анализ выполняли на автоматическом CHNS/O-элементном анализаторе EuroVector EA-3000 (HEKAtech GmbH, Германия). Кроме того, содержание углерода и водорода определяли гравиметрическим методом ускоренного сжигания, а содержание серы титриметрически после сжигания вещества в колбе, наполненной кислородом. При этом найдено содержание, в %: углерода – 67.5, водорода – 8.2, кислорода – 12.0, серы – 11.9. Вычислено содержание, в %: углерода – 67.6, водорода – 8.3, кислорода – 12.0, серы – 12.0.

Определение молекулярной массы проводили на масс-спектрометре высокого разрешения DFS (Thermo Electron, Германия) в режиме полного сканирования (15-500 m/z , 70 эВ, прямое введение образца). Результаты масс-спектрометрического анализа: 266.1332 а. е. м. (M^+ , $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}^+$; вычислено 266.1335 а. е. м.).

ИК-спектры получали на ИК-Фурье спектрометре TENSOR 27 (Bruker Corporation, Германия) в таблетках KBr (1:150, вещество:KBr), 4000-400 cm^{-1} .

Интенсивная полоса поглощения с четко выраженным максимумом при 3496 cm^{-1} на ИК-спектре (Рис. 7) исследуемого соединения обусловлена валентными колебаниями ОН-группы. К другим колебаниям, которые характерны для третичных спиртов, можно отнести деформационные колебания СОН-группы при 1315 cm^{-1} и валентные колебания

СО при 1184 см^{-1} . Можно выделить ряд характеристических полос, соответствующих 2-монозамещенному кольцу тиофена: 1238 см^{-1} – плоскостные деформационные колебания СН, 1120 и 1030 см^{-1} – деформационные колебания связи СН, 914 , 852 и 839 см^{-1} – внеплоскостные деформационные колебания СН, 688 см^{-1} – наиболее интенсивная полоса поглощения, деформационные колебания тиофенового кольца. 1099 см^{-1} антисимметричные валентные колебания СОС-группы, 802 см^{-1} симметричные валентные колебания СОС-группы. Интенсивная полоса поглощения при 2945 см^{-1} характерна для антисимметричных валентных колебаний $-\text{CH}_3$ групп, 2856 см^{-1} – симметричные валентные колебания $-\text{CH}_3$ групп, 1444 см^{-1} – антисимметричные деформационные колебания $-\text{CH}_3$ групп или деформационные колебания $-\text{CH}_2-$ групп в циклических алканах, 1387 см^{-1} – симметричные деформационные колебания $-\text{CH}_3$ групп. Впервые получен и расшифрован ИК-спектр ФАВ, который далее может быть использован для идентификации данного соединения.

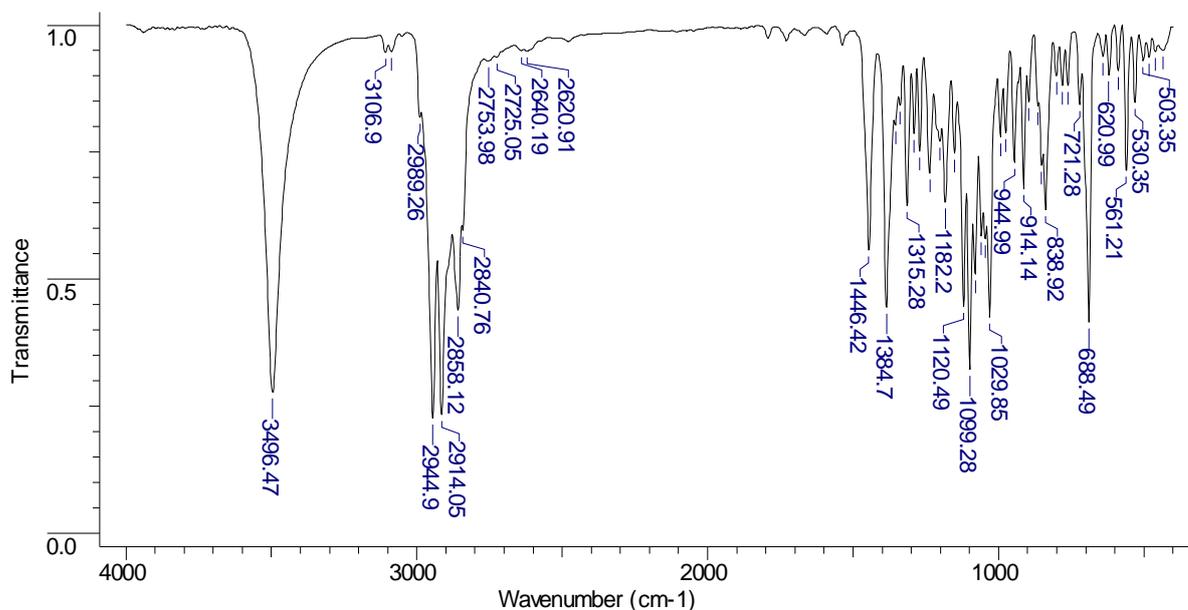
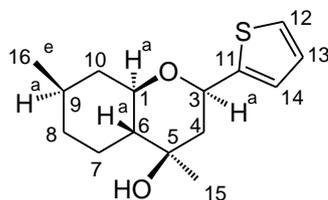


Рис. 7. Инфракрасный спектр физиологически активного вещества

Спектры ^1H и ^{13}C ЯМР были записаны на спектрометре AVANCE III 400 (Bruker Corporation, Германия) в растворе CDCl_3 с использованием стандартных методик. ЯМР-спектры соединения **1** соответствовали спектрам, ранее опубликованным в литературе [2, 181].

В спектрах ЯМР ^1H соединения **1** (Рис. 8), записанных в CDCl_3 (концентрация вещества **1** – 12.5 мг/мл), δ , м. д., наблюдались следующие сигналы: 0.91 (д, $J(16,9) = 6.5$ Гц, 3H , H-16); 0.83 - 0.96 (м, 1H , H_a-8); 1.02 (м, 1H , H_a-7); 1.11 (м, 1H , H_a-10); 1.25 (с, 3H , H-15); 1.37 - 1.52 (м, 1H , H_a-9); 1.65 - 2.09 (He-8, H_a-4, He-7, He-10, He-4); 2.14 (с, 1H , -OH); 3.26 (ддд, $J(1a,10a) = J(1a,6a) = 10.5$ Гц, $J(1a,10e) = 4.0$ Гц, 1H , H_a-1); 4.68 (д, $J(3a,4a) = 11.62$ Гц, 1H , H_a-3); 6.92 (д, $J(13,12) = 4.52$ Гц, 1H , H-13); 6.94 (м, 1H , H-14); 7.20 (д, $J(12,13) = 4.70$

Гц, 1H, H-12). В спектрах ЯМР ^{13}C соединения **1** (Рис. 9), записанных в CDCl_3 (концентрация вещества **1** – 12.5 мг/мл), δ , м. д., наблюдались следующие сигналы: 77.45 (д, C-1); 72.71 (д, C-3); 49.63 (т, C-4); 70.54 (с, C-5); 51.70 (д, C-6); 22.84 (т, C-7); 34.14 (т, C-8); 31.28 (д, C-9); 41.19 (т, C-10); 145.26 (с, C-11); 124.47 (д, C-12); 126.21 (д, C-13); 123.48 (д, C-14); 21.06 (кв, C-15); 22.01 (кв, C-16).



Нумерация атомов ФАВ для ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров

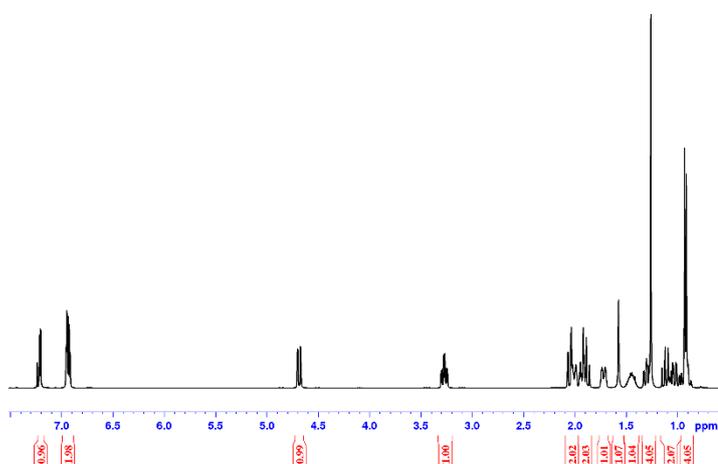


Рис. 8. Спектр ЯМР ^1H соединения **1** в CDCl_3

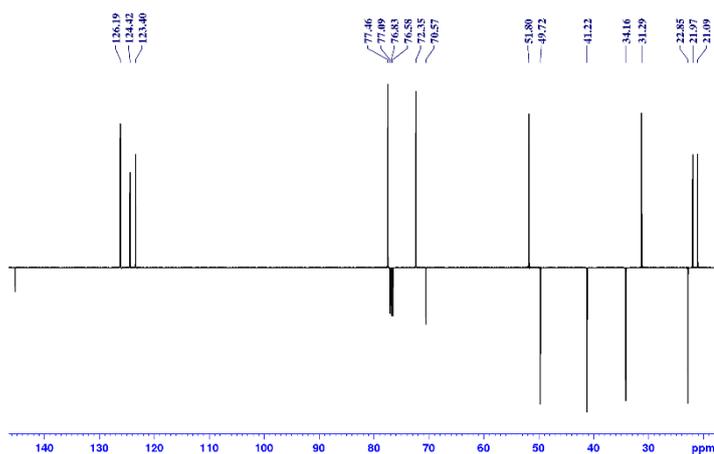


Рис. 9. Спектр ЯМР ^{13}C соединения **1** в CDCl_3

РСА проводили на монокристалльном дифрактометре SAPPА-APЕХ (Bruker AXS, Германия). МоК α -излучение, температура 296(2)К. Кристаллы моноклинные: $a = 9.810(1)$,

$b = 6.7784(8)$, $c = 22.215(3)\text{\AA}$, $\beta = 97.002(6)^\circ$, $V = 1466.3(3)\text{\AA}^3$, пространственная группа $C2$, $Z = 4$, $R = 0.0631$ для $2564 I > 2\sigma(I)$, $\theta_{\max} = 26.4^\circ$ (Рис. 10).

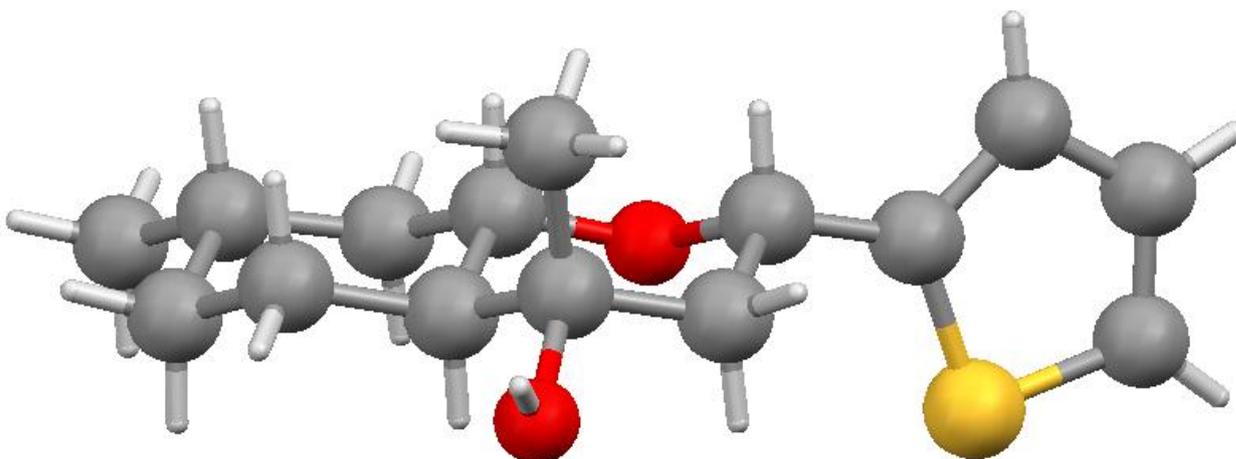


Рис. 10. Пространственное строение
(2*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола

Определение величины угла вращения плоскости поляризации света выполняли на многоволновом поляриметре PolAArg 3005 (Optical Activity, Великобритания). Удельное оптическое вращение в среде толщиной 0.5 дм при концентрации соединения **1** 5.6×10^{-2} и 4.5×10^{-2} г/мл в метаноле и длине волны 589 нм составило:

$$[\alpha]_{589}^{25} = +5.13 \text{ (} c = 0.056 \text{ г/мл, CH}_3\text{OH)}$$

$$[\alpha]_{589}^{25} = +4.73 \text{ (} c = 0.045 \text{ г/мл, CH}_3\text{OH)}$$

Ввиду невысоких значений величин по модулю, не рекомендуем использовать удельное оптическое вращение в качестве критерия для определения чистоты анализируемого соединения **1**.

2.1.7 Качественный анализ

Проведено качественное определение ФАВ, основанное на реакции производных тиофена с 1,2-дикетонами в сернокислой среде (индофениновая реакция). Известно, что окраска, появляющаяся при индофениновой реакции, зависит от заместителей в тиофеновом цикле. При отсутствии заместителей в обоих α -положениях в большинстве случаев появляется темно-синяя окраска. Если остаются незамещенными только одно α -положение и соседнее β -положение, окраска обычно светло-синяя, но часто окраска бывает зеленой или фиолетовой [182]. При смешивании 5.0 мл этилового спирта, содержащего 5.0 мг ФАВ, с 5.0 мл концентрированной серной кислоты, содержащей 50 мг изатина, получили раствор фиолетового цвета, что подтверждает наличие тиофенового кольца с одним заместителем в α -положении. Реакцию проводили при комнатной температуре.

Таким образом, по внешнему виду образцы фармацевтического соединения **1** представляют собой желтовато-белую смесь крупнокристаллического и кристаллического порошков без характерного запаха.

ФАВ по показателю «растворимость», можно отнести к легко растворимым в ацетонитриле, ацетоне, хлороформе и метаноле; растворимым в этиловом спирте; практически нерастворимым в воде (Табл. 17).

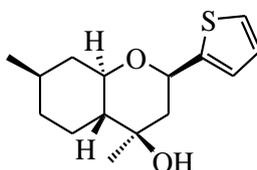
Исследованы показатели «прозрачность» и «цветность» 0.20%-ного раствора соединения **1** в метиловом спирте. По показателю «прозрачность» образец прозрачен по сравнению с растворителем. Цветность раствора оценивали визуально и спектрофотометрическим методом. Раствор по сравнению с растворителем был бесцветным, в УФ-спектре присутствовал максимум поглощения при $\lambda = 234$ нм. Показатель «рН» для растворов соединения **1** в метиловом и этиловом спиртах составил 6.39 и 6.84, соответственно.

Проведено термоаналитическое исследование; температура плавления вещества равна 143°C, энтальпия плавления составила 123.1 Дж/г.

Качественный анализ ФАВ основан на индофениновой реакции.

В результате, проведенные исследования с использованием современных методов анализа подтверждают состав и структурную формулу нового вещества [183].

Структурная формула:



Химическое наименование: (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ол

Эмпирическая формула: C₁₅H₂₂O₂S

Молекулярная масса: 266.1332

2.2 Разработка и валидация аналитических методик контроля чистоты физиологически активного соединения (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола

2.2.1 Аналитический контроль производного (-)-изопулегола по показателям «технологические примеси» и «действующее вещество»

Для контроля безопасности ФАВ необходимо установить содержания действующего вещества и возможных примесей, которые могут присутствовать в результате синтеза и выделения соединения. С этой целью была разработана методика идентификации технологических примесей и определения действующего вещества методом ВЭЖХ–УФ и проведена ее валидация.

К технологическим примесям в соединении **1** можно отнести исходные реагенты, родственные примеси и продукты дегидратации (Рис. 11). Фармацевтическое соединение получают реакцией тиофен-2-карбальдегида и (-)-изопулегола в присутствии монтмориллонитовой глины [2]. Исходные реагенты в целях дополнительной очистки предварительно пропускают через хроматографическую колонку, заполненную силикагелем, в токе ДХМ. Анализ реакционной смеси методом ГХ-МС показал образование двух минорных продуктов, с молекулярной массой равной массе соединения за вычетом молекулы воды, в соотношении 9:1 и продукта с молекулярной массой равной двум молекулам (-)-изопулегола и одной молекуле тиофен-2-карбальдегида. Выделенные из реакционной смеси соединения можно отнести к примесям побочных реакций, образованным в результате реакции дегидратации. Stereoизомер соединения рассматривали в качестве родственной примеси (синтезирован отдельно и охарактеризован методом ЯМР-спектроскопии). Для доказательства того, что соблюдение всех условий синтеза и выделения соединения **1** [2] исключает возможность присутствия примесей, разработана ВЭЖХ–УФ методика на микроколоночном жидкостном хроматографе.

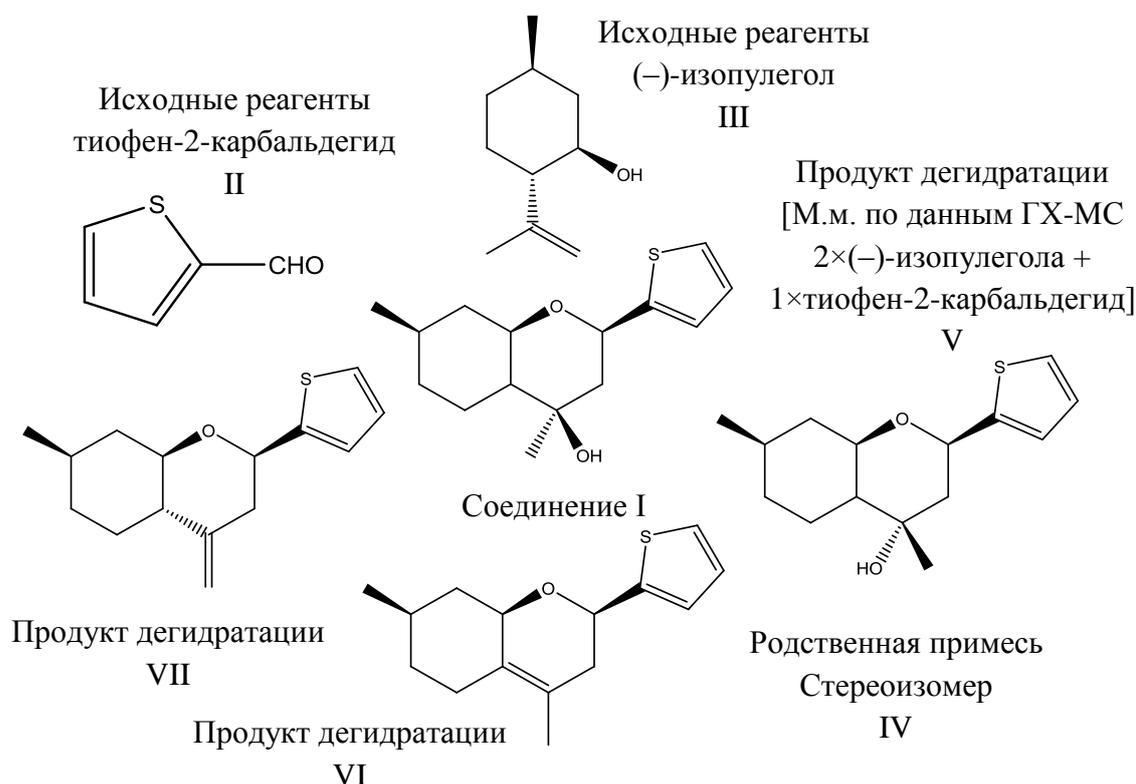


Рис. 11. Физиологически активное соединение и возможные технологические примеси

2.2.2 Разработка методики идентификации технологических примесей и определения содержания действующего вещества

2.2.2.1 Реактивы и оборудование

Для идентификации и построения градуировочного графика использовали стандартный образец предприятия ФАВ (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола с содержанием действующего вещества (99.8%). В качестве возможных примесей для разработки методики их контроля применяли (-)-изопулегол и тиофен-2-карбальдегид фирмы Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США). Реагенты проходили дополнительную очистку методом колоночной хроматографии на силикагеле (SiO₂, 60-200 мкм, Macherey-Nagel) в токе дихлорметана. Продукты дегидратации были выделены из реакционной смеси. Для растворения соединения использовали ацетонитрил (сорт 0 ос. ч., «Криохром», Россия). Элюирование выполняли в градиентном режиме с применением водного раствора трифторуксусной кислоты (х. ч.) и ацетонитрила в качестве органического модификатора. Хроматографический анализ проводили на жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», г. Новосибирск) с УФ-детектором (190-360 нм), программное обеспечение – пакет «МультиХром 1.5х-Е» (ЗАО «Амперсенд», г. Новосибирск).

2.2.2.2 Выбор условий хроматографического определения

В нашем распоряжении была универсальная фаза с высокой емкостью для обращенно-фазовой хроматографии на основе октадецилсилила. Поскольку соединение **1** содержит основную группу, в качестве добавки для подвижной фазы использовали трифторуксусную кислоту, которая полностью протонировала соединение и увеличивала время удерживания. Градиентный режим был подобран для разделения всех компонентов смеси с разрешением не менее 1.5. Скорость подвижной фазы соответствовала минимуму на кривой зависимости ВЭТТ от скорости подачи растворителя. Длина волны соответствовала максимуму светопоглощения на УФ-спектре раствора ФАВ в ацетонитриле.

Подобранные хроматографические условия:

Колонка – 2.0×75 мм с октадецилсилил силикагелем (С18), 5.0 мкм (ProntoSil-120-5 С18 AQ); подвижная фаза – А: водный раствор трифторуксусной кислоты с концентрацией 1.0 г/л; В: ацетонитрил; скорость потока – 130 мкл/мин; детектор – спектрофотометрический, 190, 234 и 260 нм; объем пробы – 2.0 мкл; время сканирования – 0.18 сек; градиент – 0 мин – 50 (В,%), 6.0 мин – 50 (В,%), 9.0 мин – 100 (В,%), 18.5 мин – 100 (В,%).

Раствор сравнения. Точную навеску СОП (1.0-3.0 мг) соединения **1** помещали в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1.5 мл, добавляли 1.0 мл ацетонитрила, тщательно перемешивали до полного растворения навески. Проводили разбавления до необходимой концентрации.

Для построения градуировочного графика, исследования правильности и прецизионности АМ в диапазоне концентраций 80-120% ФАВ от номинального количества использовали мерную посуду. Точную навеску (4.0-6.0 мг) ФАВ помещали в мерную колбу вместимостью 5 мл, добавляли 2 мл ацетонитрила, тщательно перемешивали до полного растворения вещества, объем раствора доводили до метки растворителем и перемешивали. Далее отбирали аликвоту для анализа.

Испытуемый раствор. Точную навеску (1.0-3.0 мг) анализируемого вещества помещали в пробирку типа Эппендорф вместимостью 1.5 мл, добавляли 1.0 мл ацетонитрила, тщательно перемешивали до полного растворения навески.

Для приготовления образцов контроля качества в интервале концентраций 80-120% от номинального количества применяли мерную посуду. Точную навеску (4.0-6.0 мг) помещали в мерную колбу объемом 5 мл, добавляли 2 мл ацетонитрила, хорошо перемешивали до полного растворения навески, объем раствора доводили до метки растворителем и перемешивали. Затем отбирали аликвоту полученного раствора в пробирку для анализа.

Для определения времени удерживания каждой из технологических примесей записывали хроматограммы индивидуальных соединений в разработанных хроматографических условиях (Рис. 12-15). Из всех возможных примесей была приготовлена модельная смесь и проанализирована в вышеприведенных условиях (Рис. 16).

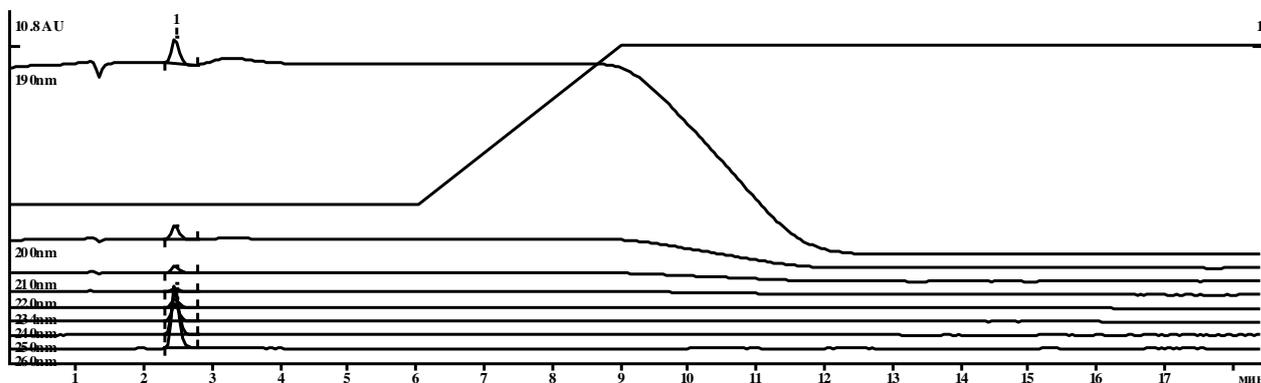


Рис. 12. Хроматограмма раствора тиюфен-2-карбальдегида

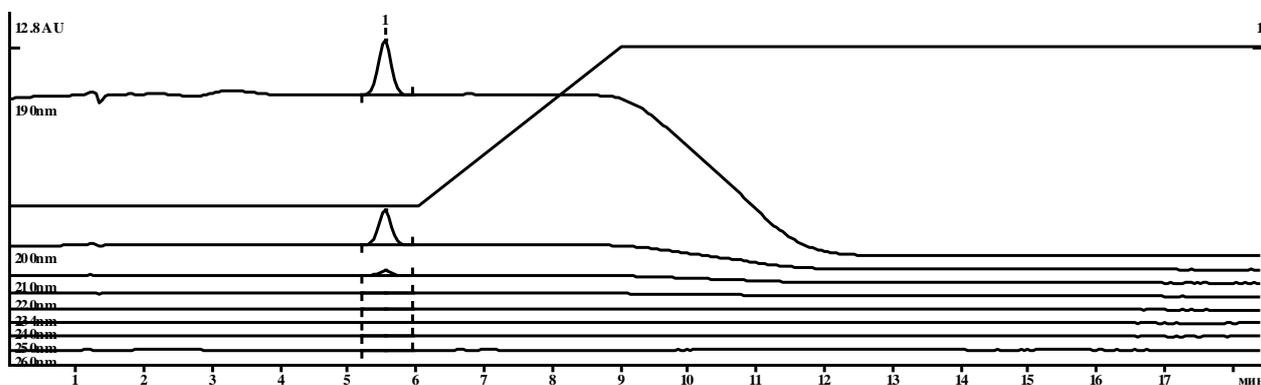


Рис. 13. Хроматограмма раствора (-)-изопулегола

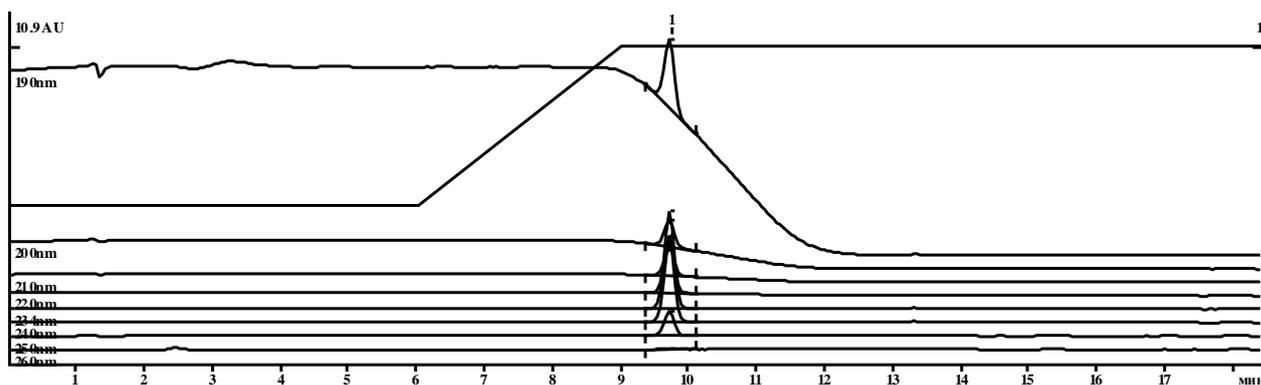


Рис. 14. Хроматограмма раствора стереоизомера соединения 1

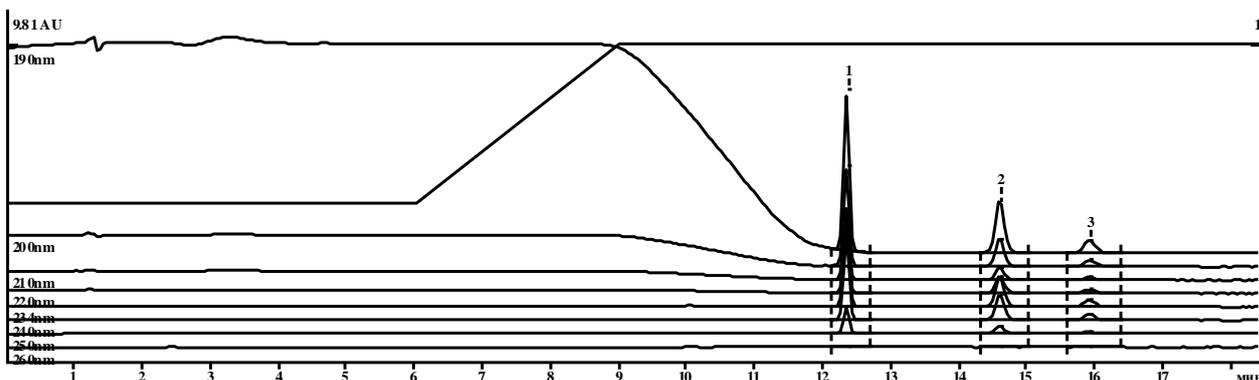


Рис. 15. Хроматограмма раствора смеси трех продуктов дегидратации соединения 1

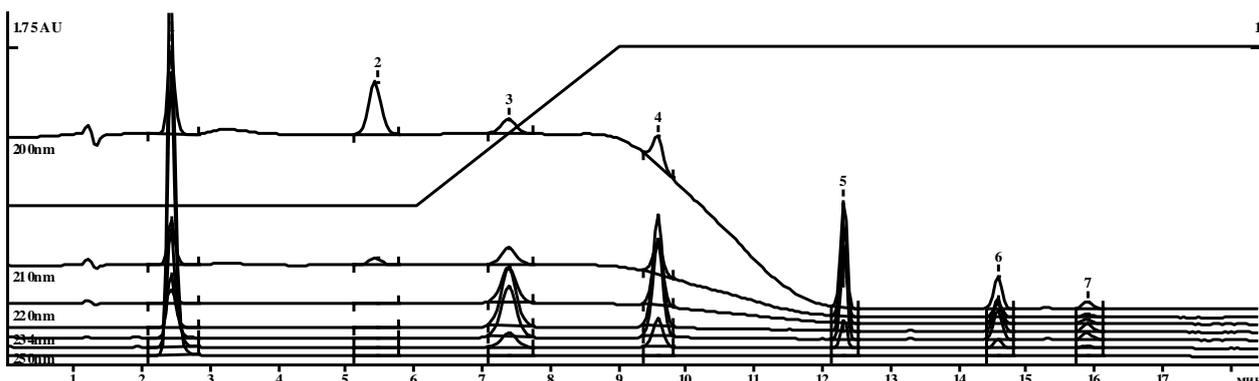


Рис. 16. Хроматограмма раствора модельной смеси: тиофен-2-карбальдегид (пик № 1), (-)-изопулегол (пик № 2), соединение 1 (пик № 3), стереоизомер соединения 1 (пик № 4), продукты дегидратации (пик № 5, 6, 7)

Порядок элюирования компонентов в анализируемой модельной смеси был следующим: тиофен-2-карбальдегид ($t_{y\partial} = 2.44$ мин), (-)-изопулегол ($t_{y\partial} = 5.44$ мин), ФАВ ($t_{y\partial} = 7.39$ мин), его стереоизомер ($t_{y\partial} = 9.59$ мин), продукт дегидратации № 5 ($t_{y\partial} = 12.3$ мин), продукт дегидратации № 6 ($t_{y\partial} = 14.6$ мин), продукт дегидратации № 7 ($t_{y\partial} = 15.9$ мин). Таким образом, подобранные хроматографические условия позволяют разделить компоненты смеси с требуемым разрешением, не менее 1.5 (Табл. 20).

Т а б л и ц а 20

Параметры пригодности хроматографической системы

№	Аналит	* $t_{y\partial}$, мин	** R_s , n, n+1	***ТТ	Асимм.
1	Тиофен-2-карбальдегид (260 нм)	2.44	11	2554	1.2
2	(-)-Изопулегол (190 нм)	5.44	30	3680	1.1
3	ФАВ (234 нм)	7.39	6.0	4149	1.0
4	Сtereoизомер (234 нм)	9.59	12	18812	0.93
5	Продукт дегидратации №5 (234 нм)	12.3	11	67775	1.5
6	Продукт дегидратации №6 (234 нм)	14.6	5.0	61899	1.1
7	Продукт дегидратации №7 (234 нм)	15.9	-	44408	0.90
Критерии приемлемости [3]			Не менее 1.5	Не менее 2000	От 0.8 до 1.5

Примечание: *время удерживания; **разрешение хроматографических пиков; ***теоретические тарелки

На рисунках 17 и 18 приведены хроматограммы растворителя, использованного для приготовления растворов, и раствора сравнения с концентрацией 5.3 мкг/мл, соответ-

ственно. Как видно, на хроматограмме исследуемого продукта (Рис. 19) отсутствуют пики, соответствующие исходным реагентам, родственной примеси и продуктам дегидратации. Исходя из этого, можно утверждать, что содержания возможных технологических примесей в соединении **1** лежат ниже найденных пределов обнаружения. ПО для тиофен-2-карбальдегида, (-)-изопулегола, стереоизомера, продуктов дегидратации № 5, 6, 7 составили 5.6×10^{-2} , 3.2×10^{-1} , 2.2×10^{-1} , 1.8×10^{-1} , 2.2×10^{-1} , 3.7×10^{-1} мкг/мл, соответственно. Характеристики хроматографических пиков не выходили за пределы критических значений (Табл. 21). ПО найдены ниже (Табл. 22).

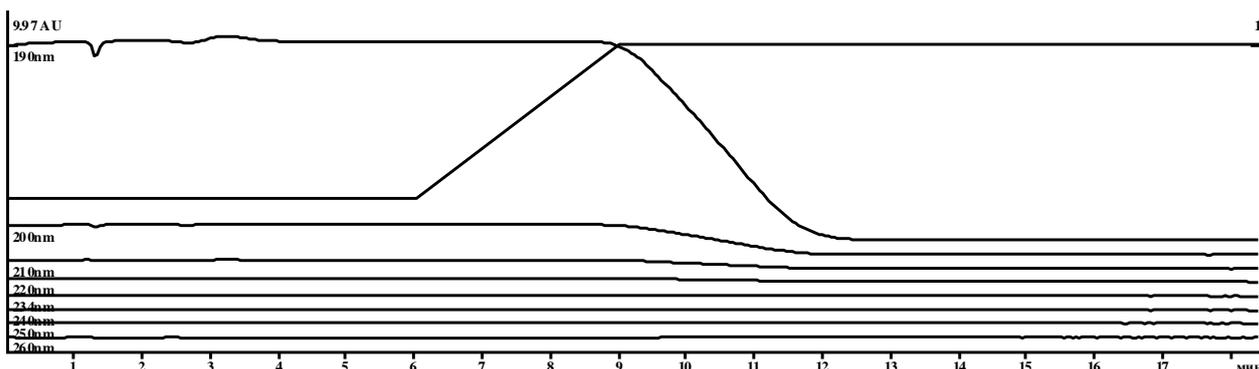


Рис. 17. Хроматограмма растворителя, использованного для приготовления растворов

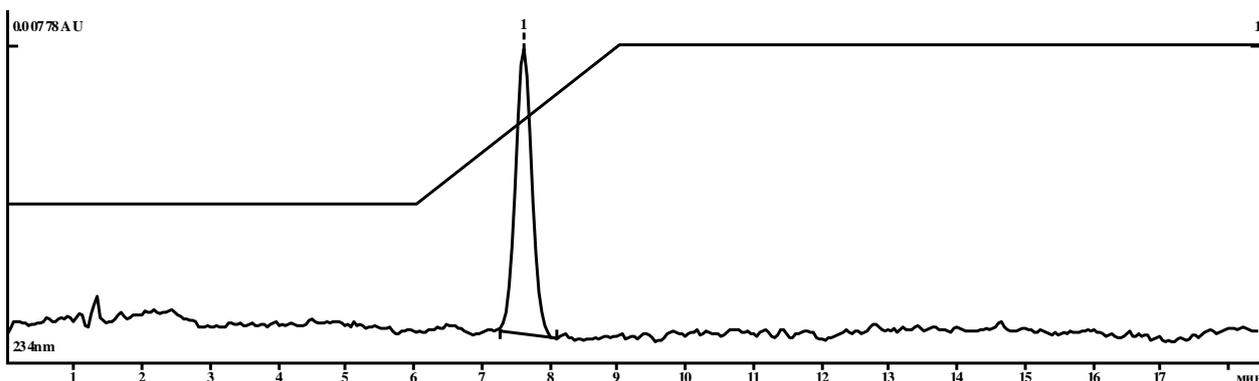


Рис. 18. Хроматограмма раствора сравнения соединения **1** с концентрацией 5.3 мкг/мл

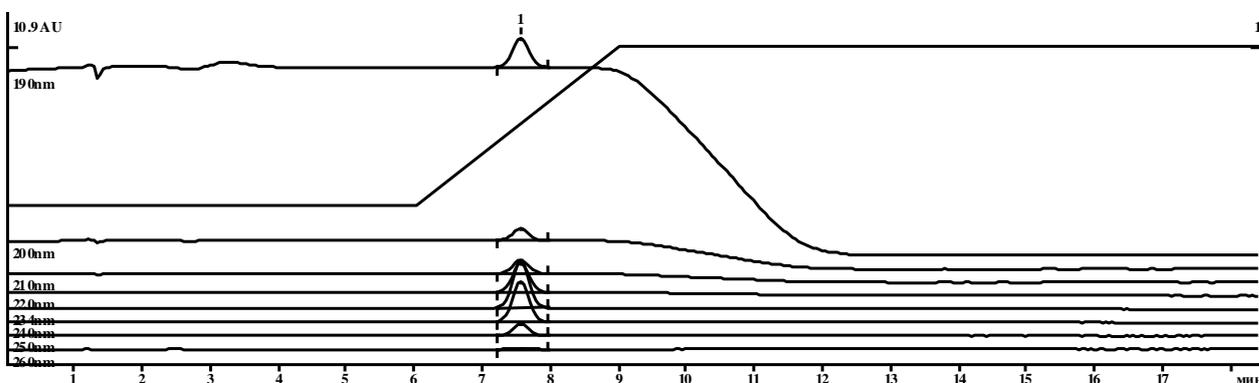


Рис. 19. Хроматограмма испытуемого раствора соединения **1** с концентрацией 1.0 мг/мл

Характеристики хроматографических пиков, приведенных на рисунках 18 и 19

№	Наименование, концентрация раствора	* $t_{уд}$, мин	**S соединения 1, АУ×мкл	***ТТ	Асимм.	Среднее значение **S, АУ×мкл	RSD, %
1	Испытуемый раствор (1.0 мг/мл)	7.41	60.8	4248	1.2	61.1	0.6
2		7.46	60.8	4303	1.0		
3		7.53	61.0	4570	1.0		
4		7.56	61.5	4580	1.0		
5		7.57	61.4	4581	1.0		
1	Раствор сравнения (5.3 мкг/мл)	7.61	0.299	4637	1.0	0.304	1.5
2		7.62	0.300	4678	1.0		
3		7.61	0.306	4911	1.0		
4		7.62	0.310	4651	1.0		
5		7.61	0.304	4644	0.97		

Примечание: *время удерживания; **площадь хроматографического пика; ***теоретические тарелки

2.2.3 Валидация хроматографической методики определения содержания действующего вещества

Поскольку содержания тиофен-2-карбальдегида, (-)-изопулегола, стереоизомера и продуктов дегидратации лежат ниже установленных ПО, проведена валидация методики определения содержания действующего вещества. Согласно фармакопее XIII [41] валидация должна включать следующие характеристики: специфичность, ПКО, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность на уровне повторяемости и внутрилабораторной прецизионности. В этот перечень нами был добавлен параметр надежность для оценки стабильности хроматографической системы.

2.2.3.1 Специфичность аналитической методики

Специфичность была доказана отсутствием посторонних пиков на хроматограмме растворителя, использованного для приготовления анализируемых растворов соединения 1 (Рис. 17). Пики всех возможных технологических примесей на хроматограмме модельного раствора имеют разрешение не менее 1.5 (Рис. 16). Помимо этого была записана масс-хроматограмма анализируемого раствора, на которой также присутствует один единственный пик, соответствующий по времени удерживания исследуемому соединению (Рис. 20). Хромато-масс-спектрометрический анализ выполняли на хроматографе Hewlett-Packard 5890/II с квадрупольным масс-спектрометром (HP MSD 5971) в качестве детектора, кварцевая колонка HP-5MS (30м×0.25мм×0.25мкм), газ-носитель – гелий, 1 мл/мин. Режим повышения температуры колонки: 2 мин при 50°C, от 50 до 280°C со скоростью 15°C/мин, 10 мин при 280°C.

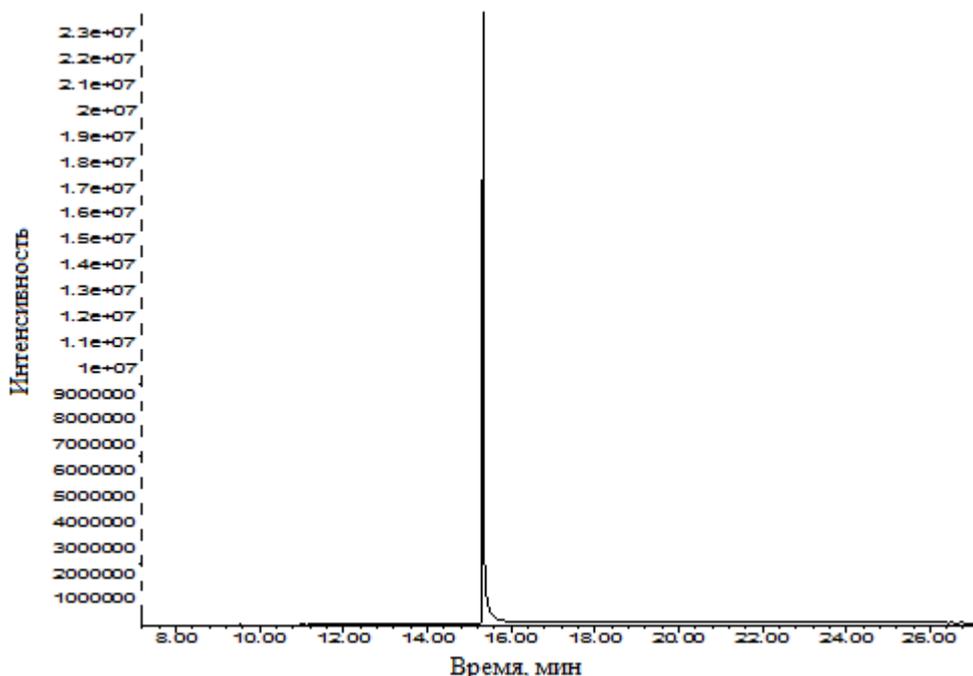


Рис. 20. Масс-хроматограмма физиологически активного вещества

2.2.3.2 Предел обнаружения и количественного определения

При идентификации технологических примесей и определении действующего вещества в ФАВ методом ВЭЖХ-УФ получили ряд значений оптической плотности фона (раствора сравнения). Эти величины составили 0.000286, 0.000311, 0.000311, 0.000339, 0.000308 единиц оптической плотности (AU) (Рис. 21). Раствор сравнения ФАВ с концентрацией 5.3 мкг/мл имел среднюю оптическую плотность 0.00967 AU для пяти параллельных определений. Стандартное отклонение (SD) фонового сигнала составило 0.0000188 единиц оптической плотности, а среднее значение фонового сигнала – 0.000311 единиц. ПО соответствовал концентрации аналита, для которой сигнал превышал уровень фона на $3 \times 0.0000188 = 0.0000564$ единиц оптической плотности. Значение сигнала раствора сравнения за вычетом фона составило $0.00967 - 0.000311 = 0.00936$. Значит, ПО равен $5.3 \text{ мкг/мл} \times (0.0000564 / 0.00936) = 3.2 \times 10^{-2} \text{ мкг/мл}$, ПКО – $3.3 \times 0.032 = 1.0 \times 10^{-1} \text{ мкг/мл}$.

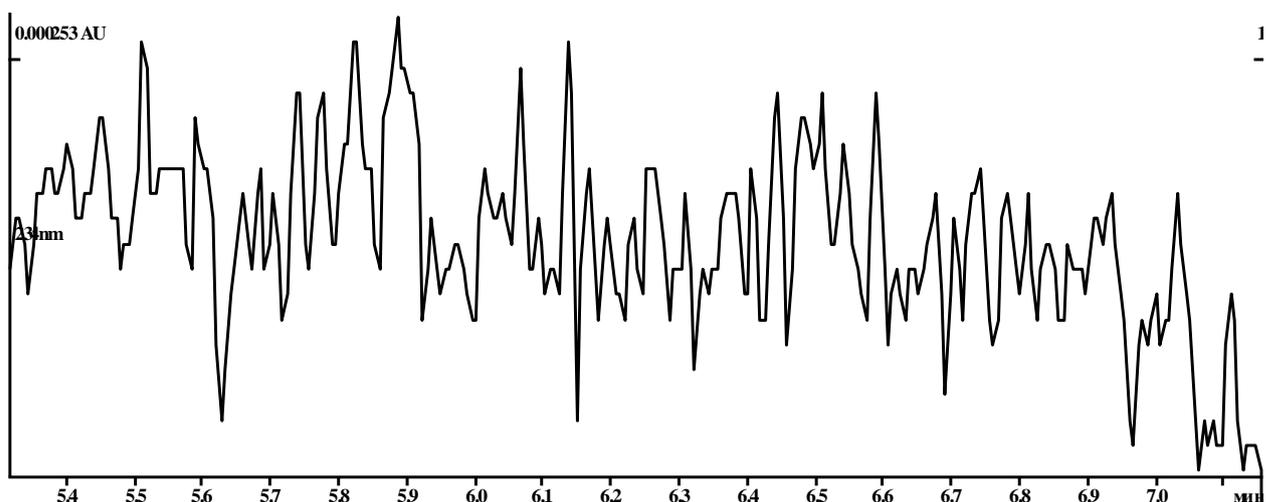


Рис. 21. Оптическая плотность фона раствора сравнения ФАВ в ацетонитриле с концентрацией 5.3 мкг/мл (~0.5% от испытуемого раствора)

ПО возможных примесей определены на индивидуальных растворах каждого соединения при разных концентрациях аналогичным образом. ПО для тиофен-2-карбальдегида, (-)-изопулегола, стереоизомера, продуктов дегидратации № 5, 6, 7 составили 5.6×10^{-2} , 3.2×10^{-1} , 2.2×10^{-1} , 1.8×10^{-1} , 2.2×10^{-1} , 3.7×10^{-1} мкг/мл, соответственно (Табл. 22).

Т а б л и ц а 22

Определение пределов обнаружения технологических примесей в соединении 1

Концентрация, мкг/мл	* t_{y0} , мин	Высота, AU	**S, AU×мкл	***ГТ	Асимметрия	Шум, AU
Тиофен-2-карбальдегид						
94.9	2.47	0.9	17.6	2498	1.4	0.0002
9.49	2.46	0.1	1.72	2364	1.5	
4.74	2.46	0.05	0.854	2567	1.4	
(-)-Изопулегол						
528	5.54	0.9	26.0	4176	1.1	0.0002
106	5.52	0.2	4.90	4274	1.2	
10.6	5.54	0.02	0.471	4022	1.4	
Сtereoизомер						
184	9.66	0.4	10.9	16250	1.5	0.0002
18.4	9.71	0.05	1.14	22127	0.88	
1.84	9.72	0.005	0.106	22267	0.99	
Продукт дегидратации № 5						
60.8	12.4	0.2	2.78	107246	0.82	0.0002
6.08	12.4	0.02	0.268	108162	0.83	
3.04	12.4	0.01	0.132	109477	0.82	
Продукт дегидратации № 6						
29.0	14.6	0.07	1.33	59705	1.3	0.0002
2.90	14.6	0.01	0.132	61415	1.1	
1.45	14.6	0.004	0.0701	57906	0.91	
Продукт дегидратации № 7						
8.59	15.9	0.02	0.393	45228	1.0	0.0002
0.859	15.9	0.002	0.0390	39805	0.80	
0.430	15.9	0.0007	0.0150	52102	1.0	

Примечание: *время удерживания; **площадь хроматографического пика; ***теоретические тарелки

2.2.3.3 Линейность градуировочных графиков

Для построения градуировочного графика при определении содержания действующего вещества использовали СОП с максимальным содержанием действующего вещества по данным элементного анализа и ГХ-МС (99.8%). Была исследована линейная зависимость пяти растворов соединения **1** в ацетонитриле для концентраций ~0.050, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0% от номинального количества, коэффициент корреляции составил 0.9951, что не противоречит $r \geq 0.99$ (Табл. 23, рис. 22).

Т а б л и ц а 23

Результаты оценки линейности в диапазоне ~0.050-1.0% от номинального количества.

Параметры пригодности хроматографической системы

Концентрация (мкг/мл)	% от номинального количества	*ТТ	Асимметрия	**S действующего вещества	Среднее значение **S
0.53	~0.050	6570	1.13	0.026	0.026
		4988	0.90	0.024	
		4350	1.09	0.025	
		4054	0.91	0.028	
		5511	1.38	0.026	
1.9	~0.25	4722	1.01	0.110	0.111
		4746	0.89	0.115	
		4609	1.07	0.117	
		4851	1.00	0.102	
		4656	0.90	0.109	
5.3	~0.50	4637	1.04	0.299	0.304
		4678	1.03	0.300	
		4911	1.05	0.306	
		4651	1.01	0.310	
		4644	0.97	0.304	
7.5	~0.75	4745	0.98	0.477	0.480
		4859	0.99	0.478	
		4791	1.01	0.488	
		4851	1.01	0.480	
		4833	0.99	0.476	
9.6	~1.0	4512	1.06	0.576	0.568
		4573	1.03	0.573	
		4482	1.02	0.564	
		4649	1.04	0.555	
		4659	1.05	0.573	

Примечание: *теоретические тарелки; **площадь хроматографического пика

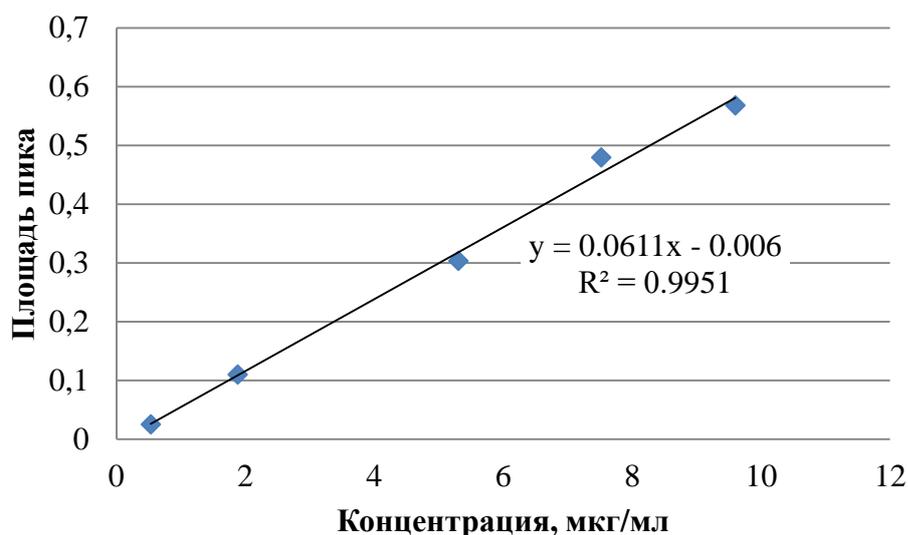


Рис. 22. Линейная зависимость среднего значения площади пика от концентрации соединения **1** в диапазоне ~0.050-1.0% от номинального количества

Также был исследован интервал ~70-130% от номинального количества, коэффициент корреляции составил 0.9981, что не противоречит $r \geq 0.99$ (Табл. 24, рис. 23).

Т а б л и ц а 24

Результаты оценки линейности в диапазоне ~70-130% от номинального количества.

Параметры пригодности хроматографической системы

Концентрация (мг/мл)	% от номинального количества	*ТТ	Асимметрия	**S действующего вещества	Среднее значение **S
0.72	~70	3550	1.20	42.534	42.783
		3482	1.21	42.721	
		3528	1.19	42.944	
		3505	1.22	43.469	
		3609	1.24	42.248	
0.87	~90	3470	1.21	53.250	52.377
		3500	1.22	53.136	
		3471	1.22	49.522	
		3510	1.21	52.946	
0.89	~90	3497	1.21	53.029	53.987
		3543	1.22	54.122	
		3618	1.21	52.280	
		3496	1.23	54.911	
		3484	1.22	54.482	
1.0	~100	3639	1.33	54.141	62.869
		3494	1.22	63.402	
		3507	1.23	62.828	
		3523	1.23	63.615	
		3522	1.23	62.108	
		3505	1.22	62.391	

Концентрация (мг/мл)	% от номинального количества	*ТТ	Асимметрия	**S действующего вещества	Среднее значение **S
1.1	~110	3517	1.22	66.291	66.311
		3473	1.23	67.305	
		3617	1.25	64.889	
		3461	1.23	67.616	
		3533	1.22	65.453	
1.3	~130	3494	1.22	77.595	77.816
		3467	1.23	76.992	
		3512	1.24	78.371	
		3469	1.23	78.983	
		3479	1.23	77.139	

Примечание: *теоретические тарелки; **площадь хроматографического пика

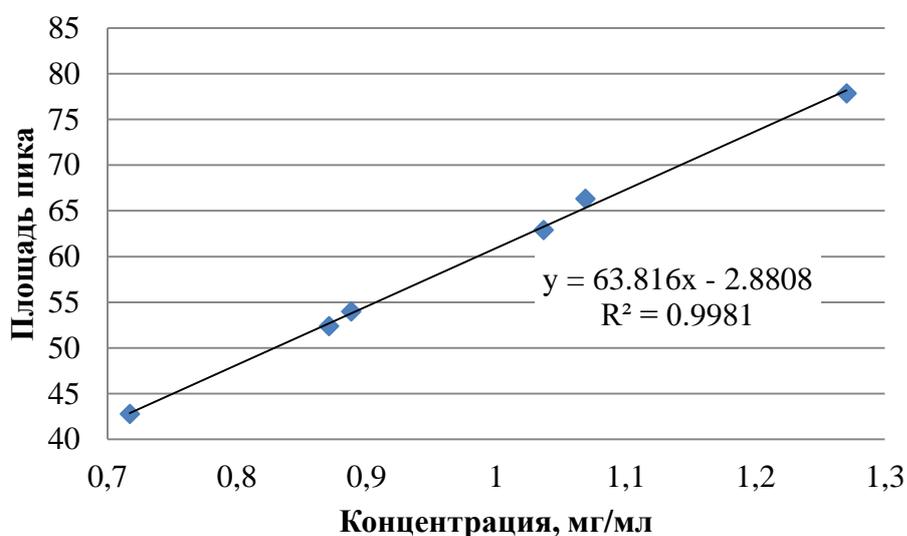


Рис. 23. Линейная зависимость среднего значения площади пика от концентрации соединения **1** в диапазоне ~70-130% от номинального количества

2.2.3.4 Правильность и прецизионность аналитической методики

Для оценки правильности методики весь исследуемый диапазон концентраций разделили на три отрезка: нижний – 0.50-3.6 мкг/мл; средний – 3.6-6.6 мкг/мл; верхний – 6.6-9.6 мкг/мл и провели определения концентраций раствора соединения **1** в каждом из трех интервалов (Табл. 25).

Результаты проверки правильности и повторяемости методики в интервале ~0.050-1.0% от номинального количества. Параметры пригодности хроматографической системы

Введено аналита, мкг/мл	*S пика	Найдено аналита, мкг/мл	**n	***R, %	****ТТ	Асимм.	$\bar{R} \pm \Delta R$ (P = 0.95)	RSD, %
2.20	0.128	2.19	5	99.5	3885	0.94	99.6 ± 0.6	0.5
	0.127	2.18		99.1	4254	0.90		
	0.129	2.21		100.4	4104	0.93		
	0.128	2.19		99.5	4294	0.89		
	0.128	2.19		99.5	4486	0.91		
2.45	0.143	2.44	5	99.6	4309	0.84	100.1 ± 1.1	0.9
	0.143	2.44		99.6	5231	0.93		
	0.144	2.45		100.0	4652	1.2		
	0.146	2.49		101.6	4698	1.0		
	0.143	2.44		99.6	4334	1.2		
4.05	0.241	4.04	5	99.8	4757	0.96	99.8 ± 0.9	0.8
	0.242	4.06		100.2	4786	0.97		
	0.242	4.06		100.2	4759	0.99		
	0.242	4.06		100.2	4735	1.0		
	0.238	3.99		98.5	4578	1.0		
4.40	0.262	4.39	5	99.8	4689	0.98	99.6 ± 0.6	0.5
	0.260	4.35		98.9	4651	1.0		
	0.263	4.40		100.0	4477	0.97		
	0.261	4.37		99.3	4417	1.0		
	0.263	4.40		100.0	4476	0.97		
7.10	0.423	7.02	5	98.9	4584	1.0	99.8 ± 0.8	0.6
	0.427	7.09		99.9	4552	1.0		
	0.426	7.07		99.6	4411	1.0		
	0.427	7.09		99.9	4277	1.0		
	0.431	7.15		100.7	4265	1.0		
7.10	0.425	7.05	5	99.3	4388	1.0	99.8 ± 0.9	0.7
	0.428	7.10		100.0	4357	1.2		
	0.430	7.14		100.6	4425	1.0		
	0.424	7.04		99.2	4492	0.98		
	0.431	7.15		100.7	4453	0.98		

Примечание: *площадь хроматографического пика; **количество определений; ***открываемость; ****теоретические тарелки

Методика прошла проверку на правильность, значения открываемости находятся в интервале от 98.9 до 101.2%, что не превышает критических значений $99.8 \pm 2.0\%$ [180].

Для разработки методики идентификации технологических примесей и определения содержания действующего вещества проводили испытание прецизионности на уровне повторяемости и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности.

Повторяемость исследовали по результатам не менее одного определения для каждого из 3 уровней определяемых величин (нижнего, среднего и верхнего), лежащих в пределах аналитической области методики. Повторяемость аналитической методики оценивали по независимым результатам, полученным в одинаковых условиях в одной лаборато-

рии (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в пределах короткого промежутка времени (Табл. 25).

RSD при проверке повторяемости находится в интервале от 0.5 до 0.9%, что меньше допустимого значения 2.0% [180].

Для оценки внутрилабораторной прецизионности были приготовлены три серии растворов с содержанием действующего вещества 0.25, 0.50 и 0.70% от номинального количества и проанализированы другим аналитиком, в другой день. Каждый раствор был введен в хроматограф 5 раз (Табл. 26).

Т а б л и ц а 26

Оценка внутрилабораторной прецизионности методики в интервале ~0.050-1.0% от номинального количества. Параметры пригодности хроматографической системы

Введено аналита, мкг/мл	*S пика	Найдено аналита, мкг/мл	**n	***R, %	****ТТ	Асимм.	RSD, %
2.58	0.150	2.55	5	98.8	4082	1.1	1.0
	0.151	2.57		99.6	4360	0.99	
	0.154	2.62		101.6	4480	0.93	
	0.152	2.58		100.0	4399	1.3	
	0.151	2.57		99.6	4594	0.96	
4.75	0.284	4.75	5	100.0	4746	1.0	0.8
	0.281	4.70		98.9	4412	1.1	
	0.283	4.73		99.6	4504	1.0	
	0.287	4.80		101.0	4521	0.99	
	0.283	4.73		99.6	4596	1.0	
7.15	0.432	7.17	5	100.3	4560	0.99	0.6
	0.427	7.09		99.2	4544	0.94	
	0.432	7.17		100.3	4418	0.98	
	0.427	7.09		99.2	4287	0.97	
	0.433	7.18		100.4	4674	1.0	

Примечание: *площадь хроматографического пика; **количество определений; ***открываемость; ****теоретические тарелки

RSD при проверке внутрилабораторной прецизионности находится в интервале от 0.6 до 1.0%, что меньше допустимого значения 3.0% [180].

Исследование правильности и прецизионности выполняли для диапазона ~70-130% от номинального количества аналогично описанным ранее экспериментам (Табл. 27, 28).

Результаты проверки правильности и повторяемости методики в интервале ~70-130% от номинального количества. Параметры пригодности хроматографической системы

Введено аналита, мг/мл	*S пика	Найдено аналита, мг/мл	**n	***R,%	****ТТ	Асимм.	$\bar{R} \pm \Delta R$ (P = 0.95)	RSD, %
0.688	40.895	0.686	5	99.8	3512	1.20	100.2 ± 0.6	0.5
	41.448	0.695		101.0	3511	1.20		
	41.083	0.689		100.2	3518	1.20		
	40.934	0.687		99.9	3561	1.22		
	41.155	0.690		100.4	3548	1.21		
0.856	51.559	0.853	5	99.7	3527	1.22	99.5 ± 0.5	0.4
	51.231	0.848		99.1	3634	1.24		
	51.598	0.854		99.8	3544	1.22		
	51.145	0.847		98.9	3578	1.22		
	51.688	0.855		99.9	3537	1.22		
1.03	62.117	1.02	5	98.8	3585	1.24	99.7 ± 1.4	1.1
	63.547	1.04		101.0	3588	1.23		
	61.805	1.01		98.3	3586	1.23		
	62.842	1.03		99.9	3568	1.24		
	63.161	1.03		100.4	3569	1.24		
1.05	64.035	1.05	5	99.8	3587	1.25	100.6 ± 0.8	0.7
	64.847	1.06		101.0	3595	1.23		
	64.919	1.06		101.1	3594	1.22		
	64.806	1.06		101.0	3612	1.24		
	64.044	1.05		99.8	3611	1.23		
1.19	71.331	1.16	5	97.9	3576	1.25	100.1 ± 1.7	1.3
	73.019	1.19		100.1	3548	1.24		
	74.143	1.21		101.6	3541	1.24		
	73.240	1.19		100.4	3556	1.23		
	73.016	1.19		100.1	3527	1.24		
1.23	74.869	1.22	5	98.9	3556	1.24	99.3 ± 1.1	0.9
	75.307	1.23		99.4	3599	1.24		
	74.770	1.22		98.8	3561	1.25		
	74.759	1.22		98.8	3524	1.24		
	76.385	1.24		100.8	3551	1.24		

Примечание: *площадь хроматографического пика; **количество определений; ***открываемость; ****теоретические тарелки

Методика прошла проверку на правильность, значения открываемости находятся в интервале от 98.2 до 101.8%, что не превышает критических значений $99.8 \pm 2.0\%$ [180].

RSD при проверке повторяемости находится в интервале от 0.4 до 1.3%, что меньше допустимого значения 2.0% [180].

Оценка внутрилабораторной прецизионности методики в интервале ~70-130% от номинального количества. Параметры пригодности хроматографической системы

Введено аналита, мкг/мл	*S пика	Найдено аналита, мкг/мл	**n	***R, %	****ТТ	Асимм.	RSD, %
0.855	51.689	0.855	5	100.0	3569	1.21	0.8
	51.480	0.852		99.6	3565	1.20	
	51.518	0.852		99.7	3553	1.21	
	51.408	0.851		99.5	3542	1.22	
	50.546	0.837		97.9	3558	1.22	
1.02	60.828	0.998	5	97.9	3610	1.24	1.1
	61.825	1.01		99.4	3567	1.23	
	61.892	1.01		99.5	3773	1.30	
	60.476	0.993		97.3	3579	1.24	
	62.123	1.02		99.9	3591	1.25	
1.13	69.864	1.14	5	101.0	3582	1.24	1.9
	68.072	1.11		98.5	3622	1.25	
	68.431	1.12		99.0	3648	1.24	
	68.865	1.12		99.6	3556	1.23	
	71.477	1.17		103.3	3578	1.24	

Примечание: *площадь хроматографического пика; **количество определений; ***открываемость; ****теоретические тарелки

RSD при проверке внутрилабораторной прецизионности находится в интервале от 0.8 до 1.9%, что меньше допустимого значения 3.0% [180].

2.2.3.5 Устойчивость анализируемых растворов

Не всегда есть возможность проанализировать образцы в день приготовления растворов. Для этого необходимо выявление времени, в течение которого исследуемые растворы стабильны. Образцы перед анализом хранили в холодильной камере при – 6°C. Для определения времени устойчивости испытуемый раствор с концентрацией 1.0 мг/мл помещали в холодильную камеру, где температуру контролировали с помощью ртутного термометра. Раствор после хранения в камере в течение 8 часов был проанализирован, RSD для 5 параллельных вводов занесены в таблицу 29.

Т а б л и ц а 29

Результаты оценки устойчивости испытуемого раствора

№	Наименование, концентрация раствора	Среднее значение площади пика	RSD, %
1	Испытуемый раствор (1.0 мг/мл)	61.1	0.6
2	Испытуемый раствор (1.0 мг/мл) после хранения в холодильнике в течение 8 ч при – 6°C	61.0	1.9

RSD не превышает 2.0%, что удовлетворяет критерию устойчивости испытуемых растворов.

2.2.3.6 Надежность хроматографической системы

При уменьшении скорости потока параметры пригодности системы изменяются в рамках критических значений (Табл. 30).

Т а б л и ц а 30

Параметры пригодности системы при исследовании надежности испытуемого раствора

Условия	Эффективность колонки, *ТТ	Асимметрия
Скорость потока 100 мкл/мин	4177	1.0
Скорость потока 130 мкл/мин	4659	1.0
Скорость потока 160 мкл/мин	4760	1.0
Критические значения	Не менее 2000	Не более 1.5

Примечание: *теоретические тарелки

Разработана методика идентификации технологических примесей и определения содержания действующего вещества в перспективном ФАВ (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-оле методом ВЭЖХ–УФ. В результате синтеза и выделения в соединении могут присутствовать технологические примеси, среди которых исходные реагенты – тиофен-2-карбальдегид и (–)-изопулегол, родственная примесь – стереоизомер ФАВ, промежуточные соединения – продукты дегидратации. Разработанные хроматографические условия позволили разделить возможные технологические примеси и анализируемое соединение I. Содержания тиофен-2-карбальдегида, (–)-изопулегола, стереоизомера и продуктов дегидратации лежали ниже установленных ПО. Проведена валидация методики определения действующего вещества по следующим характеристикам: специфичность, ПКО, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность на уровне повторяемости и внутрилабораторной прецизионности и надежность хроматографической системы. Рабочий диапазон концентраций методики находился в интервале от 0.50 до 10 мкг/мл. При оценке правильности открываемость имела значения от 98.9 до 101.2%. Показано, что методика обладает достаточной точностью, среднее значение RSD при оценке повторяемости не превышало 0.7%, при оценке внутрилабораторной прецизионности – 0.8%, что ниже критических значений 2.0 и 3.0%, соответственно. Также исследована линейная зависимость, правильность и прецизионность АМ в интервале ~70-130% от номинального количества, значения не превышали критических величин. Хроматографическая методика является специфичной, надежной, точной и достоверной для идентификации технологических примесей и определения действующего вещества в ФАВ [184].

2.3 Анализ чистоты физиологически активного вещества (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола по показателю «остаточные органические растворители»

Исследуемое ФАВ получали реакцией тиофен-2-карбальдегида и (-)-изопулегола в присутствии катализатора монтмориллонита К10 с использованием ДХМ в качестве растворителя. Далее ДХМ отгоняли на ротационном испарителе, реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа, добавляли ЭА, катализатор отфильтровывали, растворитель отгоняли. Остаток растворяли в МТБЭ с последующим добавлением *n*-гексана и оставляли при комнатной температуре для кристаллизации. Процедуру перекристаллизации повторяли несколько раз [2]. Таким образом, при получении соединения **1** применяли четыре растворителя: ДХМ, ЭА, МТБЭ, *n*-гексан, физико-химические свойства, которых приведены в таблице 31.

Т а б л и ц а 31

Физико-химические свойства органических растворителей [185]

Наименование растворителя	Молекулярная масса, г/моль	Температура кипения, °С	Плотность, г/мл	Удельный объем, мл/г
Дихлорметан	84.93	40	1.330	0.750
Этилацетат	88.11	77	0.900	1.110
Метил- <i>трет</i> -бутиловый эфир	88.15	55	0.750	1.330
<i>n</i> -Гексан	86.18	69	0.655	1.530

Одним из требований контроля качества ФС, согласно фармакопее XIII, является определение содержания ООР, применяемых в синтезе и выделении субстанции [41]. ГХ является наиболее используемым методом для анализа фармацевтических продуктов на присутствие ОР. Установление содержания ООР в ЛП и субстанциях с помощью ГХ является сложной задачей ввиду того, что возникает необходимость определять разные по свойствам сочетания растворителей с низкими ПО.

Разделение компонентов смеси проводили на коммерческих и некоммерческих капиллярных колонках разной полярности. В международных фармакопеях предлагают использовать для определения ООР НФ низкой/средней полярности состава 6%-цианопропилфенил-94%-диметилполисилоксан под торговыми номерами 624 или 1301 (USP G43). Для решения поставленной задачи также применяли стандартную коммерческую колонку с НФ состава 5%-фенил-95%-диметилполисилоксан под торговым номером 5 (USP G27), которая позволяет решать широкий спектр газохроматографических задач. Кроме вышеперечисленных колонок, использовали некоммерческую колонку, заполненную модифицированным ПТМСП, которая ранее для задач фармацевтического анализа не была опробована.

Растворители *n*-гексан и ДХМ относятся ко второму классу токсичности. ПДС для *n*-гексана и ДХМ, согласно ГФ XIII, составляют 290 и 600 ppm, соответственно [41]. Растворитель ЭА в ГФ XIII не отнесен к какому-либо классу токсичности. В ГФ XII, так же как в основных фармакопеях мира, ЭА относят к группе растворителей третьего класса токсичности, для которых установлено ПДС на уровне 0.5% (5000 ppm) [42]. К этому же классу токсичности относится МТБЭ. Эти значения ПДС мы и приняли как заданные.

Целью исследования была разработка и валидация методики определения содержания четырех ООР: ДХМ, ЭА, МТБЭ, *n*-гексана в ФАВ методом ГХ-ПИД.

2.3.1 Реактивы и оборудование

Реактивы: ДХМ (ч. д. а.), ЭА (ч. д. а.), МТБЭ (ч. д. а.), *n*-гексан (ч. д. а.), ДМСО (ос. ч.), ацетон (ос. ч.), гидросульфат калия (KHSO₄) (ч. д. а.).

Основное оборудование. Для первого способа применяли газовый хроматограф 6890 Series (Agilent, США) с ПИД. Разделение проводили на капиллярной колонке HP-5MS (30м×0.35мм×0.25мкм) фирмы Agilent с химическим составом НФ – 5%-фенил-95%-диметилполисилоксан. Для второго способа использовали газовый хроматограф кристалл 2000 (Хроматэк, Россия) с ПИД. Разделение определяемых компонентов проводили на капиллярной колонке (30м×0.32мм×0.30мкм), заполненной модифицированной НФ на основе ПТМСП [186, 187, 188]. Для третьего способа применяли газовый хроматограф цвет-800 (Цветаналитик, Россия) с ПИД. Разделение анализов выполняли на коммерческой капиллярной колонке DB-624 (30м×0.32мм×1.80мкм) с НФ состава 6%-цианопропилфенил-94%-метилполисилоксан.

Вспомогательное оборудование: весы микроаналитические AT20 (Mettler Toledo, Швейцария), автоматические дозаторы пипеточные переменного объема 5-50, 20-200, 100-1000 мкл (ThermoScientific, Россия).

2.3.2 Условия газохроматографического определения

Способ № 1. Анализ проводили с программированием температуры. Начальная температура колонки была равна 40°C в течение 2 мин, 5°C/мин до 50°C, 10°C/мин до 70°C, 20°C/мин до 280°C, изотерма при 280°C. Температура испарителя – 280°C, температура детектора – 320°C. Расход газа-носителя водорода через колонку составлял 2 мл/мин, режим постоянного потока, коэффициент деления потока после испарителя был равен 10. Объемная скорость подачи воздуха – 250 мл/мин, водорода – 16 мл/мин, суммарная объемная скорость газа-носителя и поддува – 4 мл/мин.

Способ № 2. Определение выполняли при постоянной температуре. Температура колонки была равна 100°C, температура испарителя – 250°C, температура детектора – 230°C. Расходы газов-носителей азота, воздуха и водорода составляли 26.3, 300 и 50 мл/мин, соответственно.

Способ № 3. Температура колонки – 100°C. Температура испарителя – 250°C. Температура детектора – 230°C. Расходы газов носителей: гелий – 26.3, воздух – 300, водород – 50 см³/мин. Градиент температуры: нагрев с 40 до 100°C со скоростью 2°C/мин, выдерживание при 100°C в течение 20 минут.

2.3.3 Приготовление растворов для анализа

Исследуемое соединение **1** практически не растворимо в воде, поэтому для растворения должна применяться процедура, которая предусматривает использование растворителя, не содержащего легких примесей, хроматографические пики которых могут накладываться на пики анализируемых ОР. В качестве растворителя ФАВ применяли ДМСО в первом и третьем способах, ДМСО и ацетон во втором способе.

Способ № 1. Приготовление раствора модельной смеси всех растворителей проводили растворением точной навески индивидуального ОР в ДМСО. В колбу вместимостью 50 мл предварительно было внесено 10 мл ДМСО, затем вводили поочередно ЭА – 1250 мг, МТБЭ – 1250 мг, ДХМ – 150 мг, *n*-гексан – 72.5 мг и постепенно с перемешиванием доводили раствор до метки ДМСО. Концентрации ОР составили 25 мг/мл для ЭА, 25 мг/мл для МТБЭ, 3.0 мг/мл для ДХМ и 1.4 мг/мл для *n*-гексана.

В дальнейшем, после введения дополнительной стадии очистки ФАВ путем перекристаллизации из ЭА, определение МТБЭ не имело значения, из-за снижения остаточной концентрации до ПО (ПДС = 0.5%).

Рабочие градуировочные растворы готовили внесением раствора модельной смеси в мерную колбу вместимостью 100 мл с последующим разбавлением для получения ряда растворов с необходимыми для сравнительного анализа концентрациями. Процедура приготовления раствора, соответствующего 1.0×ПДС, включала: добавление 1.0 мл раствора модельной смеси растворителей в мерную колбу вместимостью 100 мл, в которую предварительно было внесено 70-80 мл воды, перемешивание и доведение до метки водой.

Анализируемые градуировочные растворы готовили внесением 1.0 мл рабочего градуировочного раствора во флакон для парофазного анализа вместимостью 22 мл, добавлением 4 мл раствора КНСО₄ (2.5 мг/мл КНСО₄ в Н₂О) и 5 мл ДМСО; закрывали пробкой и встряхивали. Таким образом, анализируемый градуировочный раствор содержал 5 мл органической фазы и 5 мл водной фазы.

Парогазовую равновесную фазу над анализируемым раствором при температуре 25°C отбирали через прокладку пробки иглой газоплотного шприца и вводили в испаритель газового хроматографа. Объем вводимой газовой пробы составлял 200 мкл.

Исходный испытуемый раствор готовили растворением в ДМСО 250 мг соединения **1** (точная навеска) в мерной колбе вместимостью 25 мл. 5.0 мл исходного испытуемого раствора вводили в герметизируемый стандартный флакон вместимостью 22 мл, в который предварительно добавили 1 мл воды и 4 мл раствора КНСО₄. Флакон герметизировали, содержимое интенсивно перемешивали. В результате, анализируемый испытуемый раствор также содержал 5 мл органической фазы и 5 мл водной фазы.

Способ № 2. Градуировочную зависимость устанавливали методом абсолютной градуировки на смесях *n*-гексана и МТБЭ в ДМСО; ДХМ и ЭА в ацетоне.

Анализируемые градуировочные растворы готовили в колбе вместимостью 25 мл растворением точной навески ОР в соответствующем растворителе.

Анализируемый испытуемый раствор готовили в колбе объемом 25 мл растворением точной навески соединения **1** в ДМСО при определении *n*-гексана и МТБЭ, в ацетоне – при определении ДХМ и ЭА. Вводили в хроматограф 1 мкл анализируемой пробы.

Способ № 3. Градуировочную зависимость устанавливали методом абсолютной градуировки на смеси *n*-гексана, МТБЭ, ДХМ и ЭА в ДМСО.

Анализируемые стандартные растворы готовили в колбе вместимостью 25 мл растворением точной навески ОР в растворителе.

Анализируемый испытуемый раствор готовили в колбе объемом 25 мл растворением точной навески ФАВ в ДМСО. Вводили в хроматограф 1 мкл анализируемой пробы.

2.3.4 Результаты определения остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии

В работе разделение ООР проводили на капиллярных колонках разной полярности. При вводе аналита в виде газовой фазы использовали стандартную колонку HP-5MS, которая позволяет решать широкий спектр газохроматографических задач. Для анализа применяли режим программирования температуры.

Метод, сочетающий парофазный анализ со стандартной колонкой HP-5MS, позволил определить содержания только двух растворителей – *n*-гексана и ЭА. Использованный растворитель ДМСО для соединения **1**, несмотря на проведенную очистку, содержал легкие примеси, пики которых мешали определению основных компонентов смеси. Времена удерживания посторонних примесных соединений совпадали с временами удерживания ДХМ и МТБЭ.

Хроматограмма парогазовой пробы над анализируемым градуировочным раствором с концентрацией равной $1.0 \times \text{ПДС}$ представлена на рисунке 24. Время удерживания *n*-гексана равно 1.96 мин, ЭА – 2.04 мин. Строили график зависимости площади пика растворителя на хроматограмме от ПДС. По градуировочному графику находили неизвестное содержание ООР в исследуемом соединении **1**.

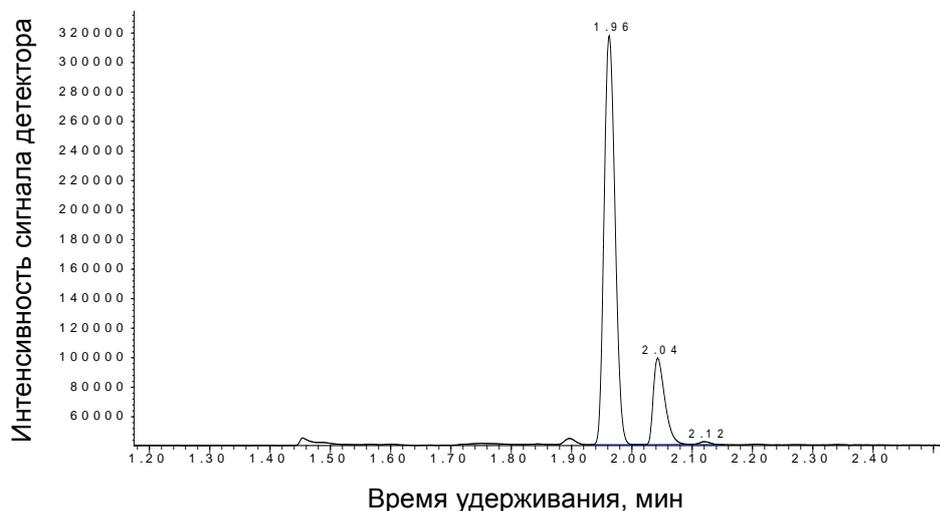


Рис. 24. Хроматограмма парогазовой пробы над анализируемым градуировочным раствором с концентрацией $1.0 \times \text{ПДС}$

Согласно разработанной методике проведено определение ООР в ФАВ. Содержание *n*-гексана составило $1.28 \times \text{ПДС}$, количество ЭА не превысило критического значения. Для очистки соединения **1** применялись вакуумная отгонка при комнатной температуре и 50°C , перекристаллизация из ЭА. Следует подчеркнуть, что снизить содержание *n*-гексана удалось только путем перекристаллизации из ЭА, содержание примеси после очистки не превысило $0.1 \times \text{ПДС}$ (Рис. 25).

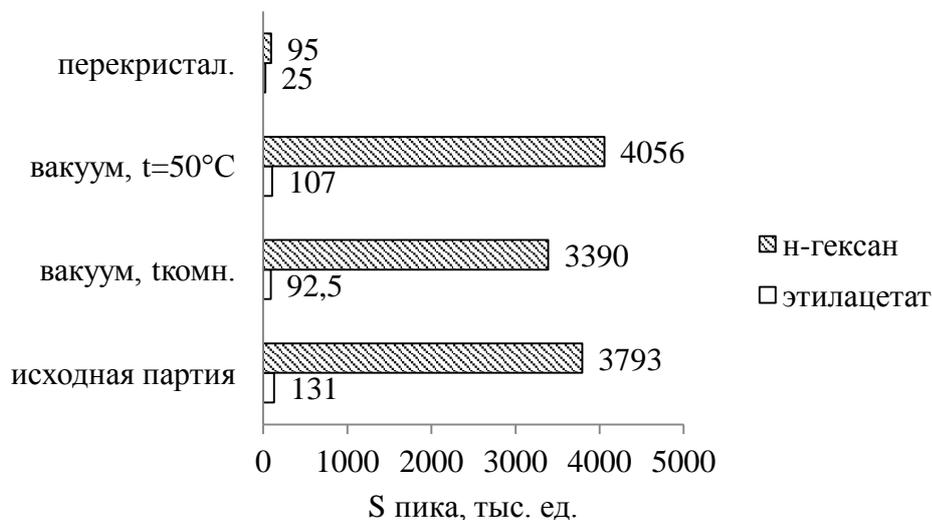


Рис. 25. Содержание *n*-гексана и этилацетата после разных способов очистки соединения **1**

Хроматограмма парогазовой фазы над анализируемым испытуемым раствором после перекристаллизации из ЭА представлена на рисунке 26. Время удерживания *n*-гексана равно 1.96 мин, ЭА – 2.05 мин. На рисунке также видно перекрывание пиков ДХМ ($t_{y\partial} = 1.74$ мин) и МТБЭ ($t_{y\partial} = 1.85$ мин) пиками примесных соединений.

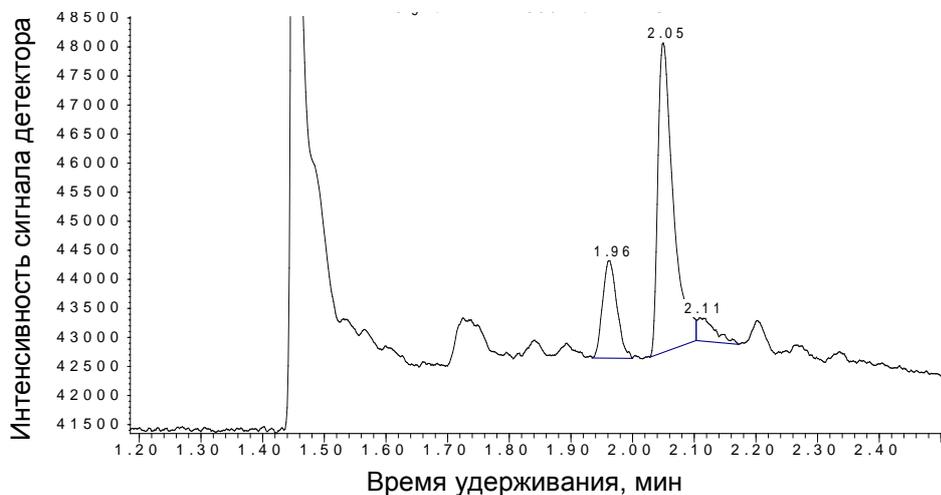


Рис. 26. Хроматограмма парогазовой фазы над анализируемым испытуемым раствором соединения **1** после перекристаллизации из этилацетата

Так как с помощью предложенного способа удалось определить только два ОР из четырех, была разработана методика определения всех четырех растворителей в ФАВ вторым способом, сочетающим ввод жидкой пробы и разделение ООР на колонке, заполненной модифицированной НФ на основе ПТМСП. Задачи по определению ООР на данной НФ ранее не выполнялись.

Из всех возможных ООР была приготовлена модельная смесь и проанализирована в разработанных газохроматографических условиях (Рис. 27).

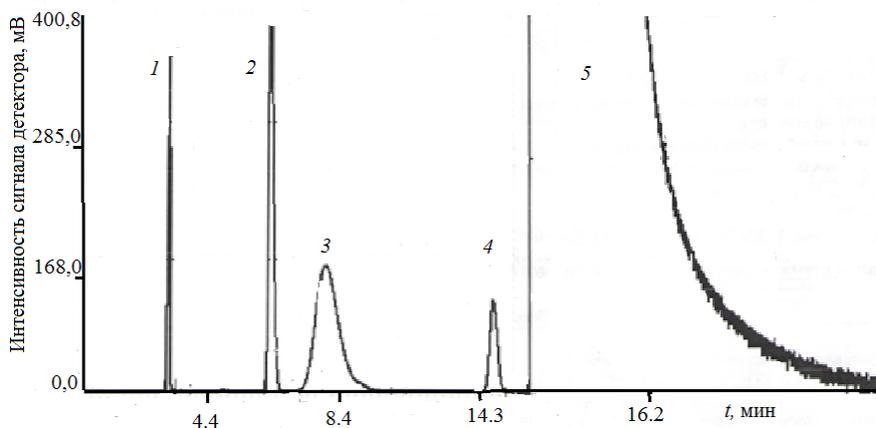


Рис. 27. Хроматограмма модельной смеси растворителей, полученная при разделении на колонке с неподвижной фазой на основе модифицированного поли(1-триметилсилил-1-пропин)а при температуре колонки 100°C:

1 – дихлорметан ($t_{y\partial} = 3.05$ мин); 2 – этилацетат ($t_{y\partial} = 6.53$ мин); 3 – метил-*трет*-бутиловый эфир ($t_{y\partial} = 8.42$ мин); 4 – *n*-гексан ($t_{y\partial} = 14.33$ мин); 5 – ДМСО ($t_{y\partial} = 16.23$ мин)

Пики *n*-гексана и ДМСО имеют близкие времена удерживания при использовании ДМСО в качестве основного растворителя ФАВ. Чтобы избежать перекрывания пиков, растворение соединения **1** при определении ДХМ и ЭА проводили в ДМСО, при определении МТБЭ и *n*-гексана в ацетоне. Хроматограммы растворов соединения **1** в ацетоне и ДМСО представлены на рисунке 28.

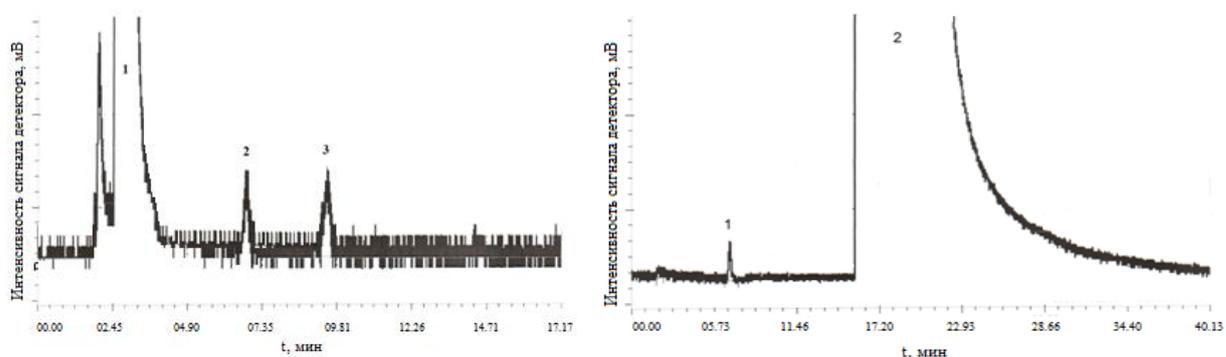


Рис. 28. Хроматограмма (а) соединения **1** в ацетоне: 1 – ацетон; 2 – этилацетат; 3 – метил-*трет*-бутиловый эфир; Хроматограмма (б) соединения **1** в диметилсульфоксиде: 1 – этилацетат; 2 – диметилсульфоксид

В результате проведенных экспериментов в ФАВ найдены следовые содержания ЭА и МТБЭ, значения содержаний ДХМ и *n*-гексана – ниже ПО.

Применение способа, включающего прямой ввод раствора соединения **1** в испаритель и разделение аналитов на коммерческой капиллярной колонке DB-624, также позволило установить содержания ООР в исследуемом ФАВ. Для определения неизвестного содержания строили градуировочную зависимость концентрации ОР от площади полученного хроматографического пика (Табл. 32).

Т а б л и ц а 32

Данные для построения градуировочных графиков каждого растворителя

	Полуширина пика	Время	Высота	Площадь
0.1×ПДС				
ДХМ	00:00:08	00:10:03	0.00104	0.00918
МТБЭ	00:00:08	00:10:54	0.03369	0.28524
<i>n</i> -Гексан	00:00:07	00:11:49	0.00169	0.01244
ЭА	00:00:09	00:14:32	0.02544	0.19665
0.5×ПДС				
ДХМ	00:00:09	00:10:03	0.00258	0.02484
МТБЭ	00:00:09	00:10:54	0.09303	0.87806
<i>n</i> -Гексан	00:00:08	00:11:49	0.00546	0.05120
ЭА	00:00:09	00:14:32	0.06436	0.67146
1.0×ПДС				
ДХМ	00:00:09	00:09:59	0.00574	0.05582
МТБЭ	00:00:09	00:10:49	0.21114	1.95540
<i>n</i> -Гексан	00:00:08	00:11:44	0.01156	0.08880
ЭА	00:00:09	00:14:27	0.14130	1.31598

	Полуширина пика	Время	Высота	Площадь
2.0×ПДС				
ДХМ	00:00:11	00:09:46	0.01226	0.13700
МТБЭ	00:00:09	00:10:35	0.43013	4.14655
<i>n</i> -Гексан	00:00:08	00:11:29	0.02230	0.17766
ЭА	00:00:10	00:14:12	0.29699	2.93396
5.0×ПДС				
ДХМ	00:00:09	00:10:02	0.03426	0.29714
МТБЭ	00:00:12	00:10:49	1.00141	11.6725
<i>n</i> -Гексан	00:00:08	00:11:47	0.12420	0.93797
ЭА	00:00:10	00:14:35	0.81300	8.19740

В результате проведенных экспериментов в ФАВ найдены следовые содержания ЭА и МТБЭ (Табл. 33), значения содержаний ДХМ и *n*-гексана – ниже пределов обнаружения.

Т а б л и ц а 33

Результаты определения содержания этилацетата и метил-*трет*-бутилового эфира в соединении 1

Этилацетат			
Число степеней свободы, f	Среднее значение содержания растворителя, ppm	Коэффициент Стьюдента, t (8;0.95)	Доверительный интервал, ±Δ
8	0.18	2.31	0.02
Метил- <i>трет</i> -бутиловый эфир			
Число степеней свободы, f	Среднее значение содержания растворителя, ppm	Коэффициент Стьюдента, t(8;0.95)	Доверительный интервал, ±Δ
8	0.29	2.31	0.04

Методика, включающая парофазный анализ и разделение аналитов на стандартной колонке HP-5MS, позволила определить содержания только двух растворителей – *n*-гексана и ЭА. Использованный растворитель ДМСО для соединения 1, несмотря на проведенную очистку, содержал легкие примеси, пики которых мешали определению основных компонентов смеси. Времена удерживания посторонних примесных соединений совпадали с времена удерживания ДХМ и МТБЭ. С применением методики, сочетающей прямой ввод раствора образца в испаритель и разделение определяемых компонентов на коммерческой капиллярной колонке DB-624, удалось идентифицировать и определить требуемые ООР. Также разработана и валидирована методика прямого ввода анализируемого раствора и разделение на некоммерческой капиллярной колонке, заполненной НФ на основе модифицированного ПТМСП, которая для определения растворителей в ФАВ ранее не применялась. Далее последняя методика была валидирована в соответствии с требованиями фармакопеи РФ.

2.3.5 Валидация методики определения остаточных растворителей методом газовой хроматографии

Была выполнена валидация разработанной АМ, что является экспериментальным доказательством того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач. При валидации оценивали АМ по следующим характеристикам: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность, надежность хроматографической системы.

2.3.5.1 Специфичность аналитической методики

На хроматограммах чистых растворителей, использованных для приготовления растворов, отсутствовали пики посторонних соединений.

2.3.5.2 Правильность методики

Правильность характеризуется отклонением среднего результата большого числа определений от истинного содержания определяемого компонента в пробе, т. е. она тем выше, чем меньше систематическая погрешность. Предварительно выполняли проверку результатов на выбросы.

Проверку на выброс максимального и минимального значения проводили с помощью критерия Граббса при определении ЭА и МТБЭ (Табл. 34). Измерение содержания ООР в исследуемом соединении выполняли в течение одного рабочего дня.

Т а б л и ц а 34

Оценка методики на выбросы результатов при определении содержания этилацетата и метил-трет-бутилового эфира в физиологически активном веществе

1f	$^2X_{\text{ср}}$, ppm	$^3G_{\text{max}}$ $G_{\text{таб.}}(f=8, p=0.95) = 2.126$	$^3G_{\text{min}}$ $G_{\text{таб.}}(f=8, p=0.95) = 2.126$	4SD	$^5t(8;0.95)$	$^6\pm\Delta$
этилацетат						
8	0.10	1.59	1.29	0.03	2.31	0.023
метил-трет-бутиловый эфир						
8	0.20	1.34	0.89	0.08	2.31	0.06

Примечание: 1f – число степеней свободы; $^2X_{\text{ср}}$ – среднее содержание растворителя в исследуемом соединении **1**; 3G – критерий Граббса; 4SD – стандартное отклонение; $^5t(8;0.95)$ – коэффициент Стьюдента; $^6\pm\Delta$ – доверительный интервал

Минимальное и максимальное значения критерия Граббса не превышали табличной величины, что доказывало отсутствие выбросов среди полученных результатов с использованием предложенной методики.

Для оценки правильности готовили 3 модельных раствора остаточного растворителя в нижнем, среднем и верхнем интервале градуировочного графика, каждый раствор хромато-

графировали не менее трех раз. Рассчитывали открываемость, среднее значение открываемости (R_{cp}), SD , RSD , $\pm\Delta$, средние абсолютную и относительную погрешности (Табл. 35).

Т а б л и ц а 35

Оценка правильности методики определения этилацетата и метил-трет-бутилового эфира

этилацетат	метил-трет-бутиловый эфир
Метрологические характеристики	
<p>n (число определений) = 9, f = n-1 = 8 Среднее значение, R_{cp} = 100.2% Стандартное отклонение, SD = 1.1% Относительное стандартное отклонение, RSD = 1.1% Коэффициент Стьюдента, $t(p = 0.95) = 2.31$ Доверительный интервал, $\pm\Delta = 0.8\%$ Средняя абсолютная погрешность 0.16% Средняя относительная погрешность 0.16%</p>	<p>n (число определений) = 9, f = n-1 = 8 Среднее значение, R_{cp} = 99.6% Стандартное отклонение, SD = 0.71% Относительное стандартное отклонение, $RSD=0.71\%$ Коэффициент Стьюдента, $t(p = 0.95) = 2.31$ Доверительный интервал, $\pm\Delta = 0.5\%$ Средняя абсолютная погрешность – 0.37% Средняя относительная погрешность 0.37%</p>

Методика прошла проверку на правильность. Средние значения открываемости находились в интервале от 99.4 до 101.0% для ЭА и от 99.5 до 100.1% для МТБЭ.

2.3.5.3 Прецизионность методики

Прецизионность методики оценивали на двух уровнях в виде повторяемости и внутрилабораторной прецизионности. Повторяемость выражали SD результатов в пределах одного рабочего дня; внутрилабораторная прецизионность была исследована в течение двух рабочих дней (Табл. 36).

Т а б л и ц а 36

Оценка повторяемости и внутрилабораторной прецизионности аналитической методики при определении содержания этилацетата и метил-трет-бутилового эфира

День	1f	$^2X_{cp}$, ppm	$^3G_{max}$ $G_{таб,(f=8, p=0.95)} = 2.126$	$^3G_{min}$ $G_{таб,(f=8, p=0.95)} = 2.126$	4SD	$^5t(0.95)$	$^6\pm\Delta$
этилацетат							
1	8	0.10	1.59	1.29	0.03	2.31	0.023
2			1.53	1.53	0.03		0.023
метил-трет-бутиловый эфир							
1	8	0.20	1.34	0.89	0.08	2.31	0.06
2			1.60	0.93	0.09		0.07

Примечание: 1f – число степеней свободы; $^2X_{cp}$ – среднее содержание растворителя в исследуемом соединении **1**; 3G – критерий Граббса; 4SD – стандартное отклонение; $^5t(8;0.95)$ – коэффициент Стьюдента; $^6\pm\Delta$ – доверительный интервал

SD результатов при определении ЭА и МТБЭ в ФАВ с использованием разработанной методики не превышали 0.03 и 0.09 ppm, соответственно. При сравнении результатов, полученных в разные дни, различия в воспроизводимостях отсутствовали, т.е. случайные погрешности были одного порядка (Табл. 37).

**Сравнение двух выборок результатов при определении
этилацетата и метил-трет-бутилового эфира в разные дни**

День	¹ f = n-1	² X _{ср} , ppm	³ SD	Метрологические характеристики
этилацетат				
1	8	0.10	0.03	Критерий Фишера $F = (SD_2)^2 / (SD_1)^2 = 1.15$ Табличное значение $F (f_1 = f_2 = 8, p = 0.95) = 3.44$ $F_{табл} > F_{экср} \Rightarrow$ Сопоставимые величины SD \Rightarrow t-тест
2			0.03	Критерий Стьюдента $t = 0.09$ Табличное значение $t (f_1 + f_2 - 2 = 16, p = 0.95) = 2.13$
МТБЭ				
1	8	0.20	0.08	Критерий Фишера $F = (SD_2)^2 / (SD_1)^2 = 1.07$ Табличное значение $F (f_1 = f_2 = 8, p = 0.95) = 3.44$ $F_{табл} > F_{экср} \Rightarrow$ Сопоставимые величины SD \Rightarrow t-тест
2			0.09	Критерий Стьюдента $t = 0.06$ Табличное значение $t (f_1 + f_2 - 2 = 16, p = 0.95) = 2.13$

Примечание: ¹f – число степеней свободы; ²X_{ср} – среднее содержание растворителя в исследуемом соединении 1; ³SD – стандартное отклонение; ⁴t(p = 0.95) – коэффициент Стьюдента

2.3.5.4 Надежность хроматографической системы

Изменение скорости подачи азота незначительно влияет на число ТТ и асимметрию пиков ЭА и МТБЭ, что указывает на устойчивость хроматографической системы в условиях использования методики для определения ООР в исследуемом препарате.

Таким образом, разработана методика определения четырех ООР в (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-оле. Анализ включает прямой ввод раствора соединения 1 в газовый хроматограф с последующим разделением на колонке, заполненной модифицированным ПТМСИ. В ходе выполненного исследования, обнаружены следовые количества ЭА и МТБЭ; содержания ДХМ и н-гексана – ниже ПО. Проведена оценка разработанной методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность градуировочного графика, правильность, прецизионность на уровне повторяемости и внутрिलाбораторной прецизионности, надежность хроматографической системы. Доказана специфичность и подтверждено отсутствие посторонних примесей, мешающих определению ООР. Проведенные валидационные тесты показывают, что разработанная методика является специфичной, точной и достоверной для определения ООР в ФАВ [189].

2.4 Разработка методики определения элементных примесей

К неорганическим примесям в ЛП, в первую очередь, можно отнести элементные примеси. Источниками попадания примесей данного класса являются реактивы, растворители, катализаторы, лабораторная посуда и оборудование, используемые в синтезе ФАВ, воздух окружающей среды, вспомогательные вещества и упаковочный материал для ЛП.

Содержание каждой элементной примеси регламентируется статьями фармакопей мира и должно контролироваться на всех производственных этапах ЛП от ФАВ до ГЛФ. Определение элементных примесей проводят с применением спектральных методов. Так как оборудование рассчитано на работу с растворами, а большинство ФАВ, ФС и ЛП имеют органическую природу и являются нерастворимыми в воде порошками, требуется провести пробоподготовку, чтобы перевести определяемые элементы в раствор. Поэтому целью данной работы было разработать методику определения элементных примесей методом МП-АЭС с предварительной минерализацией в микроволновой системе автоклавного растворения.

2.4.1 Определение содержания сульфатной золы

Испытание на содержание сульфатной золы позволяет оценить содержание катионов металлов, присутствующих в органических соединениях в виде оксидов и сульфатов. Как правило, сульфатная зола не должна превышать 0.1%.

Методика определения. Фарфоровые тигли прокаливали до постоянной массы в муфельной печи при температуре 700°C. Точную навеску испытуемого вещества (300-500 мг) помещали в тигель, добавляли 1 мл концентрированной серной кислоты и нагревали на электрической плитке до исчезновения паров H₂SO₄. Затем тигель помещали в муфельную печь и прокаливали до постоянной массы при температуре 700°C, при этом остаток полностью превратился в пепел. По окончании прокаливания тигель охлаждали в эксикаторе при комнатной температуре, взвешивали, рассчитывали процентное содержание сульфатной золы по формуле:

$$X = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100 \%,$$

где m_1 – масса тигля пустого, г; m_2 – масса тигля с навеской, г; m_3 – масса тигля с золой, г.

Результаты, полученные в ходе определения сульфатной золы в ФАВ, представлены в таблице 38.

Содержание сульфатной золы в исследуемых образцах фармацевтического соединения

(2R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола

№ п/п	Наименование образца	Навеска ($m_2 - m_1$), г	Масса сульфатной золы ($m_2 - m_1$), г	Сульфатная зола, %
1	№1	0.3073	0.0015	0.49
2	№2	0.4996	0.0017	0.34
3	№3	0.3005	0.0011	0.37
Среднее значение				0.40

Содержание сульфатной золы в исследуемом соединении должно быть не более 0.1%. Экспериментальное значение золы в образцах превысило норму в 4 раза. С целью определения причины завышенного результата, провели исследование чистоты прекурсоров соединения **1**. Определение содержания сульфатной золы в тиофен-2-карбальдегиде (весовой процент – 98; «Acros.Organics», Бельгия) проводили по вышеописанной методике (Табл. 39).

Т а б л и ц а 39

Результаты определения содержания сульфатной золы в тиофен-2-карбальдегиде

№ п/п	Наименование образца	Навеска ($m_2 - m_1$), г	Масса сульфатной золы ($m_2 - m_1$), г	Сульфатная зола, %
1	№1	0.4235	0.0019	0.45
2	№2	0.5008	0.0017	0.34
Среднее значение				0.40

Исходя из полученных данных, средние значения содержаний сульфатной золы в образцах ФАВ и тиофен-2-карбальдегида совпали. Для уменьшения содержания золы в образце, провели очистку тиофен-2-карбальдегида и использовали очищенный реагент в синтезе фармацевтического соединения. Удаление посторонних примесей проводили пропусканием альдегида через колонку с SiO₂, используя CH₂Cl₂ в качестве подвижной фазы. Соотношение вещества и силикагеля составило 2.5:1. Далее провели определение содержания сульфатной золы в продукте реакции очищенного тиофен-2-карбальдегида с (–)-изопулеголом. Содержание сульфатной золы не превысило допустимого значения (Табл. 40).

Т а б л и ц а 40

Результаты определения сульфатной золы в соединении **1** из очищенного тиофен-2-карбальдегида

№ п/п	Наименование образца	Навеска ($m_2 - m_1$), г	Масса сульфатной золы ($m_2 - m_1$), г	Сульфатная зола, %
1	№1	0.3130	0	0
2	№2	0.3116	0.0001	0.032
Среднее значение				0.016

Таким образом, при проведении исследований ФАВ было установлено, что значение процентного содержания сульфатной золы в исходном образце превысило норму в 4 раза. Содержание золы в образце тиофен-2-карбальдегида составило 0.4%. Источником загрязнения технологическими и механическими примесями исходного соединения **1** являлся один

из реагентов – тиофен-2-карбальдегид. Очистку альдегида проводили на колонке, заполненной силикагелем, пропуская CH_2Cl_2 . Процентное содержание сульфатной золы в образце ФАВ, полученного из очищенного альдегида, не превысило критического значения.

2.4.2 Разработка методики определения элементных примесей методом атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой

2.4.2.1 Реактивы и оборудование

Реактивы. Приготовление градуировочных растворов проводили с использованием государственных стандартных образцов (ГСО): Al (ГОСТ 7269-96, ООО «УЗХП», Россия), V (ГОСТ 7267-96, ООО «УЗХП», Россия), Fe (ГОСТ 7254-96, ООО «УЗХП», Россия), Co (ГОСТ 7880-2001, ООО «УЗХП», Россия), Ni (7265-96, ООО «УЗХП», Россия), Cu (ГОСТ 7255-96, ООО «УЗХП», Россия), As (ГОСТ 7264-96, ООО «УЗХП», Россия), Sr (ГОСТ 7145-95, ООО «ЦСОВВ», Россия), Mo (ГОСТ 8086-94, ООО «ЦСОВВ», Россия), Ru (Cat#140-052-440, SCP Science Plasmacal, Канада), Pd (ГОСТ 8432-2003, ОАО «Иргиредмет», Россия), Ag (ГОСТ 9727-2010, ООО «ЦСОВВ», Россия), Cd (ГОСТ 7472-98, ООО «УЗХП», Россия), Pt (ГОСТ 8431-2009, ОАО «Иргиредмет», Россия), Hg (ГОСТ 7343-96, ООО «Экротхим», Россия), Pb (ГОСТ 7012-93, ООО «ЦСОВВ», Россия), азотная кислота (ос. ч.), пероксид водорода (ос. ч.), боргидрид натрия (ч. д. а.), бидистиллированная вода.

Оборудование. Определение металлов выполняли на атомно-эмиссионном спектрометре с микроволновой плазмой 4100 (Agilent Technologies, Австралия), предварительно разложив пробу в микроволновой системе автоклавного растворения (Milestone ethos one, Италия).

Вспомогательное оборудование: нагревательный блок (Environmental Express, США), аналитические весы CP224S (Sartorius, Германия).

2.4.2.2 Разложение органического соединения

Из литературных данных известно, что для разложения органических соединений наиболее эффективной разлагающей смесью является концентрированная HNO_3 и H_2O_2 в соотношении 4:1. Эту смесь далее использовали для мокрой минерализации анализируемых образцов. Были подобраны оптимальные параметры разложения в микроволновой системе, включающие мощность, температуру и время.

Методика разложения [190]. Предварительно стаканчики очищали в соответствии с протоколом и проверяли сухость всех деталей автоклава. Тefлоновый стаканчик помещали на весы, тарировали вес и взвешивали непосредственно навеску ($m = 300\text{-}500$ мг) анализируемого соединения **1**. Вставляли стаканчик с пробой в защитный кожух из НТС. Добавляли 4 мл конц. HNO_3 и 1 мл 30%-ной H_2O_2 . Оставляли автоклав открытым на не-

сколько минут, чтобы уменьшить первичное давление и температуру. Закрывали подготовленный автоклав тефлоновой крышкой и аккуратно перемешивали. На тефлоновую крышку помещали адаптер, на адаптер – предохраняющую пружинку из НТС, далее помещали тефлоновое индикаторное кольцо на крышку и опускали его вниз до конца. Готовый автоклав переносили в полипропиленовый сегмент и закручивали прижимной винт в верхней части сегмента, используя динамометрический ключ, до тех пор, пока не услышали отчетливый щелчок. Оставшиеся автоклавы готовили аналогично. Затем ставили сегменты на вращающийся столик в микроволновой системе. Закрывали дверцу и запускали программу разложения.

Программа разложения на микроволновой системе автоклавного растворения. Для разложения органической матрицы во всех экспериментах применяли максимальную мощность 1000 Вт. Это значение рекомендовано руководством пользователя ETHOS 1. Температурная программа включала нагрев в течение 15 минут до температуры 200°C, разложение в течение 30 минут при температуре 200°C (внутри реактора) и 100°C (снаружи реактора), охлаждение в течение 10 минут.

После охлаждения температуру автоклавов доводили до температуры окружающей среды. С помощью динамометрического ключа в положении «открыть» снимали пластиковый адаптер. Удаляли защитный кожух. Помещали тефлоновый стаканчик в нагревательный блок и упаривали досуха для концентрирования металлов. После упаривания в стаканах оставалась смола, которую далее разлагали добавлением 4 мл конц. HNO_3 и 1 мл H_2O_2 . Проводили разложения до тех пор, пока после растворения в 5 мл 1.0 М HNO_3 раствор не станет прозрачным. Раствор переносили в пробирки типа Эппендорф и анализировали методом МП-АЭС.

2.4.2.3 Инструментальные параметры для определения элементных примесей методом МП-АЭС

Определение элементных примесей выполняли на МП-АЭС 4100, для определения Hg и As применяли установку для гидридной генерации. Для каждого элемента оптимизированы инструментальные параметры (Табл. 41). Длину волны выбирали так, чтобы спектральные помехи от других элементов были минимальны.

Условия гидридной генерации. На установке для гидридной генерации можно работать в трех режимах: без гидридной генерации, с гидридной генерацией и подачей образца через один канал, с гидридной генерацией и подачей образца через два канала. С целью увеличения чувствительности для Hg, As и экономии анализируемых растворов нами был выбран второй режим с гидридной генерацией и подачей образца через один канал.

Состав используемого боргидрида натрия подбирали экспериментально. Из литературных источников известно, что для гидридной генерации As применяют раствор NaBH_4 (0.3%), стабилизированный раствором NaOH (0.5%) [191]. Элементный As имеет три длины волны 188.979, 193.695 и 234.984 нм с максимальной интенсивностью. Авторы данной работы рекомендуют определять As на длине волны равной 188.979 нм. При воспроизведении предложенных условий были получены спектры плохого качества (Рис. 29). Далее приготовили растворы боргидрида натрия следующего состава: NaBH_4 (0.3%) + NaOH (0.5%), NaBH_4 (0.4%) + NaOH (0.5%), NaBH_4 (0.5%) + NaOH (0.5%) (Рис. 30). Удовлетворительного результата удалось добиться с применением NaBH_4 (0.4%), стабилизированного NaOH (0.5%), $\lambda = 193.695$ нм и оптимизации давления в распылителе. Следует подчеркнуть, что длина волны менее 200 нм требует длительной продувки монохроматора.

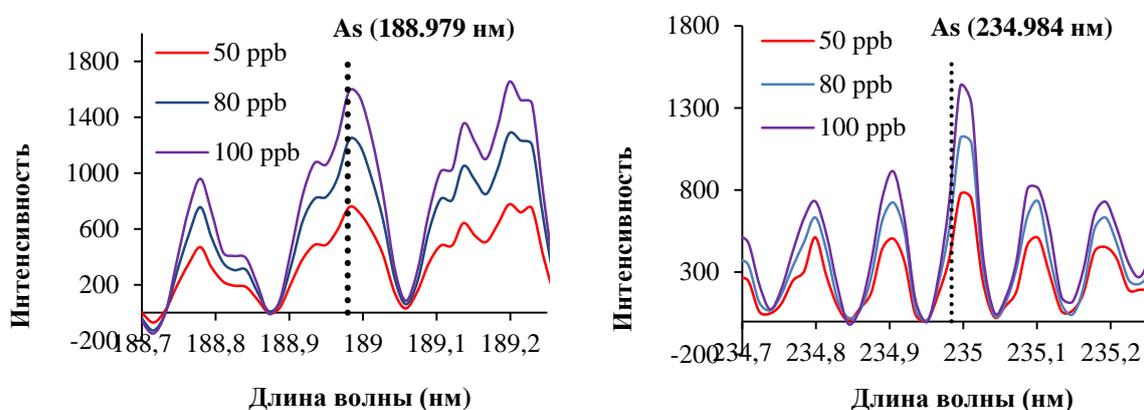


Рис. 29. Спектры растворов As при разных концентрациях: а) $\lambda = 188.979$ нм и б) $\lambda = 234.984$ нм. Для гидридной генерации использовали NaBH_4 (0.3%), стабилизированный раствором NaOH (0.5%)

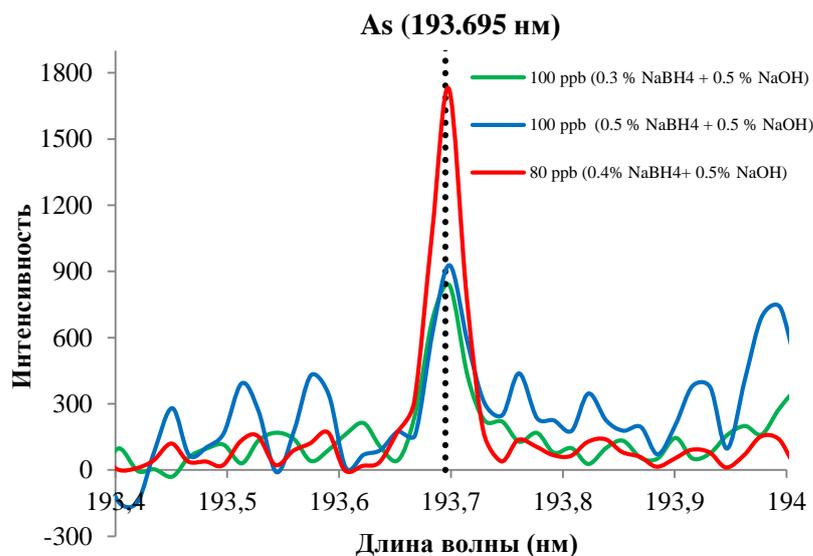


Рис. 30. Спектры растворов As при разных концентрациях, $\lambda = 193.695$ нм. Для гидридной генерации использовали разные составы NaBH_4 , стабилизированного раствором NaOH

Ртуть относится к тем элементам, для которых выбор параметров работы на спектрометре является важным аспектом для получения интенсивных спектров и линейных градуировок. Подобранные инструментальные параметры работы на спектрометре МП-АЭС модели 4100: времена чтения (с), забора (с) и стабилизации (с), количество репликаций и скорость насоса представлены в таблице 41. Спектры ртути I имели меньшее значение соотношения сигнал/шум в отличие от спектров ртути II (Рис. 31). Гидридную генерацию выполняли, применяя NaBH_4 (1.5%), стабилизированный 0.2%-ным раствором NaOH . Срок хранения раствора боргидрида натрия не более суток.

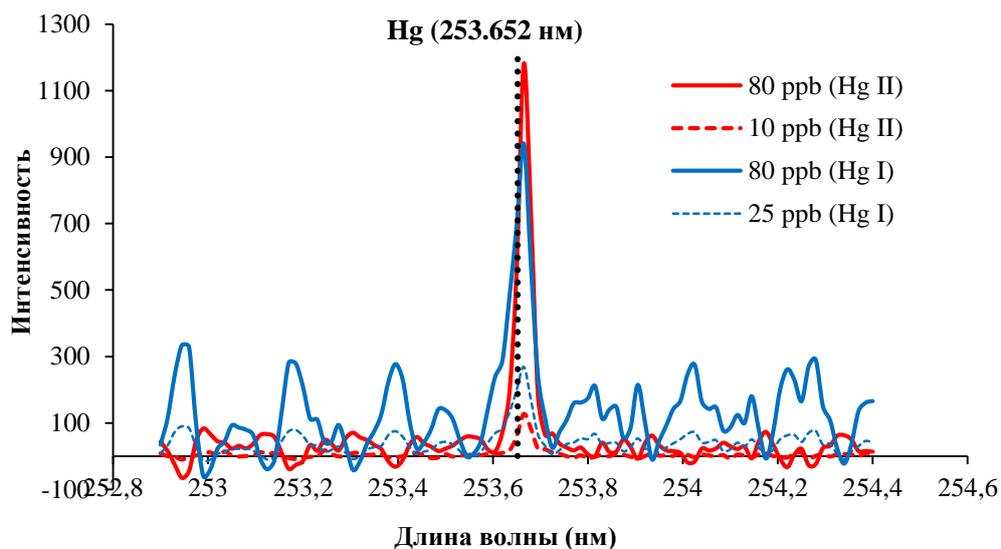


Рис. 31. Спектры растворов Hg I и II при разных концентрациях, $\lambda = 253.652$ нм.

Для гидридной генерации использовали NaBH_4 (1.5%), стабилизированный раствором NaOH (0.2%)

Т а б л и ц а 41

Инструментальные параметры работы на спектрометре

	Al	V	Fe	Co	Ni	Cu	As	Sr
* λ , нм	396.152	309.311	371.993	340.512	352.454	324.754	193.695	421.552
** t чтения, с	3	3	3	3	3	3	3	3
t забора, с	15	15	15	15	15	15	20	15
t стабилиз., с	15	15	15	15	15	15	15	15
n	3	3	3	3	3	3	3	3
***V насоса, об/мин	15	15	15	15	15	15	15	15
	Mo	Ru	Pd	Ag	Cd	Pt	Hg	Pb
λ , нм	379.825	372.803	340.458	328.068	228.802	299.796	253.652	405.781
t чтения, с	3	3	3	3	3	3	10	3
t забора, с	15	15	15	15	15	15	30	15
t стабилиз., с	15	15	15	15	15	15	20	15
n	3	3	3	3	3	3	10	3
V насоса, об/мин	15	15	15	15	15	15	15	15

Примечание: * λ – длина волны; ** t – время; ***V – скорость

2.4.2.4 Приготовление растворов. Пределы обнаружения и количественного определения. Линейность

Приготовление растворов.

Определение ртути и мышьяка с использованием метода гидридной генерации.
Для приготовления растворов Hg I и Hg II с концентрациями 1010 и 1000 ppm применяли растворы ГСО с концентрациями 1.00 и 1.01 мг/см³ в 1 М HNO₃. Аликвоту объемом 250 мкл каждого полученного раствора помещали в колбу вместимостью 250 мл, доводили раствор до метки 1 М HNO₃ и тщательно перемешивали. Для приготовления рабочих градуировочных растворов аликвоты объемом 1, 2.5, 4, 5, 8, 10 мл помещали в колбы вместимостью 100 мл, доводили до метки бидистиллированной водой, хорошо перемешивали.

Раствор As с концентрацией 100 ppm был приготовлен разбавлением раствора ГСО с концентрацией 0.1 мг/см³ в 0.01 М HCl. Аликвоту полученного раствора объемом 1 мл помещали в колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки 1 М HCl и тщательно перемешивали. Далее из полученного раствора с концентрацией 1 ppm отбирали аликвоты 2.5, 5, 10, 15, 25 в колбы на 50 мл, доводили до метки 1 М HCl и тщательно перемешивали.

Для приготовления растворов NaBH₄, стабилизированных NaOH, соответствующие навески NaBH₄ и NaOH (Табл. 42) помещали в колбу вместимостью 50 мл и тщательно перемешивали.

Т а б л и ц а 42

Состав растворов боргидрида натрия

Раствор	<i>m</i> NaBH ₄ , г	<i>m</i> NaOH, г
0.3% NaBH ₄ + 0.5% NaOH	0.15	0.25
0.4% NaBH ₄ + 0.5% NaOH	0.20	0.25
0.5% NaBH ₄ + 0.5% NaOH	0.25	0.25

Определение металлов платиновой группы (Ru, Pd, Pt). Из растворов ГСО Ru, Pd и Pt приготовили растворы металлов с концентрациями 999, 1000 и 1000 ppm разбавлением 3 М HCl. Аликвоту объемом 1 мл каждого полученного раствора помещали в колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки 3 М HCl и хорошо перемешивали. Далее отбирали аликвоты объемом 2.5, 5, 7.5, 10 мл в колбы на 100 мл, доводили до метки бидистиллированной водой. Концентрации каждого металла в полученных растворах составили 250, 500, 750, 1000 ppb. Раствор с концентрациями металлов равными НПКО готовили отдельно. Каждый рабочий градуировочный раствор и холостая проба содержали 116 ppb Sr в качестве внутреннего стандарта.

Определение Mo, Ag, Cd. Из растворов ГСО Mo, Ag и Cd приготовили растворы металлов с концентрациями 998, 1002 и 1000 ppm в 1 М HNO₃. Аликвоту объемом 1 мл каждого полученного раствора помещали в колбу вместимостью 100 мл, доводили до метки

1 М HNO₃ и хорошо перемешивали. Концентрации Mo, Ag и Cd составили 9.98, 10.02 и 10.00 ppm, соответственно. Далее от полученного раствора отбирали аликвоты 2, 4, 6, 8, 10 мл в колбы вместимостью 100 мл и доводили до метки бидистиллированной водой. Раствор с концентрациями металлов равными НПКО готовили отдельно. Каждый рабочий градуировочный раствор и холостая проба содержали 116 ppb Sr в качестве внутреннего стандарта.

Определение Co и Ni. Рабочие градуировочные растворы для Ni и Co были приготовлены независимо друг от друга, чтобы избежать спектральных наложений. Из ГСО Ni и Co получили растворы с концентрацией 1020 ppm в 1 М HNO₃, затем разбавили 1 М HNO₃ каждый из растворов до концентрации 1.02 ppm для Ni и 20.4 ppm для Co. Аликвоты объемом 0.4, 0.7, 1.3, 1.8, 2.8, 5.5 мл для Ni и 0.1, 0.5, 0.9, 1.3, 1.7, 2.5 мл для Co помещали в колбы вместимостью 50 мл, доводили объем раствора до метки бидистиллированной водой, тщательно перемешивали. Каждый рабочий градуировочный раствор и холостая проба содержали 116 ppb Sr в качестве внутреннего стандарта.

Определение Al, Fe и Pb. Из ГСО Al, Fe и Pb приготовили растворы с концентрациями 1000, 990 и 1010 ppm в 1 М HNO₃. В три колбы вместимостью 50 мл отбирали аликвоты объемом 1 мл раствора каждого металла, доводили объем до метки 1 М HNO₃, тщательно перемешивали. Концентрации полученных растворов составили 20.0 ppm для Al, 19.8 ppm для Fe и 20.2 ppm для Pb. Далее для приготовления рабочего градуировочного раствора с максимальной концентрацией аликвоты растворов Al, Fe и Pb объемом 3, 2.1 и 1.1 мл, соответственно, помещали в колбу вместимостью 50 мл, затем объем раствора доводили до метки бидистиллированной водой и хорошо перемешивали. Остальные растворы готовили аналогично. Каждый рабочий градуировочный раствор и холостая проба содержали 116 ppb Sr в качестве внутреннего стандарта.

Определение Cu и V. Рабочие градуировочные растворы готовили аналогично определению Al, Fe и Pb, за тем лишь исключением, что в конце раствор внутреннего стандарта не добавляли.

Диапазоны концентраций для градуировочных зависимостей были выбраны, исходя из данных метода ИСП-МС и ПКО для каждого металла (Табл. 43).

Уравнение зависимости отношения интенсивностей аналита к внутреннему стандарту от концентрации аналита соответствовало выражению невзвешенной линейной регрессии:

$$y = a + b \times x,$$

где x – это концентрация аналита, ppb; y – это отношение интенсивностей аналита к внутреннему стандарту.

ПО был равен отношению трехкратного стандартного отклонения аналитического сигнала фона к коэффициенту чувствительности (b) десяти измерений холостой пробы.

Предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО). Рабочие диапазоны концентраций. Линейность

	Al	V*	Fe	Co	Ni	Cu	As*	Sr
ПО, ppb	1.9	27	27	10	1.4	2.6	11	BC
ПКО, ppb	6.2	90	90	33	4.7	8.7	37	
Диапазон кон- центраций, ppb	20 – 1188	210 – 700	91 – 810	30 – 1000	16 – 117	12 – 147	50 – 300	
– a	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$-8.0 \cdot 10^1$	$3.2 \cdot 10^{-3}$	$-5.8 \cdot 10^{-3}$	$1.1 \cdot 10^{-3}$	$-3.7 \cdot 10^{-3}$	-7.4	
b	$9.1 \cdot 10^{-4}$	$2.3 \cdot 10^4$	$2.9 \cdot 10^{-4}$	$2.0 \cdot 10^{-4}$	$4.9 \cdot 10^{-4}$	$4.8 \cdot 10^{-3}$	5.1	
R ²	0.9997	0.9998	0.9999	0.9915	0.9997	0.9994	0.9989	
	Mo	Ru	Pd	Ag	Cd	Pt	Hg*	Pb
ПО, ppb	2.1	2.2	4.8	2.0	6.6	37	2.6	5.1
ПКО, ppb	6.9	7.3	16	6.6	21	124	8.6	17
Диапазон кон- центраций, ppb	20 – 998	16 – 999	64 – 1000	10 – 1002	20 – 1000	210 – 2080	10 – 81	29 – 450
– a	$6.8 \cdot 10^{-3}$	$3.0 \cdot 10^{-3}$	$1.7 \cdot 10^{-2}$	$9.2 \cdot 10^{-3}$	$4.3 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-3}$	$1.8 \cdot 10^1$	$-5.3 \cdot 10^{-4}$
b	$8.5 \cdot 10^{-4}$	$4.8 \cdot 10^{-4}$	$6.1 \cdot 10^{-4}$	$1.6 \cdot 10^{-3}$	$6.2 \cdot 10^{-4}$	$4.3 \cdot 10^{-5}$	$1.5 \cdot 10^1$	$1.1 \cdot 10^{-4}$
R ²	0.9946	1.000	0.9994	0.9930	0.9913	0.9997	0.9998	0.9997

Примечание: *без внутреннего стандарта

Рабочие диапазоны концентраций находились в интервале от 20 до 1188 ppb для Al, от 210 до 700 ppb для V, от 51 до 810 ppb для Fe, от 30 до 1000 ppb для Co, от 16 до 117 ppb для Ni, от 12 до 147 ppb для Cu, от 50 до 300 ppb для As, от 20 до 998 ppb для Mo, от 16 до 999 ppb для Ru, от 64 до 1000 ppb для Pd, от 10 до 1002 ppb для Ag, от 20 до 1000 для Cd, от 210 до 2080 ppb для Pt, от 10 до 81 для Hg, от 29 до 450 для Pb. Коэффициенты корреляции не превышали допустимого значения.

2.4.2.5 Результаты определения содержания элементных примесей методом МП-АЭС

После упаривания досуха в образец после разложения делали добавку всех элементных примесей, содержание которых лежало выше найденных ПО. Результаты определения содержания элементных примесей в анализируемом ФАВ разными методами представлены в таблице 44.

Содержание элементных примесей в (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-оле методом МП-АЭС

	Al,%	V,%	Fe,%	Co,%	Ni,%	Cu,%	As,%	Sr
ИСП-МС	$6.6 \cdot 10^{-4}$	$2.7 \cdot 10^{-6}$	$4.5 \cdot 10^{-4}$	$6.5 \cdot 10^{-8}$	$3.9 \cdot 10^{-5}$	$4.9 \cdot 10^{-5}$	$2.3 \cdot 10^{-6}$	-
МП-АЭС метод добавок	$(1.4 \pm 0.6) \times 10^{-4}$	Ниже ПО	$(4.3 \pm 0.9) \times 10^{-4}$	Ниже ПО	*	$(0.8 \pm 0.6) \times 10^{-4}$	Ниже ПО	
n	7		5		7			
МП-АЭС метод добавок + внутренний стандарт	$(1.6 \pm 0.5) \times 10^{-4}$	Ниже ПО	$(3.9 \pm 0.5) \times 10^{-4}$	Ниже ПО	$(3.2 \pm 0.7) \cdot 10^{-5}$	*	Ниже ПО	BC
n	6		5		5			
	Mo,%	Ru,%	Pd,%	Ag,%	Cd,%	Pt,%	Hg,%	Pb,%
ИСП-МС	$3.5 \cdot 10^{-8}$	$2.8 \cdot 10^{-8}$	$8.3 \cdot 10^{-8}$	$1.0 \cdot 10^{-8}$	$8.3 \cdot 10^{-7}$	$7.3 \cdot 10^{-8}$	$2.5 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^{-4}$
МП-АЭС метод добавок	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	$(5.8 \pm 1.5) \times 10^{-5}$
n								8
МП-АЭС метод добавок + внутренний стандарт	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	Ниже ПО	$(2.6 \pm 0.9) \times 10^{-5}$
n								5

Примечание: *не определено

Разработан способ определения содержания элементных примесей в ФАВ методом МП-АЭС. Оптимизированы рабочие характеристики спектрометра модели 4100. Установлены ПКО и рабочие диапазоны концентраций для каждого элемента. Содержания V, Co, As, Mo, Ru, Pd, Ag, Cd, Pt и Hg находились ниже экспериментально установленных ПО. Найдены содержания Al, Fe, Ni и Pb. Полученные результаты согласуются с данными ИСП-МС анализа.

2.5 Разработка стандартного образца предприятия (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола

2.5.1 Общие сведения о СОП

Наименование СОП: стандартный образец предприятия (СОП) состава (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ол

Назначение СОП: СОП предназначен для градуировки жидкостного хроматографа, метрологической аттестации методик выполнения измерений, основанной на жидкостной хроматографии и контроля погрешности измерений массовой доли (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола в ФАВ.

СОП может применяться для поверки и калибровки жидкостных хроматографов.

Разработчик и изготовитель: Новосибирский институт органической химии имени Н.Н. Ворожцова СО РАН (ЛФАВ, ЛМА)

2.5.2 Метрологические характеристики

Т а б л и ц а 45

Метрологические характеристики физиологически активного вещества

Аттестованная характеристика СОП	Обозначение единицы физической величины	Аттестованное значение СОП	Абсолютная погрешность аттестованного значения при P=0.95
Массовая доля (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола в ФАВ	%	99.34	1.26

Срок годности экземпляра СОП: 1 год.

2.5.3 Технические данные

ФАВ получают реакцией тиофен-2-карбальдегида и (-)-изопулегола в присутствии катализатора монтмориллонита К10. По внешнему виду соединение – желтовато-белая смесь крупнокристаллического и кристаллического порошка без характерного запаха. Соединение **1** легко растворимо в ацетоне, ацетонитриле, хлороформе и метиловом спирте; растворимо в этиловом спирте; практически не растворимо в воде.

2.5.4 Порядок применения

Общие указания, условия применения: СОП представляет собой ФАВ с содержанием (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола 99.34%. СОП расфасован в пенициллиновые флаконы вместимостью 10 см³. Масса СОП в пенициллиновом флаконе составляет не менее 1 г. Срок годности экземпляров СОП – 1 год.

Указания мер безопасности: физиологически активное соединение – нетоксичное вещество, поэтому при проведении работ следует руководствоваться общими требованиями безопасности при работе в химической лаборатории в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76.

Подготовка к применению: подготовка СОП к применению заключается в приготовлении из него основного и рабочих растворов в требуемом диапазоне концентраций путем последовательного разбавления.

При использовании метода жидкостной хроматографии аттестованной характеристикой является массовая доля (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола в СОП.

Для приготовления основного и рабочих растворов применяют следующее оборудование и реактивы:

- весы микроаналитические типа METTLER TOLEDO AT20 1-ого класса точности по ГОСТ 24104-88;
- колбы мерные 2-го класса точности по ГОСТ 1770;
- пипетки мерные 2-го класса точности по ГОСТ 29169;
- растворители.

Действительное значение концентрации приготовленного раствора рассчитывают в соответствии с процедурой приготовления. Погрешность действительного значения концентрации рассчитывают в соответствии с РМГ 60-2003.

Раствор следует хранить в колбе с притертой пробкой в течение 1 месяца при температуре 0 – 5°C.

Ампулу аккуратно вскрывают. Навеску 10 ± 0.1 мг СОП помещают в мерную колбу вместимостью 10 см³, затем доводят до метки ацетонитрилом. Получают основной раствор с массовой концентрацией 1.0 мг/см³.

Рабочие растворы в требуемом диапазоне концентраций в соответствии с используемой методикой измерений или методикой поверки СИ готовят разбавлением основного раствора. Действительное значение концентрации приготовленного раствора рассчитывают в соответствии с процедурой приготовления. Погрешность действительного значения концентрации рассчитывают в соответствии с РМГ 60-2003.

Основной раствор следует хранить в колбе с притертой пробкой в течение 1 месяца при температуре 0 – 5°C. Рабочие растворы длительному хранению не подлежат и готовятся в день применения.

Порядок применения СОП: Использование СОП для калибровки и поверки СИ проводят в соответствии с инструкциями по эксплуатации и методиками поверки этих СИ.

Использование СОП для контроля погрешности проводят в соответствии с методикой измерений.

2.5.5 Условия хранения

СОП должен храниться при комнатной температуре (20-26°C) в стеклянной таре.

2.6 Аттестация СОП состава (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола в физиологически активном соединении

2.6.1 Исследование однородности СОП

От всей партии СОП для оценивания однородности случайным образом отбирали N проб массой M_0 каждая. Масса каждой пробы M_0 должна быть достаточной для проведения в соответствии с применяемой методикой выполнения определений (МВИ) фиксированного числа измерений J.

Для оценки однородности было проанализировано десять проб (N=10) по пять параллельных определений (J=5) для каждой пробы.

Результаты определений приведены в таблице 46.

Т а б л и ц а 46

Результаты определений при оценке однородности стандартного образца предприятия

Номер пробы n	Номер результата j					\bar{X}_n Среднее значение
	1	2	3	4	5	
1	99.01	99.70	99.16	99.41	99.41	99.34
2	97.56	97.16	100.4	96.66	101.1	98.58
3	99.50	99.71	99.12	100.1	99.60	99.61
4	98.72	98.99	98.74	98.94	97.01	98.48
5	99.03	99.67	99.24	99.03	99.77	99.35
6	98.67	98.84	100.6	100.8	101.4	100.06
7	98.29	96.69	100.3	98.35	98.67	98.46
8	99.34	97.46	99.88	98.16	98.70	98.71
9	99.43	99.43	100.5	101.7	100.7	100.35
10	103.1	94.57	102.3	100.5	101.8	100.45

Вычислили по формуле (1) сумму квадратов отклонений результатов измерений от средних значений для каждой пробы.

$$SS_e = \sum_{n=1}^N \sum_{j=1}^J (X_{nj} - \bar{X}_n)^2 \quad (1)$$

$$SS_e=87.24$$

По формуле (2) нашли среднее арифметическое всех результатов \bar{X} , которое составило 99.34, и сумму квадратов $SS_H=26.66$ по формуле (3)

$$\bar{X}_n = \sum_{j=1}^J X_{nj}/J \quad (2)$$

$$SS_H = J \times \sum_{n=1}^N (\bar{X}_n - \bar{X})^2 \quad (3)$$

Вычислили средние квадраты отклонений результатов внутри проб

$$\overline{SS}_e = SS_e / [N \times (J - 1)] = 87.24 / ([10 \times (5 - 1)]) = 2.181$$

и между пробами

$$\overline{SS}_H = SS_H / (N - 1) = 26.66 / (10 - 1) = 2.962$$

Характеристику однородности оценивали по формуле (4)

$$S_H = [(\overline{SS}_H - \overline{SS}_e) \times (M_0/M)/J]^{0.5} \quad (4)$$

$$S_H = [(2.962 - 2.181) \times (3/1.5)/5]^{0.5} = 0.56\%$$

Однородность образца составила **0.56%**.

2.6.2 Вычисление метрологических характеристик СОП

Аттестованное значение массовой доли % (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола в ФАВ,

$$\text{т. е. } A_{\text{СОП}} = \overline{X}_m = 99.34$$

Погрешность аттестованного значения,

$$\text{т. е. } \Delta'_{\text{СОП}} = \Delta_A = 0.60 \text{ мас.}\%$$

Рассчитывали погрешность полученного значения (с учетом погрешности от неоднородности) по формуле (5):

$$\Delta'_{\text{СОП}} = \sqrt{\Delta_A^2 + 4S_H^2} \quad (5)$$

$$\Delta'_{\text{СОП}} = \sqrt{0.60^2 + 4 \times 0.56^2} = 1.26$$

Δ_A – погрешность метода, используемого для установления аттестованного значения СОП

$$\Delta'_{\text{СОП}} = (99.34 \pm 1.26) \text{ мас.}\%$$

Результаты записывают, оставляя не более двух цифр после запятой.

2.7 Разработка и валидация методик определения (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола в плазме крови и цельной крови крыс с применением методов экстракции сухого пятна матрицы и экстракции на модифицированном целлюлозном носителе в сочетании с ВЭЖХ-МС/МС анализом

Одним из этапов на пути к получению фармакокинетических данных является разработка и валидация АМ определения соединения **1** в различных биологических средах методом ВЭЖХ-МС/МС. Предварительно требуется разработка условий пробоподготовки для извлечения анализируемого вещества из плазмы крови и цельной крови животных. В литературном обзоре ранее были рассмотрены преимущества и недостатки имеющихся способов для пробоподготовки в биоанализе. Здесь будет проведено сравнение лишь тех способов, которые будут применены в экспериментальной части для решения задачи определения (2R,4R,4aR,7R,8aR)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2H-хромен-4-ола в плазме крови и цельной крови крыс.

Метод экстракции сухого пятна матрицы (англ. **Dried Matrix Spots, DMS**) нашел широкое распространение в фармацевтических лабораториях, из-за быстроты и простоты выполнения, а также небольшого количества плазмы крови или цельной крови требующегося для анализа. Многими авторами отмечается длительное хранение образцов, нанесенных на бумагу, при температуре окружающей среды. К одному из недостатков данного подхода можно отнести гематокрит [192, 193]. Устранить влияние гематокрита возможно, если полностью пятно, а не его часть, провести через все этапы пробоподготовки.

Современным подходом для пробоподготовки в биоанализе является экстракция на модифицированном целлюлозном носителе (англ. **Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE**) [194]. Извлечение аналита из биологических матриц объемом 10-20 мкл проводится с применением модифицированного целлюлозного носителя, что дает возможность получать готовый для анализа образец без дополнительной подготовки в виде белкового осаждения или жидко-жидкостной экстракции [195, 196].

Далее в экспериментальной части разработаны и валидированы четыре АМ определения ФАВ в плазме крови и цельной крови крыс с применением методов экстракции сухого пятна матрицы и экстракции на модифицированном целлюлозном носителе в сочетании с методом ВЭЖХ-МС/МС.

2.7.1 Реактивы

Соединение **1** получено в соответствии с методиками [1, 2]. 2-адамантиламин гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США) использовали в качестве внутреннего стандарта (Рис. 32). Для выполнения анализа в качестве растворителей применяли метанол (Merck, Германия)

и ацетонитрил (сорт 0 ос. ч., «Криохром», Россия) для ВЭЖХ. В качестве добавки в подвижную фазу вводили уксусную кислоту («Panreac», Испания). Определения проводили с использованием деионизованной воды, очищенной на установке Direct-Q 3 UV (Millipore S. A. S., Франция). На бумагу Whatman Protein Saver 903 (Sigma-Aldrich, США) наносили образцы в методе экстракции сухого пятна плазмы крови или цельной крови. Модифицированный целлюлозный носитель состоял из сорбента – золь-гель поли(капролактон-диметилсилоксан-капролактон) (PCAP-DMS-CAP) и субстрата – целлюлозы.

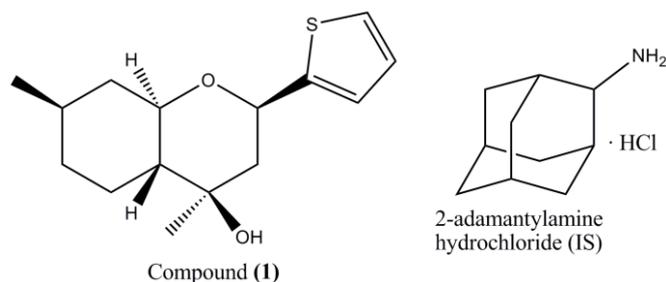


Рис. 32. Химическая структура исследуемого соединения(2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола и внутреннего стандарта – 2-адамантиламин гидрохлорида

2.7.2 Приготовление растворов

2.7.2.1 Рабочие растворы

Исходный раствор соединения **1** с концентрацией 1.0 мг/мл был приготовлен растворением точной навески вещества в 100%-ном метаноле. Рабочие градуировочные растворы получали разбавлением приготовленного ранее исходного раствора. Концентрации (мкг/мл) после разбавления составили 0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20 и 50. Для приготовления раствора внутреннего стандарта с концентрацией 2.0 мкг/мл точную навеску 2-адамантиламин гидрохлорида растворили в 100%-ном ацетонитриле и метаноле для DMS и FPSE экспериментов, соответственно. Растворы контроля качества готовили аналогичным образом. При этом полученные концентрации (мкг/мл) составили 0.6 (нижний, н.), 2.5 (средний, с.), 40 (верхний, в.) для DMS и плазма-FPSE экспериментов. Так как ПКО для кровь-FPSE эксперимента был равен 50 мкг/мл, концентрации (мкг/мл) для растворов контроля качества были скорректированы и соответствовали значениям 1.5 (н.), 2.5 (с.) и 40 (в.). Все растворы хранили при температуре -18°C . Перед пробоподготовкой температуру растворов доводили до температуры окружающей среды.

2.7.2.2 Приготовление спайк-растворов

Анализируемые градуировочные спайк-растворы и спайк-растворы контроля качества были приготовлены смешиванием 50 мкл индивидуального рабочего раствора и 450 мкл крысиной плазмы крови или цельной крови. Концентрации (нг/мл) градуировочных спайк-растворов составили 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 в DMS, плазма-FPSE экспериментах и 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 в кровь-FPSE эксперименте. Спайк-растворы контроля качества имели концентрации (нг/мл) 60 (н.), 2500 (с.), 4000 (в.) в DMS, плазма-FPSE экспериментах и 150 (н.), 2500 (с.), 4000 (в.) в кровь-FPSE эксперименте.

2.7.3 Пробоподготовка

2.7.3.1 Механизм экстракции

Стоит подчеркнуть, что в настоящее время отсутствует эффективная технология пробоподготовки образцов при определении ФАВ, ФС и ЛП в цельной крови. При проведении разработки АМ для ФК и ФД исследований зачастую необходимо получение плазмы или сыворотки из цельной крови путем центрифугирования. Впоследствии плазма или сыворотка подвергается осаждению белка перед применением. Единственным доступным методом, с помощью которого возможно выполнять пробоподготовку цельной крови, не превращая ее в плазму или сыворотку, является метод сухих пятен крови.

Бумага для метода DPS/DBS состоит из чистой целлюлозы (Рис. 33 а). Как видно из химической структуры целлюлозы, лишь поверхностные гидроксильные функциональные группы взаимодействуют с целевыми аналитами. В дополнение к плохим межмолекулярным взаимодействиям бумага для метода DBS не позволяет наносить образцы цельной крови объемом более 40 мкл.

Недостатки метода DBS решены в методе FPSE. Диски для метода FPSE представляют собой целлюлозный субстрат, который связан с высокоэффективным органическим/неорганическим полимером через поверхностные гидроксильные группы (Рис. 33 б), при этом улучшается селективность и эффективность экстракции аналитов. В данном исследовании диски FPSE были использованы как материал для микроэкстракции. Этот режим позволяет избирательно извлекать целевые аналиты, устраняя помехи матрицы. В отличие от DBS, метод FPSE позволяет отбирать пробы и готовить образцы любого объема цельной крови, а также устраняет влияние гематокрита.

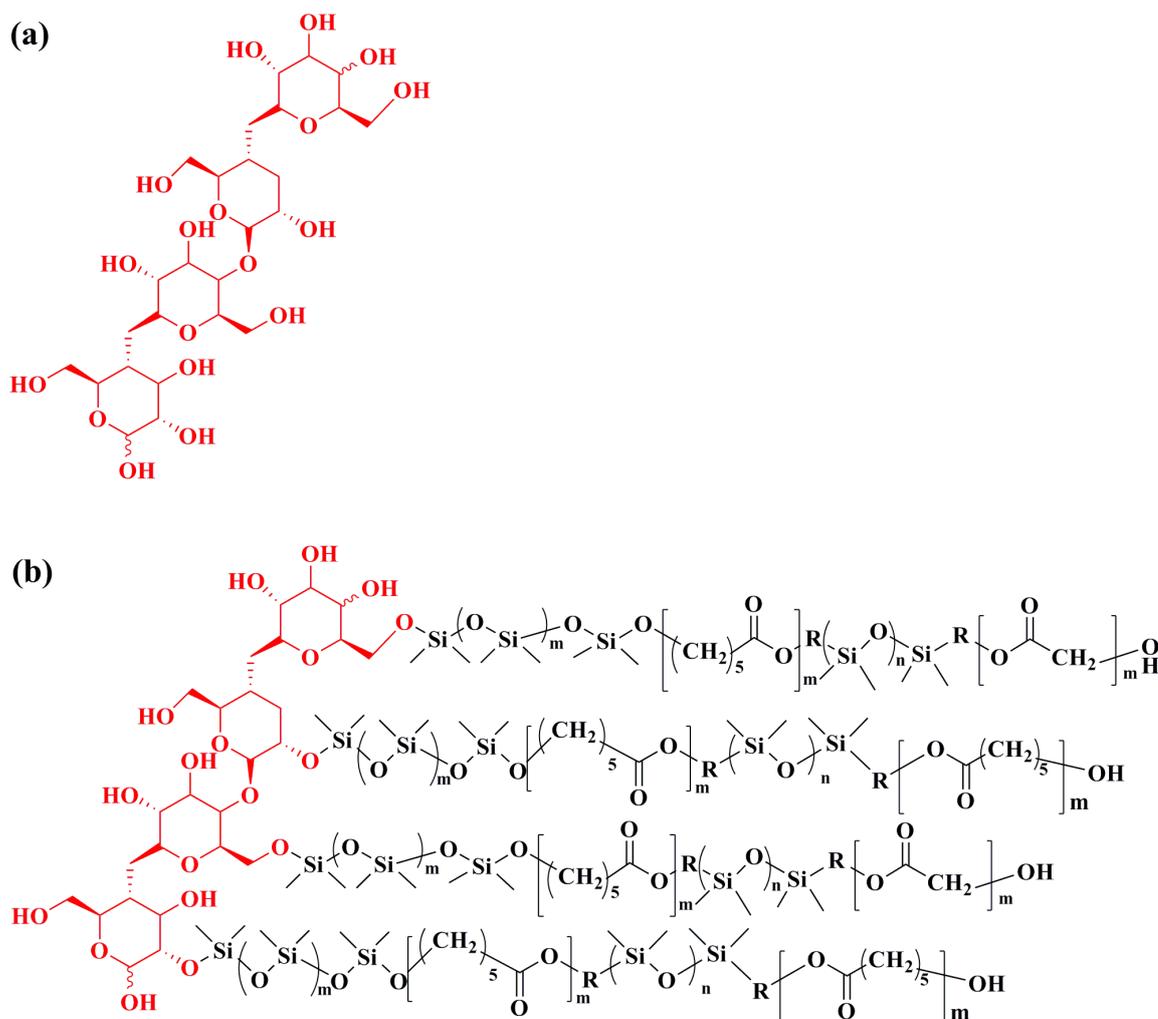


Рис. 33. Химическая структура бумаги для метода сухого пятна матрицы (a) и модифицированного целлюлозного носителя (b)

2.7.3.2 Растровая электронная микроскопия в сочетании с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией для исследования свойств экстракционных материалов

Морфологию и элементный анализ материалов для методов экстракции сухого пятна матрицы и экстракции на модифицированном целлюлозном носителе изучали с применением растровой электронной микроскопии (РЭМ) в сочетании с методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭРС). Как можно видеть на рисунке 34 (a), бумага для DPS/DBS является очень пористой с взаимопроникающими волокнами в слоистую структуру. Непокрытая целлюлозная ткань отличается также пористой структурой с характерными связанными микрофибриллами (Рис. 34 b). Снимок материала для FPSE, состоящий из целлюлозы и полимера поли(капролактон-диметилсилоксан-капролактон)а (PCAP-DMS-CAP), полученный с использованием золь-гель метода, представлен на рисунке 34 (c). Очевидно, что полимер создает более плотное покрытие вокруг целлюлозных микрофибрилл.

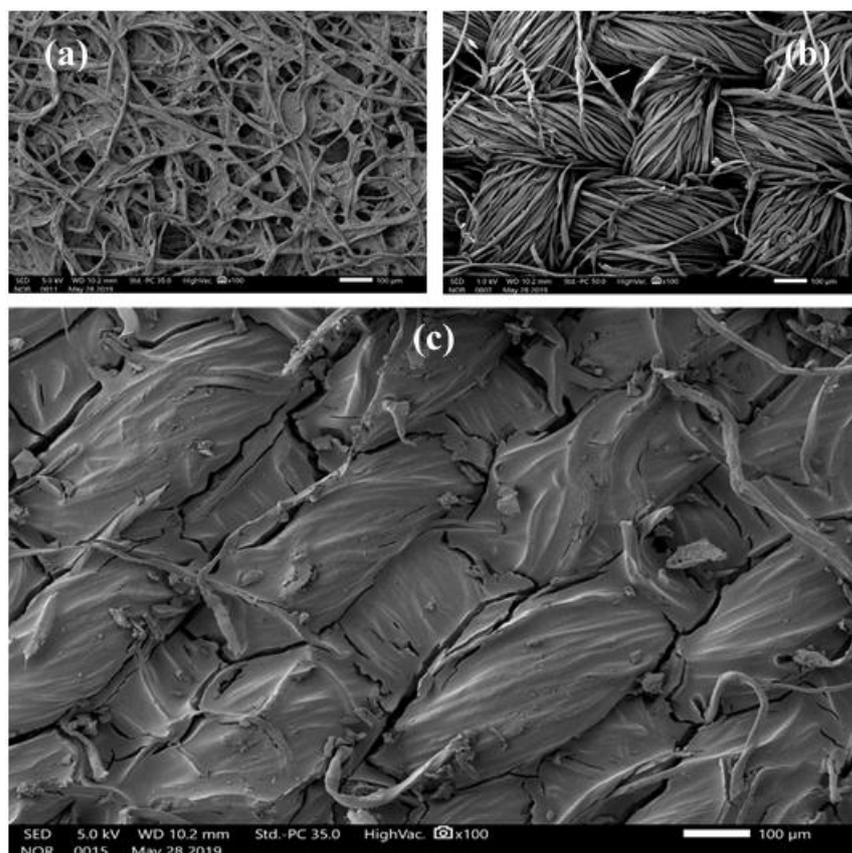


Рис. 34. Снимок электронного микроскопа. Бумага для DPS/DBS (а);
непокрытая целлюлозная ткань для FPSE (b); покрытая целлюлозная ткань для FPSE (с)

Результаты элементного анализа суммированы в таблице 47. Исходя из химической структуры целлюлозы, можно сказать, что она обильно покрыта ОН-группами и, как следствие, является гидрофильной. Как известно, целлюлозная бумага обладает низкой аффинностью по отношению к органическим соединениям и поэтому абсолютно оправдано использовать ее для фильтрования. Как и следовало ожидать, элементный состав бумаги для DMS и непокрытой целлюлозной ткани весьма схож, высок процент содержания кислорода, что обусловлено обилием гидроксильных групп. Состав же покрытой целлюлозной ткани отличается и благодаря введению полимера обеспечивается весь спектр межмолекулярных взаимодействий, включая дисперсию Лондона, водородные связи, диполь-дипольные взаимодействия с целевыми аналитами, что приводит высокоселективному микроэкстракционному процессу.

Т а б л и ц а 47

Элементный анализ экстракционных материалов

Экстракционная среда	%, Углерод	%, Кислород	%, Кремний
DBS	45.07	54.93	0
Непокрытая целлюлозная ткань	46.21	53.79	0
Покрытая целлюлозная ткань	58.76	21.96	19.28

2.7.3.3 Загрузочная емкость и воспроизводимость золь-гель процесса

Загрузка сорбента на единицу площади и воспроизводимость золь-гель процесса являются двумя наиболее важными характеристиками для FPSE материала, поскольку первая определяет способность удерживать аналит(ы), а последняя отвечает за воспроизводимость и однородность покрытия целлюлозы. Для оценки этих характеристик было приготовлено 5 партий FPSE-PCAP-PDMS-PCAP на кусочке целлюлозной ткани 15×10 см. Начальную массу очищенной целлюлозной ткани и конечную массу после золь-гель процесса измеряли гравиметрически с использованием калиброванной весовой шкалы. Средняя загрузка сорбента была рассчитана как 6.14 мг/см² с коэффициентом дисперсии ~ 3% (n = 5). Поскольку золь-гель процесс нанесения покрытия представляет собой химически контролируемую реакцию, покрытие очень воспроизводимо, о чем свидетельствует низкий коэффициент дисперсии.

2.7.3.4 Метод экстракции сухого пятна плазмы крови или цельной крови

Аликвоту объемом 20 мкл спайк-раствора наносили на бумагу. Образцу давали высохнуть при комнатной температуре в течение 2-х часов. Пятно образца плазмы крови или цельной крови вырезали и помещали в чистую пробирку типа Эппендорф вместимостью 2 мл. Аликвоту объемом 400 мкл раствора внутреннего стандарта в ацетонитриле с концентрацией 2.0 мкг/мл добавляли в каждую пробирку. Далее встряхивали при 1400 об/мин в течение 30 мин и центрифугировали при 13400 об/мин в течение 10 мин. Экстрагировали вещество при + 25°C. Полученный экстракт собирали в чистую пробирку вместимостью 1.5 мл и выпаривали досуха. Остаток, содержащий аналит и внутренний стандарт, растворяли в 100 мкл 50%-ного водного раствора метанола, далее встряхивали в течение 30 мин и центрифугировали. Супернатант переносили в хроматографическую виалу и анализировали.

2.7.3.5 Экстракция на модифицированном целлюлозном носителе

Перед анализом FPSE-диски проходили этап очистки в соответствии с протоколом. Аликвоту объемом 20 мкл спайк-раствора разбавляли 280 мкл физраствора (0.9%-ный раствор NaCl). Очищенный FPSE-диск диаметром 4 мм помещали в приготовленный раствор. Экстракцию проводили при 1400 об/мин и + 25°C в течение 30 мин. После экстракции диск переносили в чистую пробирку, предварительно убрав остатки раствора безворсовой салфеткой. Далее 50 мкл раствора 2-адамантиламин гидрохлорида в метаноле с концентрацией 2.0 мкг/мл в качестве внутреннего стандарта добавляли в каждую пробирку. Обратную экстракцию выполняли при 1400 об/мин и + 25°C в течение

30 мин. Далее пробирку с FPSE-диск и раствором после обратной экстракции центрифугировали при 13400 об/мин в течение 10 мин. Диск удаляли, экстракт собирали в чистую пробирку и разбавляли 50 мкл деионизованной воды. Полученный раствор перенесли в виалу и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

2.7.4 Оборудование и условия ВЭЖХ-МС/МС анализа

Определение соединения **1** проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC-20AD Prominence с термостатируемым автосэмплером при +10°C (Shimadzu, Япония) и масс-спектрометре 3200 QTRAP с электроспреей ионизацией (AB Sciex, США).

Разделение соединения **1** и внутреннего стандарта выполняли на термостатируемой колонке ProntoSil-120-5-C18 AQ (2.0×75 мм, 5.0 мкм частицы) («ЭкоНова», Новосибирск, Россия) при +35°C. Подвижная фаза состояла из 0.1%-ного раствора муравьиной кислоты в воде (элюент А) и 0.1%-ного раствора муравьиной кислоты в метаноле (элюент Б). Соединения элюировали в градиентном режиме: 0 мин – 3% (Б); 0.5 мин – 3% (Б); 4 мин – 95% (Б); 6.5 мин – 100% (Б); 9 мин – 100% (Б); 9.1 мин – 3% (Б); 12 мин – 3% (Б). Скорость подвижной фазы была равна 200 мкл/мин.

Масс-спектрометрическая детекция велась в области положительных ионов в режиме MRM (англ. **M**ultiple **R**eaction **M**onitoring). Для аналита и внутреннего стандарта оптимизированы параметры работы масс-спектрометра: IS = 5500 В, TEM = +400°C, CUR, GS1, GS2 = 30 psi, CAD = средний, dwell time = 80 мсек. Потенциалы ионизации, энергии диссоциации молекул, MRM-переходы и другие параметры соединений представлены в таблице 48. Запись хроматограмм проводилась с применением программного обеспечения Analyst 1.6.2 (AB SCIEX, США), обработка данных выполнялась с использованием программного обеспечения MultiQuant 2.1 (AB SCIEX, США).

Т а б л и ц а 48

Параметры соединения **1** и внутреннего стандарта

Основной ион (m/z)	Фрагментный ион (m/z)	DP (V)	CE (V)	EP (V)	СХР
Соединение 1 (284.5)	137.2 (количественный)	16	21	3.5	4
	157.4 (качественный)	16	19	3.5	4
Внутренний стандарт (152.3)	93.1 (количественный)	41	33	7.5	4
	107.2 (качественный)	46	33	6.5	4

2.7.5 Разработка методики определения соединения **1** в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС/МС

При анализе раствора соединения **1** (10 мкг/мл, 80%-ный водный раствор метанола с добавлением 0.1%-ной муравьиной кислоты) методом прямого ввода с применением + Q₁ режима (без фрагментации) в масс-спектре образца наблюдали образование двух

ионов с m/z 267.5 и 284.5. Первый ион, очевидно, соответствовал образованию протонированной формы соединения **1** $[M + H]^+$, а второй – аддукту $[M + H_2O + H]^+$ (Рис. 35). Достаточно интенсивный ион с m/z 249.4 является продуктом *in-source* фрагментации молекулярного иона $[M + H]^+$ с потерей молекулы воды.

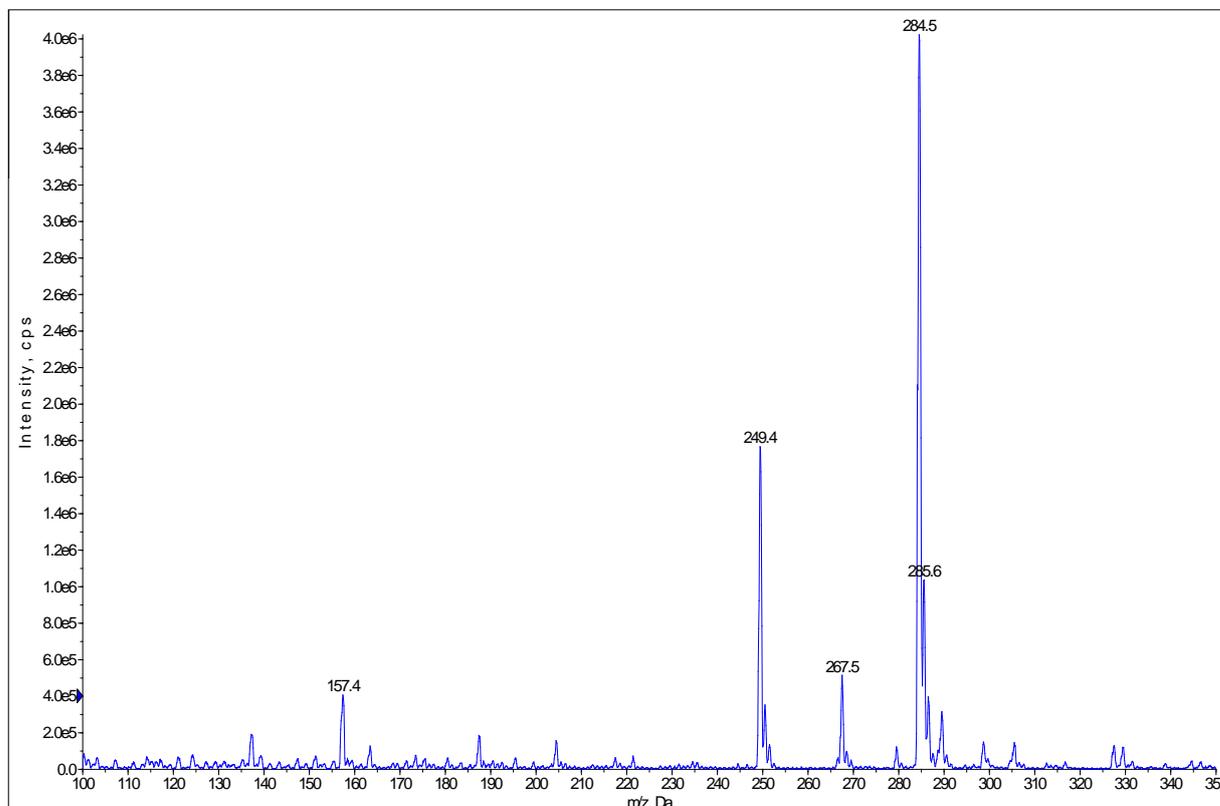


Рис. 35. Масс-спектр соединения **1** в +Q1 режиме (без фрагментации)

При фрагментации молекулярного иона с m/z 267.5 наблюдали образование трех осколочных ионов с m/z 137.2, 111.1 и 85.1. Кроме того, также присутствовал осколок с m/z 249.5 (Рис. 36).

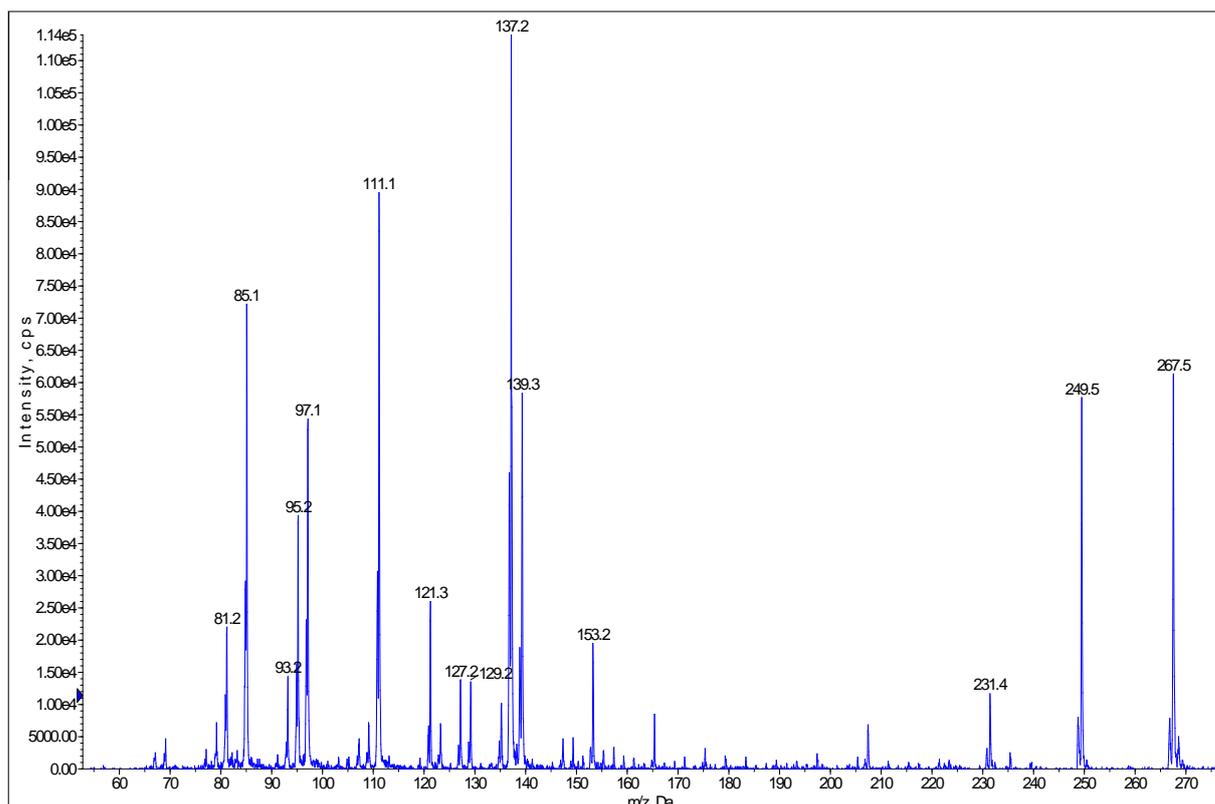


Рис. 36. Масс-спектр фрагментации молекулярного иона с m/z 267.5

В результате фрагментации молекулярного иона с m/z 284.5 образовался схожий набор осколков, за исключением осколка с m/z 157.4 (Рис. 37). Поскольку общая интенсивность, как исходного молекулярного иона, так и фрагментов в данном случае выше, чем при фрагментации иона с m/z 267.5, для работы были выбраны переходы с m/z 284.5→137.2/157.4/221.5, для которых были оптимизированы параметры детектирования. При последующем анализе образцов соединения **1** было обнаружено, что переход с m/z 284.5→221.5 имеет наименьшую интенсивность из трех приведенных, поэтому он был исключен из метода детектирования.

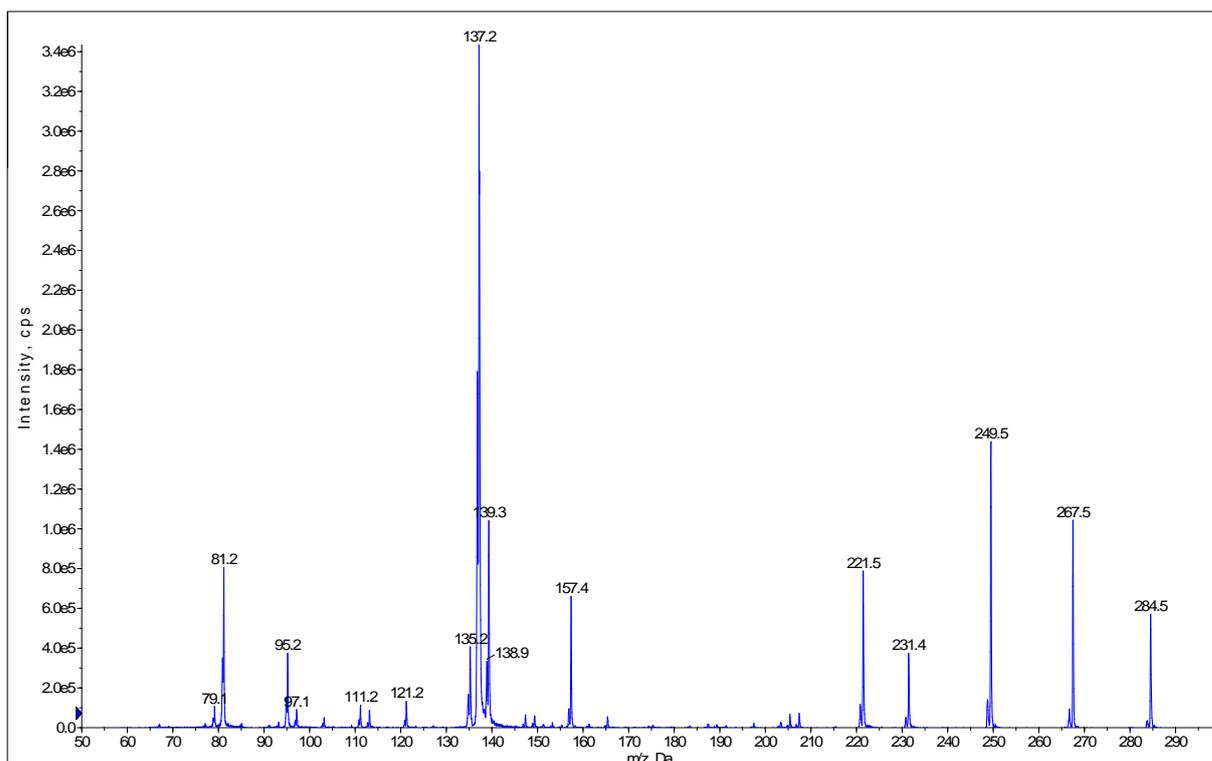


Рис. 37. Масс-спектр фрагментации молекулярного иона m/z 284.5

Параметры детектирования для внутреннего стандарта были оптимизированы ранее при разработке методики определения камфецина в цельной крови крыс [163].

Состав подвижной фазы, температура колонки и метод элюирования подбирали таким образом, чтобы обеспечить разделение пиков вещества и внутреннего стандарта, стабильный отклик детектора, приемлемую симметрию пиков и эффективность.

2.7.6 Валидация биоаналитической методики

Разработанная методика была валидирована в соответствии с параметрами: специфичность, ПО и ПКО, линейность, правильность, прецизионность, стабильность растворов, перенос и извлечение аналита из матрицы.

2.7.6.1 Специфичность

Специфичность методики – это доказательство того, что аналит может быть определен в смесях и различных матрицах без помех от других компонентов смеси и влияния матрицы. Специфичность методики оценивали сравнением хроматограмм образцов плазмы крови или цельной крови (холостая проба без аналита и внутреннего стандарта) с образцами плазмы крови или цельной крови, содержащими аналит и внутренний стандарт, после различных способов пробоподготовки.

С целью подтверждения специфичности методики сравнивали хроматограммы холостого образца плазмы крови (Рис. 38) и образца плазмы крови с концентрацией аналита

20 нг/мл (на уровне ПКО) (Рис. 39) после обработки методом экстракции сухого пятна плазмы. Время удерживания аналита составило 7.28 мин. На хроматограммах холостого и испытуемого образцов присутствовал пик вещества со временем удерживания 7.48 мин. Следует подчеркнуть, что посторонний пик наблюдался на количественном MRM-переходе, поэтому m/z 284.5→157.4 (качественный MRM-переход) может быть использован для определения аналита. Кроме этого, разрешение между пиком аналита и со-экстрагирующимся веществом было более 1.5 (критерий разделения пиков на уровне базовой линии). На MRM-переходах m/z 152.3→93.1/107.2 холостого образца плазмы крови (Рис. 40) и образца плазмы крови с внутренним стандартом (Рис. 41) отсутствовали пики посторонних соединений. Время удерживания внутреннего стандарта соответствовало 6.42 мин.

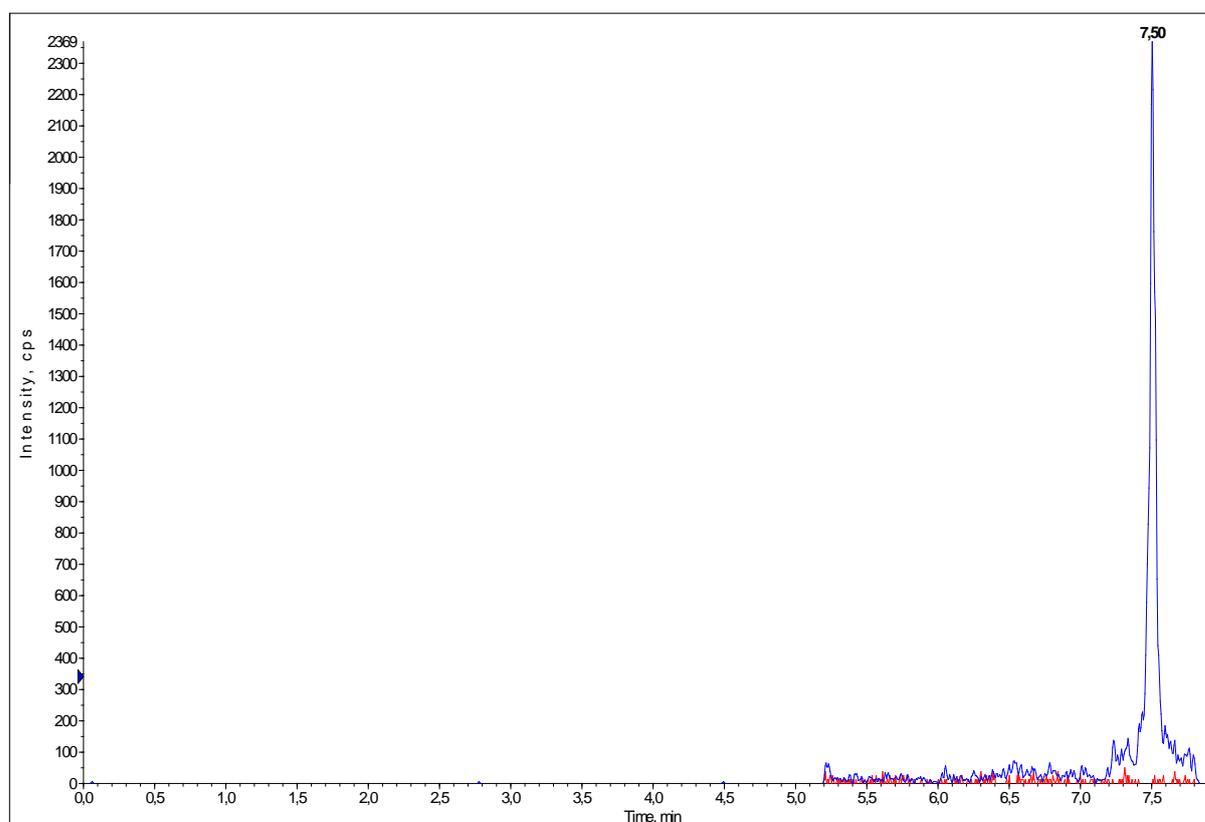


Рис. 38. Хроматограмма холостого образца плазмы крови после обработки методом экстракции сухого пятна плазмы (переходы m/z 284.5→137.2/157.4)

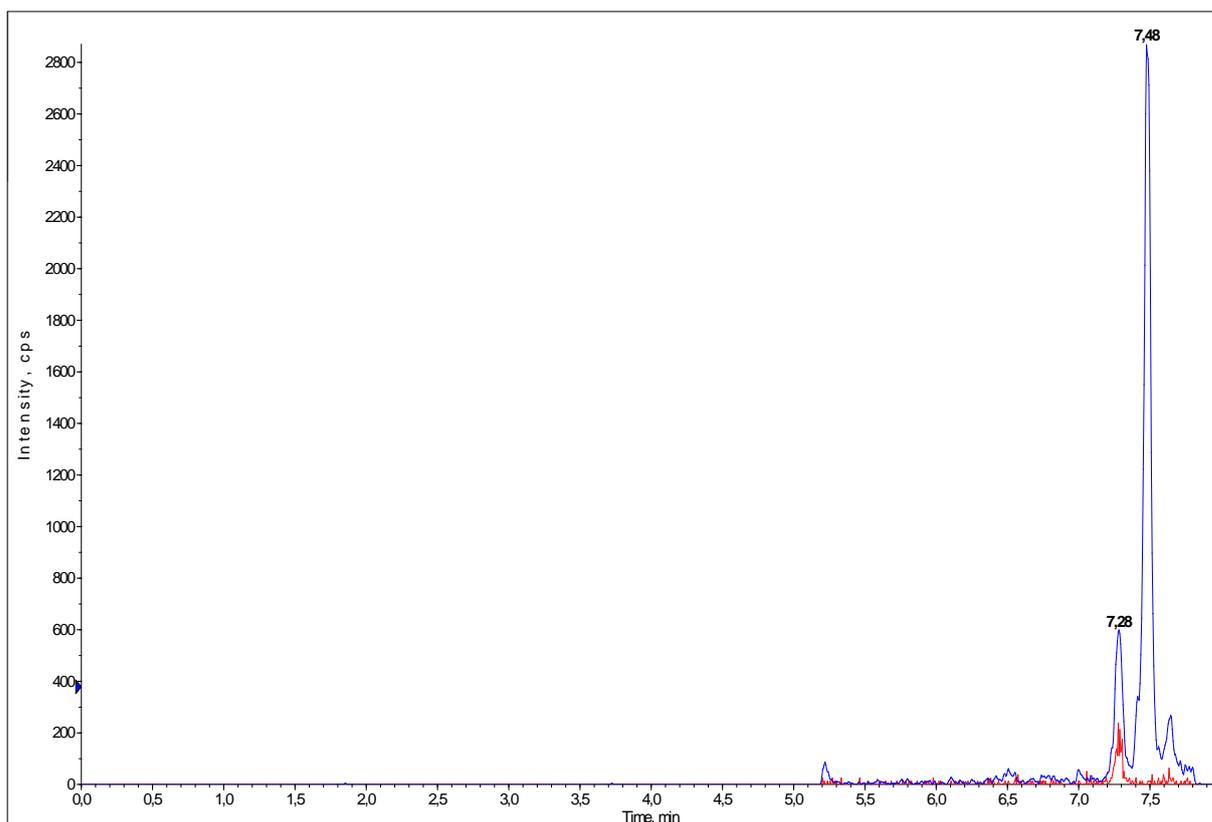


Рис. 39. Хроматограмма образца плазмы крови с концентрацией соединения **1** 20 нг/мл после обработки методом экстракции сухого пятна плазмы (переходы m/z 284.5→137.2/157.4)

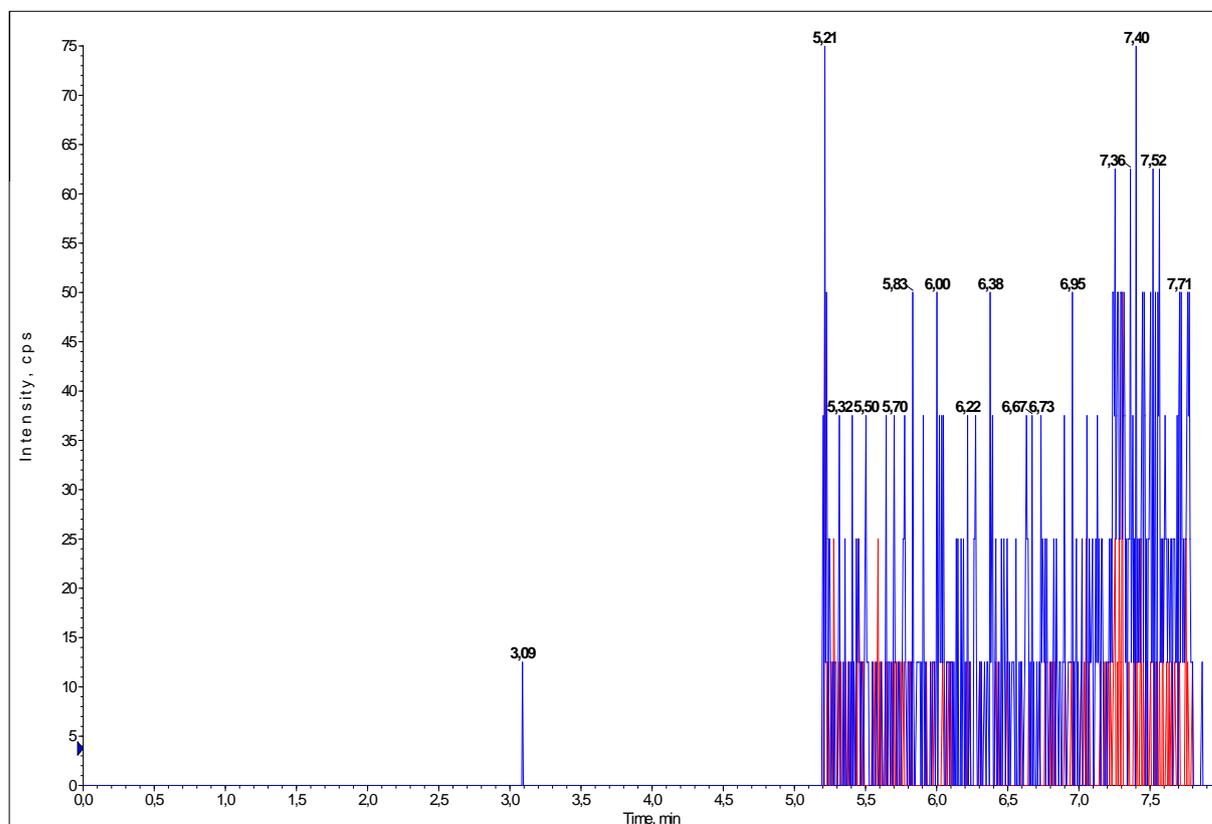


Рис. 40. Хроматограмма холостого образца плазмы крови после обработки методом экстракции сухого пятна плазмы (переходы внутреннего стандарта m/z 152.3→93.1/107.2)

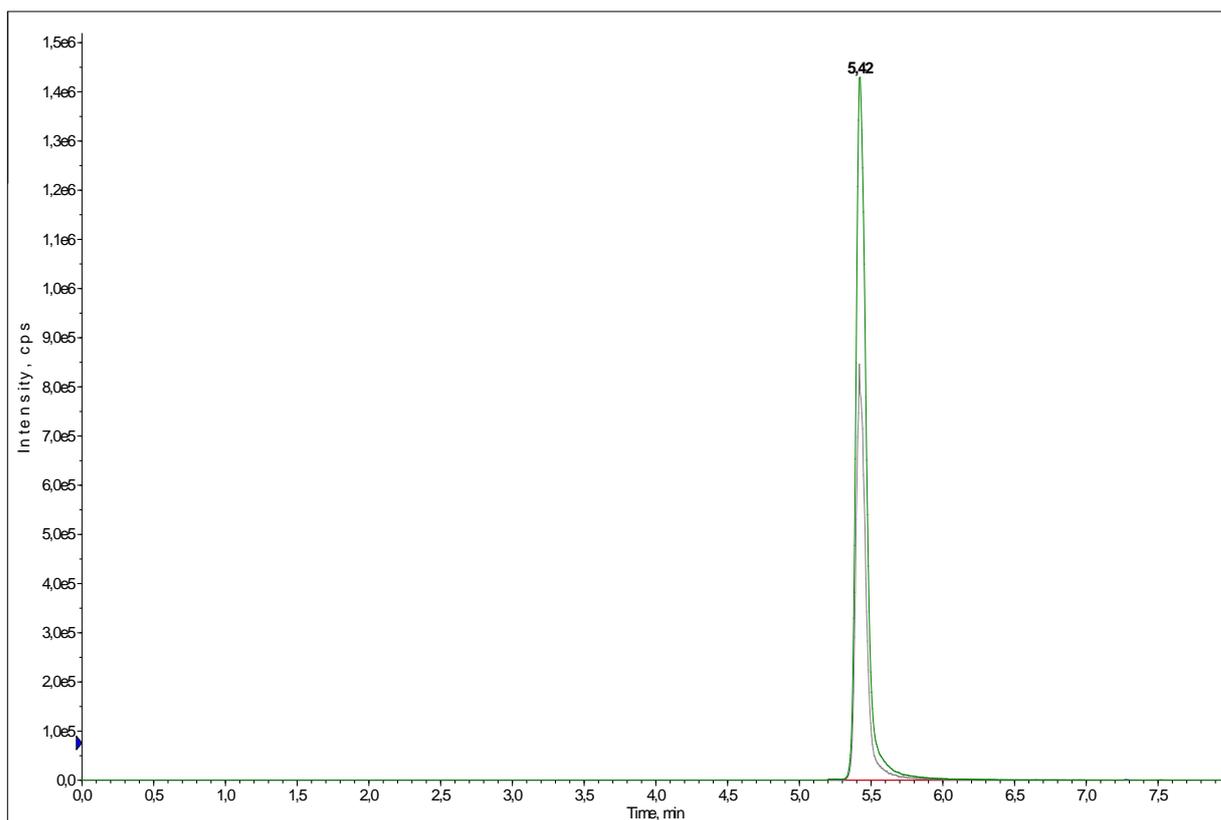


Рис. 41. Хроматограмма образца плазмы крови с внутренним стандартом после обработки методом экстракции сухого пятна плазмы (переходы внутреннего стандарта m/z 152.3→93.1/107.2)

При анализе образцов цельной крови после обработки методом экстракции сухого пятна крови также наблюдали пик со-экстрагирующегося соединения со временем удерживания близким к времени удерживания аналита на количественном MRM-переходе (Рис. 42, 43). Определение аналита в плазме крови или цельной крови крыс после обработки методом DMS далее проводили с применением качественного MRM-перехода. Для внутреннего стандарта на переходах 152.3→93.1/107.2 отсутствовали пики посторонних соединений (Рис. 44, 45).

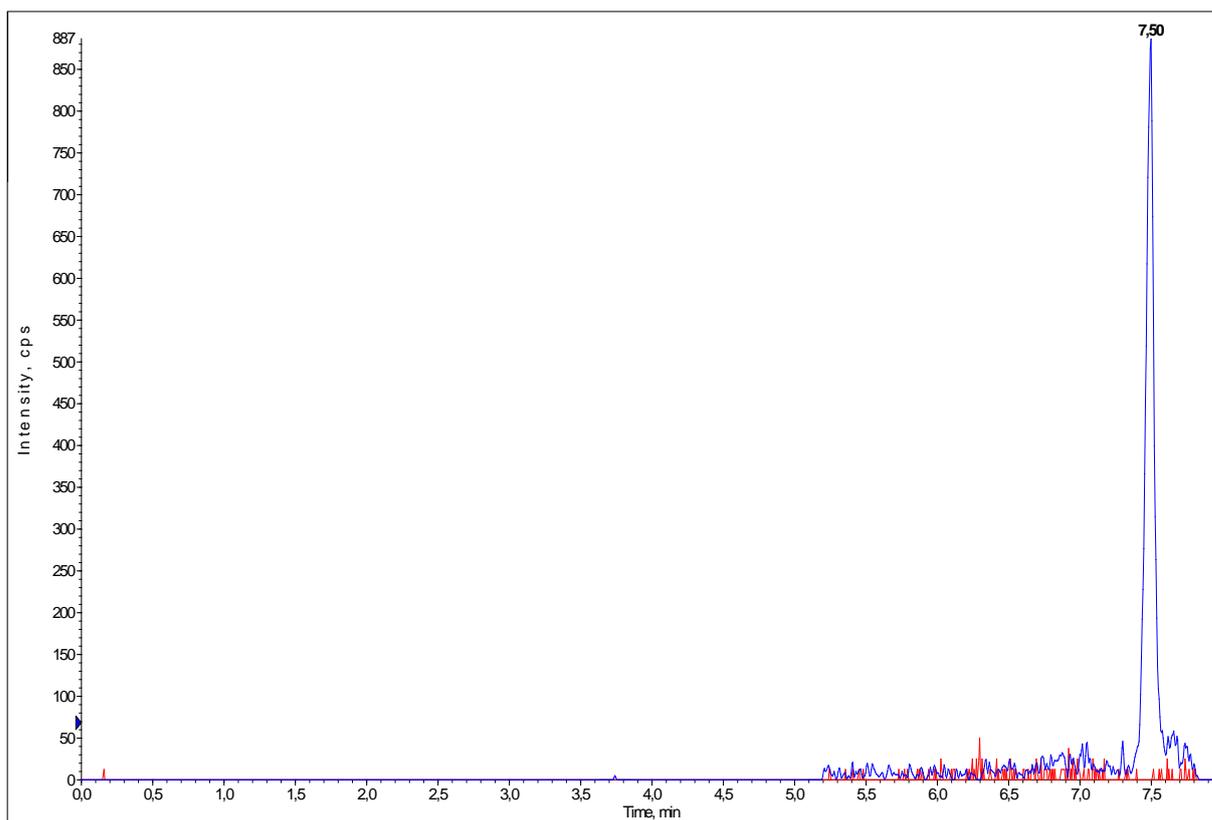


Рис. 42. Хроматограмма холостого образца цельной крови после обработки методом экстракции сухого пятна крови (переходы m/z 284.5→137.2/157.4)

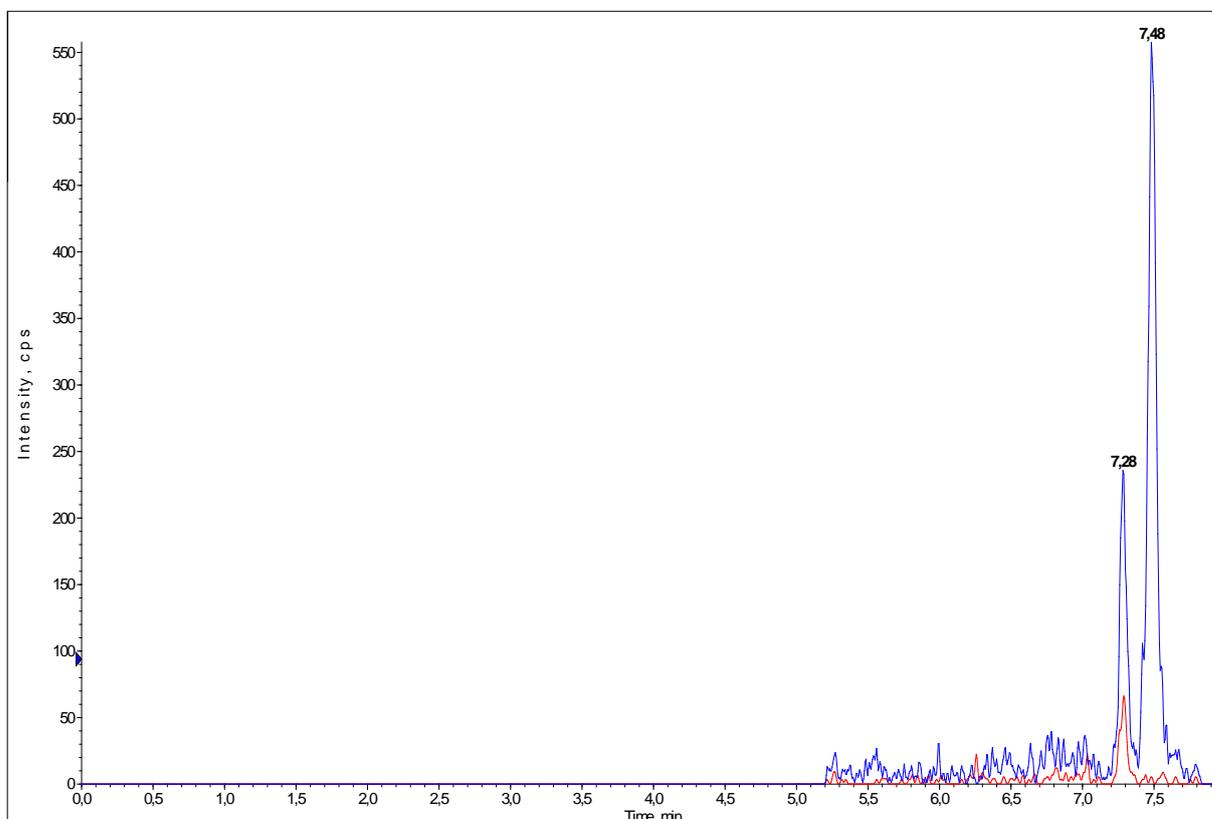


Рис. 43. Хроматограмма образца цельной крови с концентрацией аналита 20 нг/мл после обработки методом экстракции сухого пятна крови (переходы m/z 284.5→137.2/157.4)

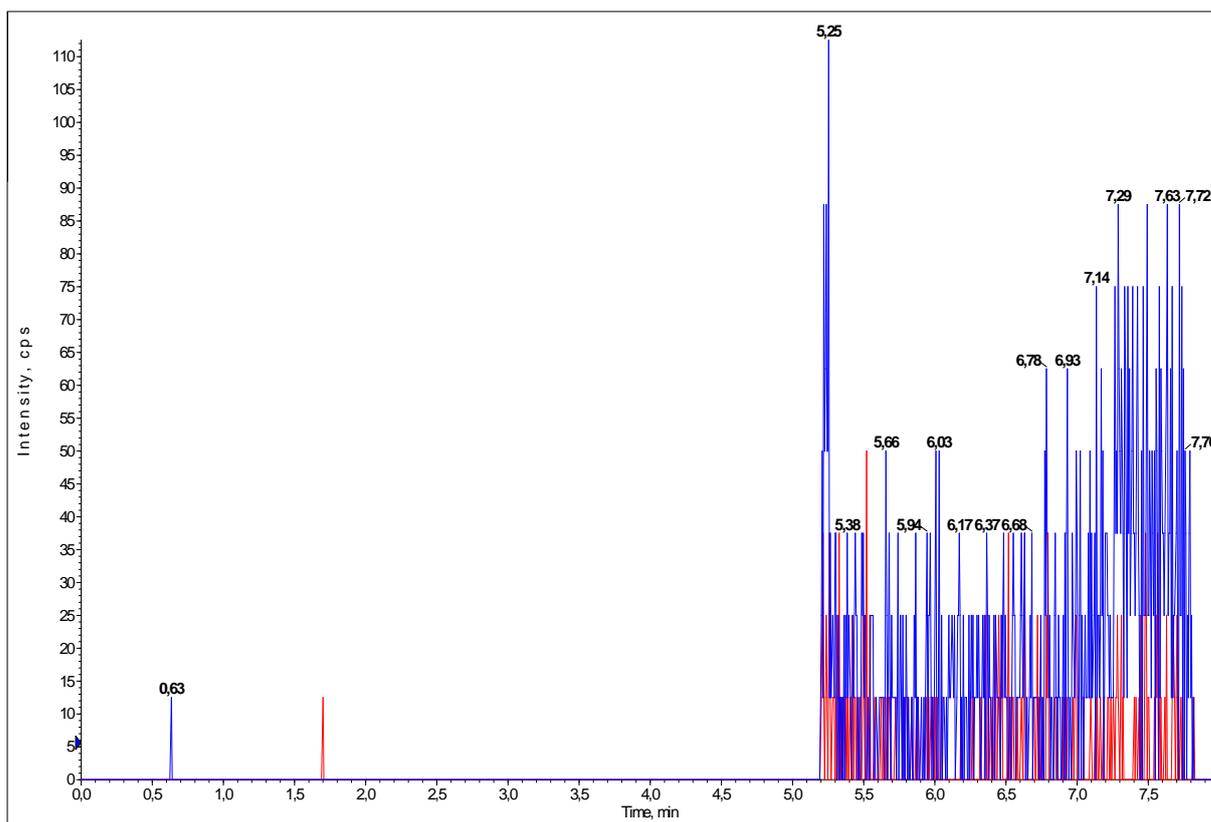


Рис. 44. Хроматограмма холостого образца цельной крови после обработки методом сухого пятна крови (переходы внутреннего стандарта m/z 152.3→93.1/107.2)

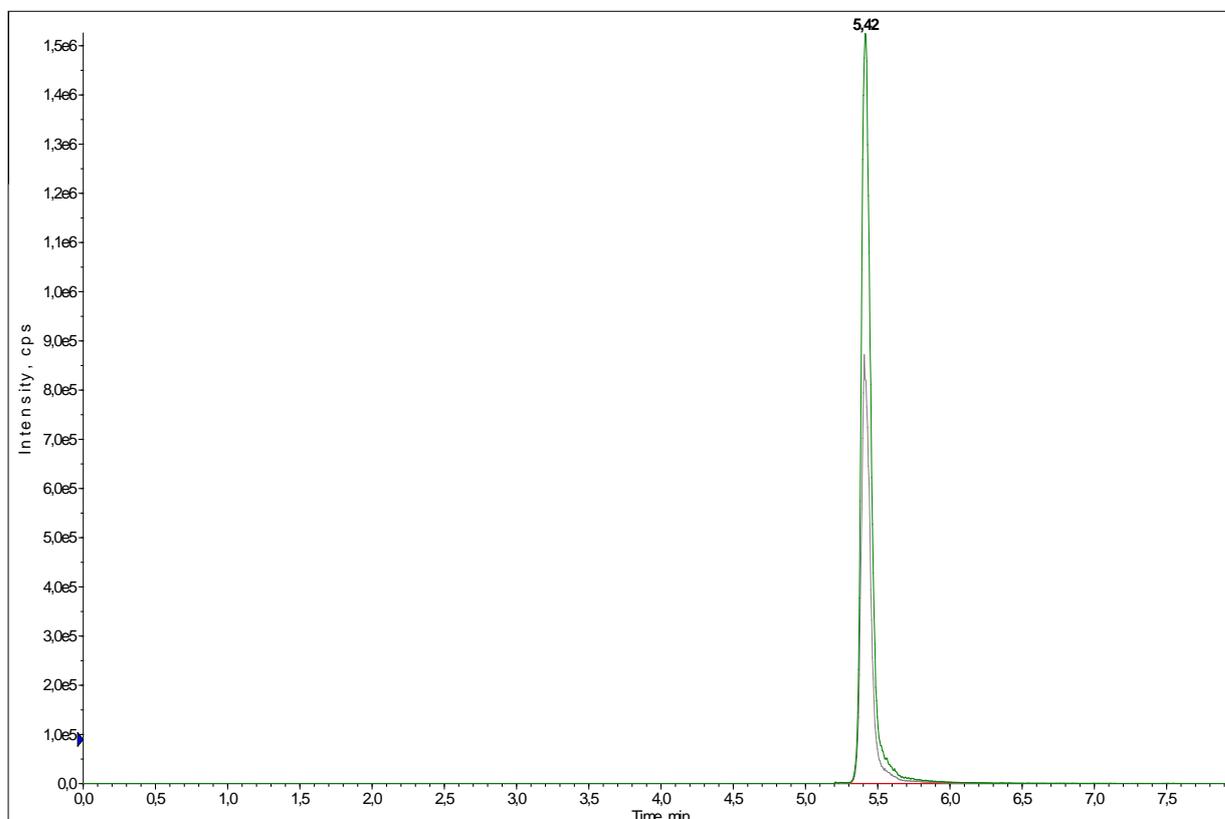


Рис. 45. Хроматограмма образца цельной крови с внутренним стандартом после обработки методом экстракции сухого пятна крови (переходы внутреннего стандарта m/z 152.3→93.1/107.2)

Хроматограммы холостого образца плазмы крови или цельной крови после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе не содержали посторонних пиков (Рис. 46, 50). Хроматограммы образцов плазмы крови и цельной крови с концентрациями 20 и 50 нг/мл (на уровне ПКО) имели один пик, который по времени удерживания, соответствовал анализируемому соединению (Рис. 47 и 51, соответственно). На рисунках 48, 49 и 52, 53 представлены хроматограммы холостого, испытуемого образцов плазмы крови и цельной крови на MRM-переходах внутреннего стандарта после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе, соответственно.

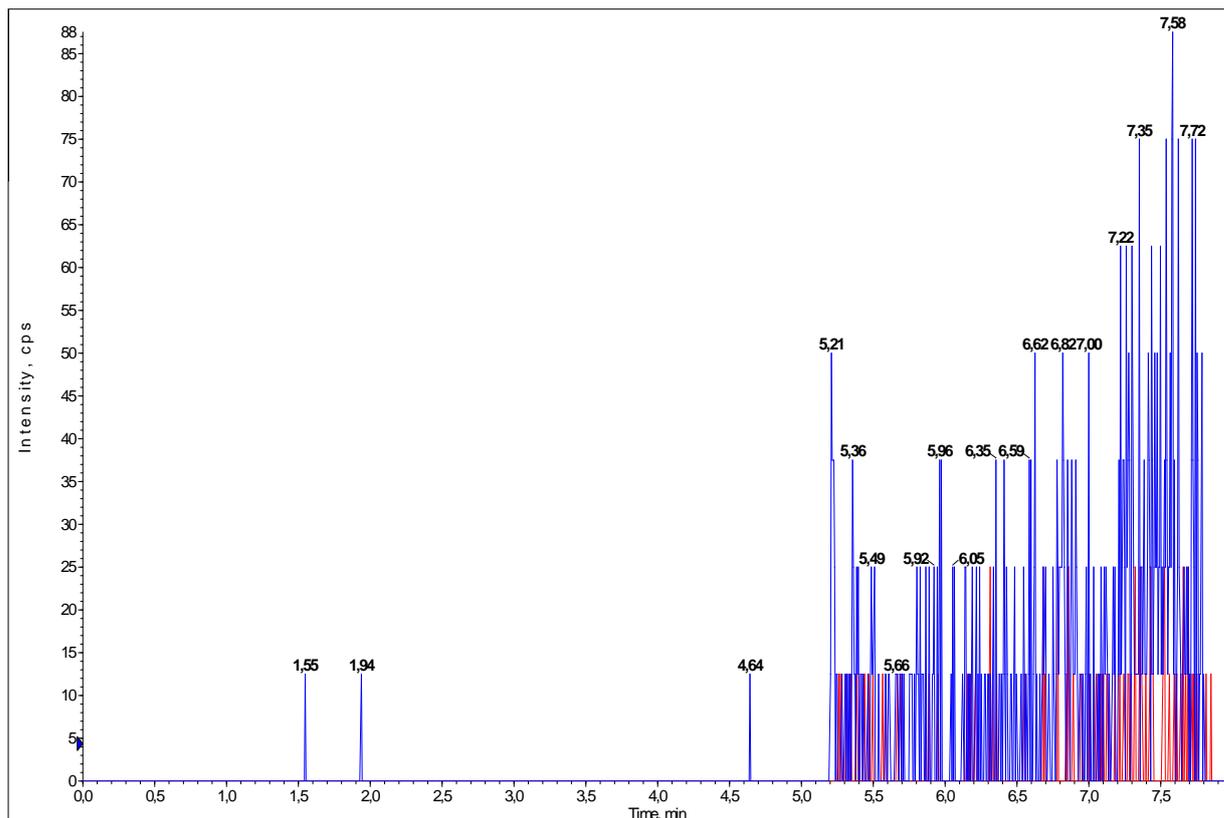


Рис. 46. Хроматограмма холостого образца плазмы крови после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе (переходы m/z 284.5→137.2/157.4)

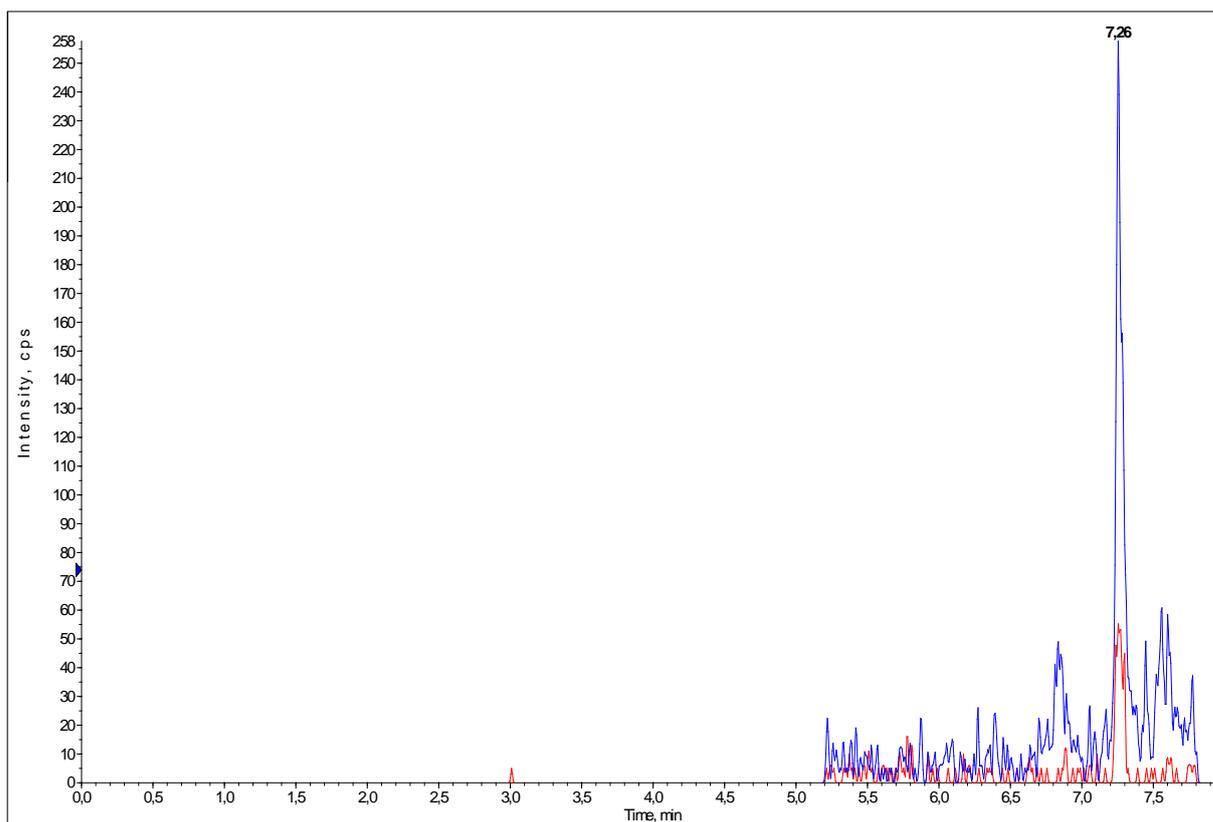


Рис. 47. Хроматограмма образца плазмы крови с концентрацией аналита 20 нг/мл после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе (переходы m/z 284.5→137.2/157.4)

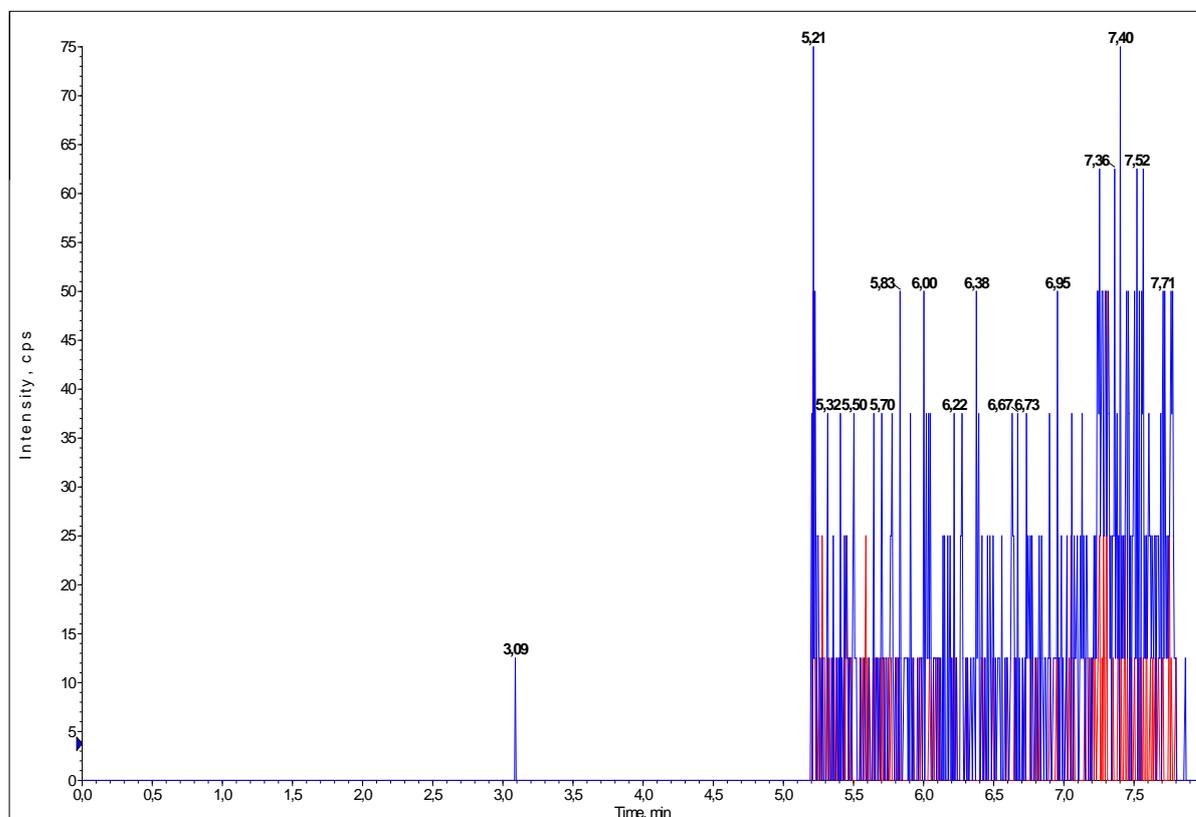


Рис. 48. Хроматограмма холостого образца плазмы крови после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе (переходы внутреннего стандарта m/z 152.3→93.1/107.2)

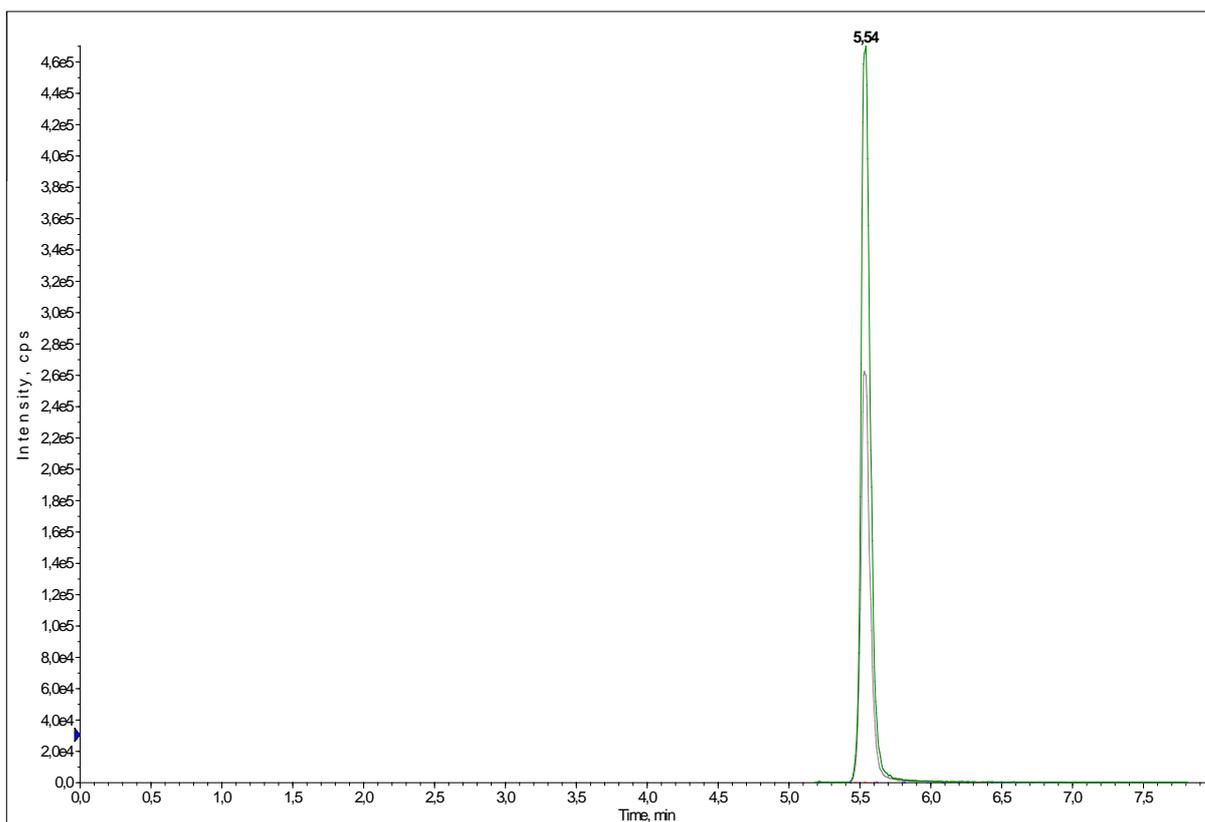


Рис. 49. Хроматограмма образца плазмы крови с внутренним стандартом после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе (переходы внутреннего стандарта m/z 152.3→93.1/107.2)

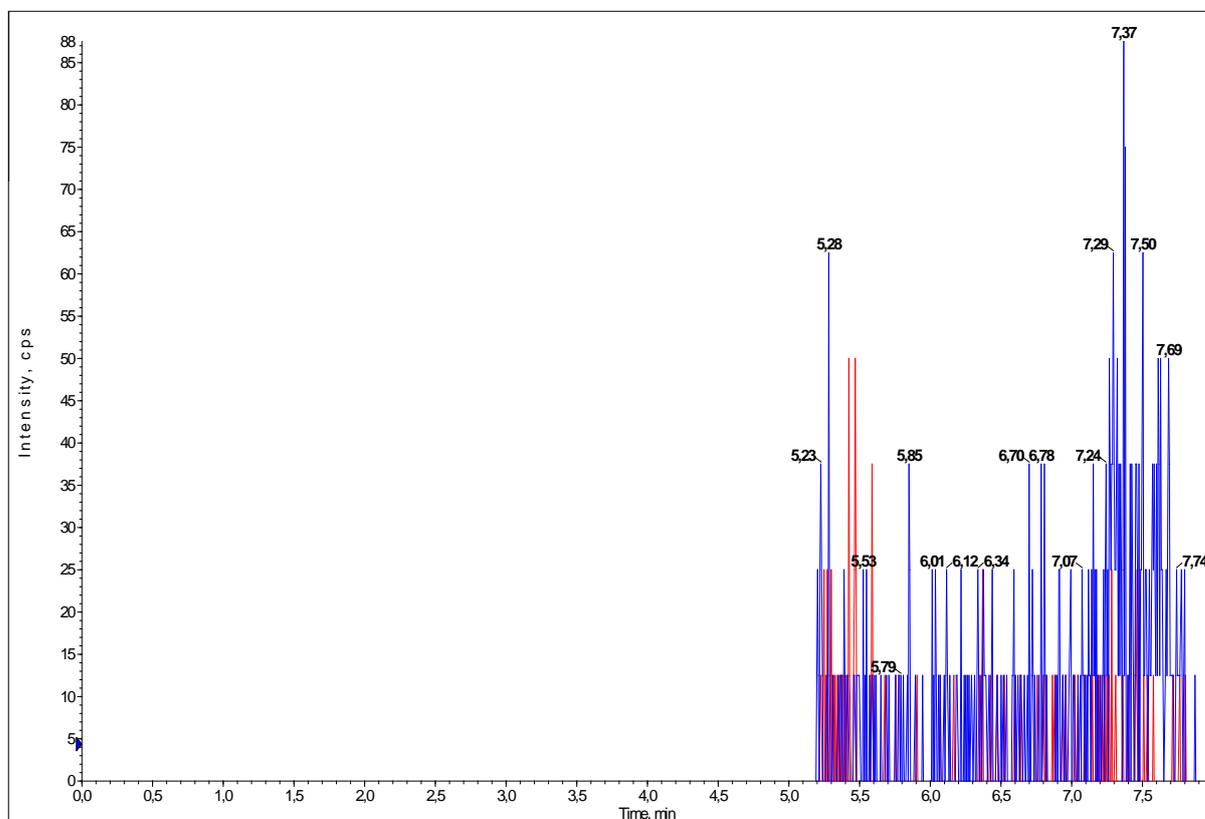


Рис. 50. Хроматограмма холостого образца цельной крови после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе (переходы m/z 284.5→137.2/157.4)

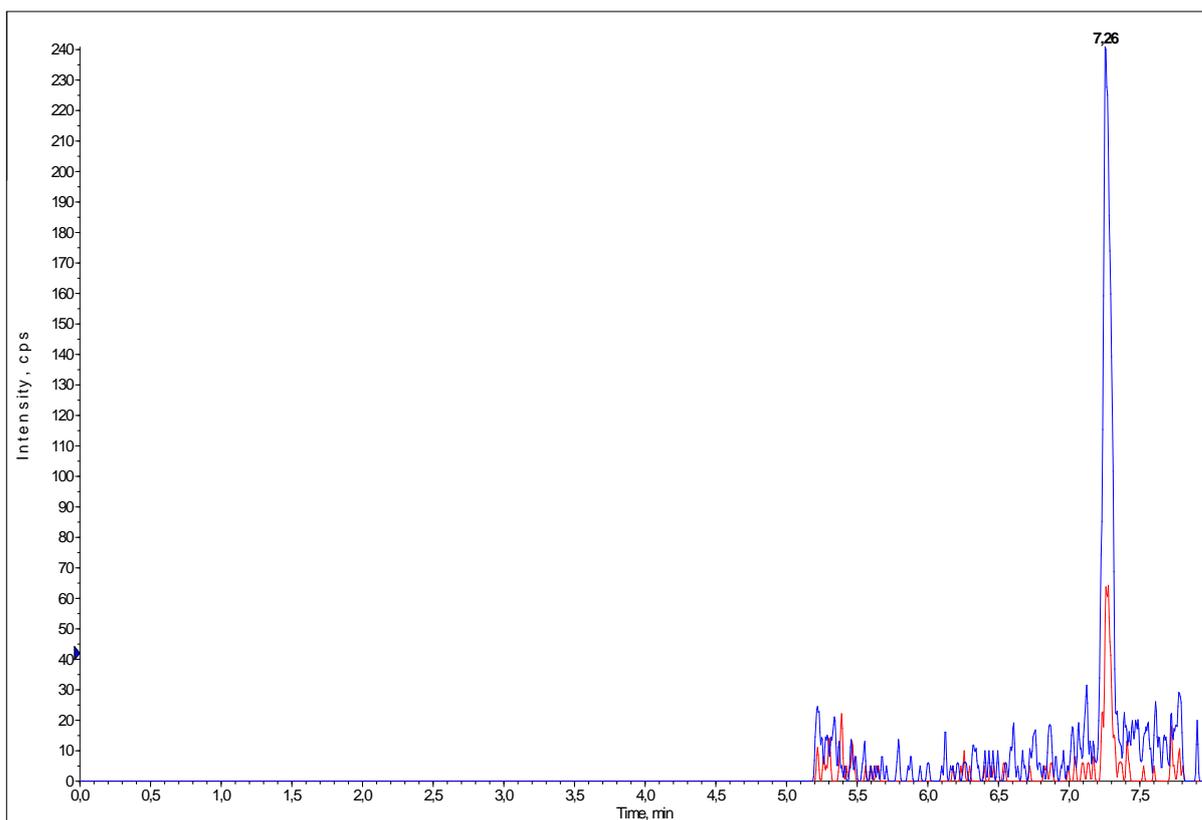


Рис. 51. Хроматограмма образца цельной крови с концентрацией аналита 50 нг/мл после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе (переходы m/z 284.5→137.2/157.4)

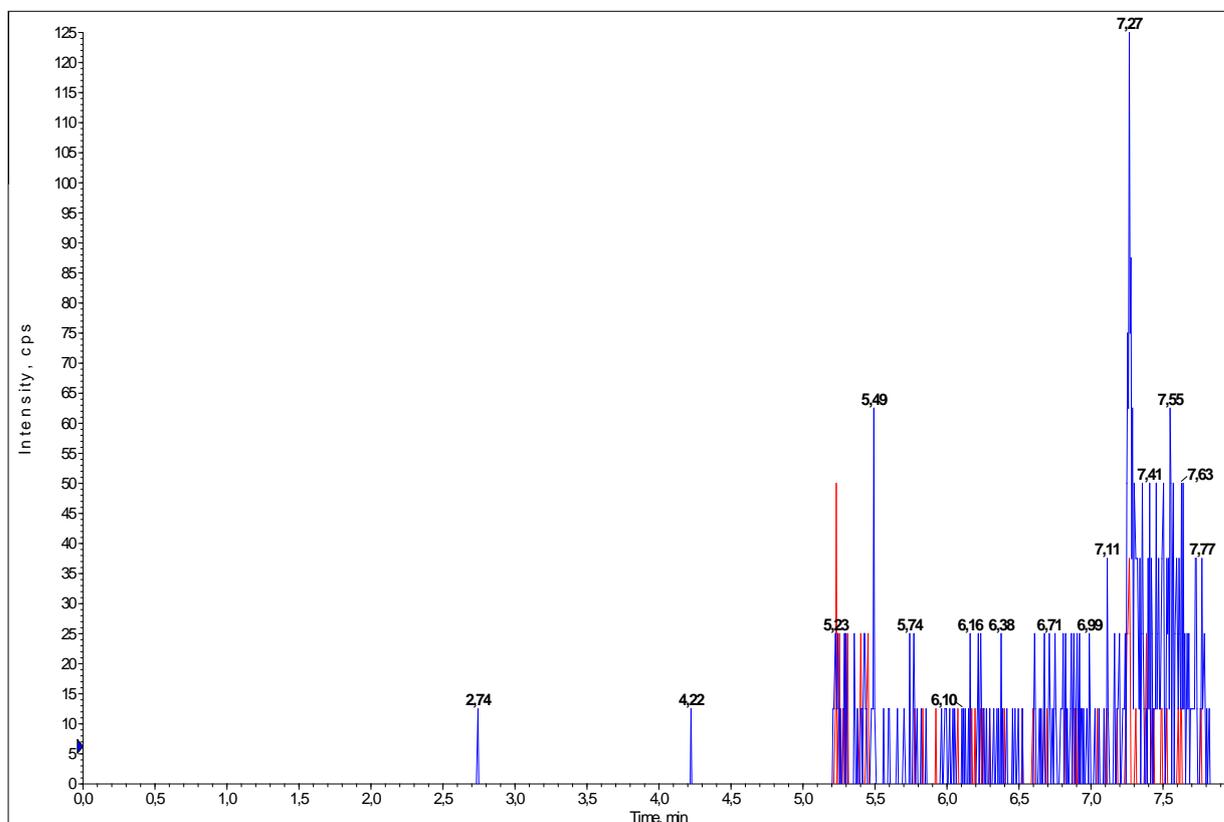


Рис. 52. Хроматограмма холостого образца цельной крови после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе (переходы внутреннего стандарта m/z 152.3→93.1/107.2)

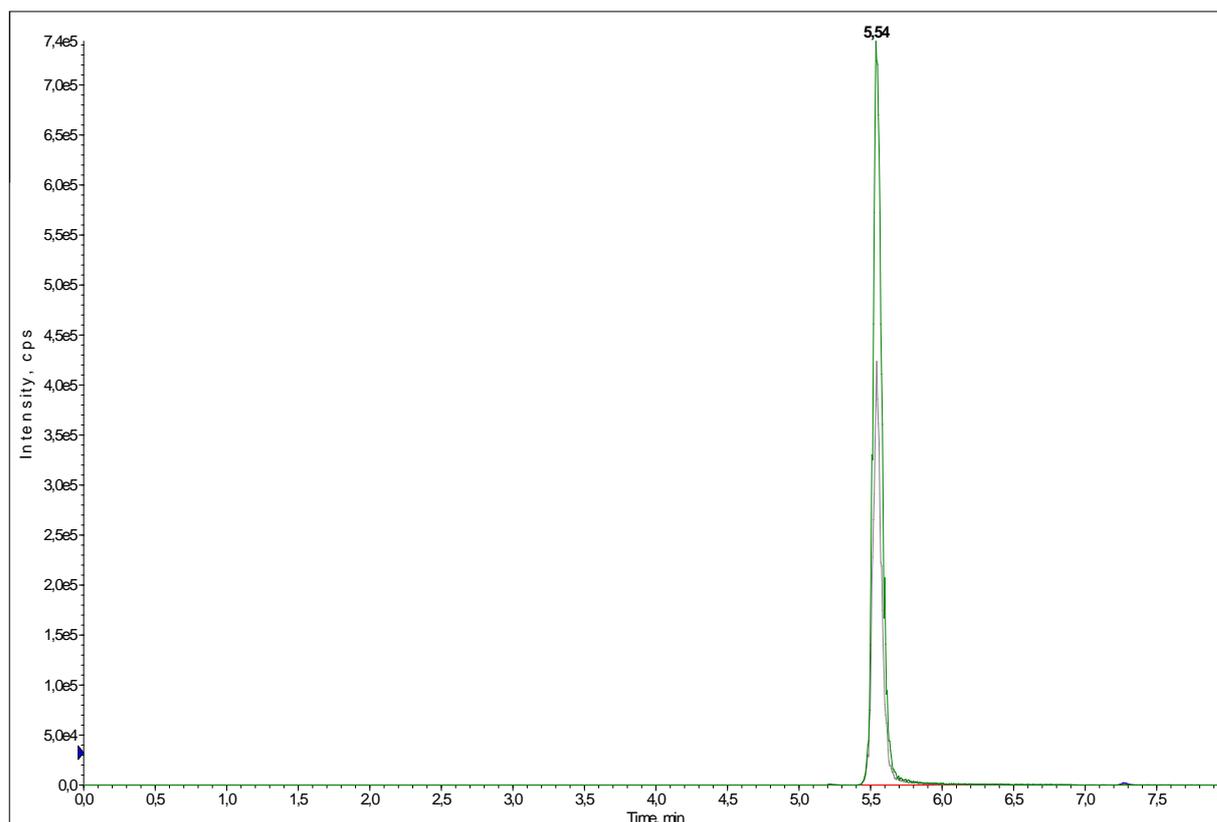


Рис. 53. Хроматограмма образца цельной крови с внутренним стандартом после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе (переходы внутреннего стандарта m/z 152.3→93.1/107.2)

Таким образом, полученные данные показывают, что для определения соединения **1** в биологических матрицах как DMS, так и FPSE можно применять в качестве методов пробоподготовки.

2.7.6.2 Предел обнаружения и нижний предел количественного определения

Нижний предел количественного определения (**НПКО**) – это наименьшая концентрация, которую можно определить с помощью предложенной методики с требуемой правильностью и прецизионностью. Величина НПКО соответствует концентрации, при которой отношение сигнал/шум должно быть не менее 10:1.

При определении соединения **1** в плазме крови и цельной крови крыс методом ВЭЖХ-МС/МС в сочетании с пробоподготовкой методом экстракции сухого пятна матрицы были установлены НПКО, которые совпали и составили 20 нг/мл (Рис. 39 и 43, соответственно). Хроматограммы аналита с концентрациями 20 и 50 нг/мл, соответствующими НПКО, при определении соединения **1** с применением в качестве пробоподготовки метода экстракции на модифицированном целлюлозном носителе приведены на рисунках 47 и 51, соответственно. Эти значения концентраций совпадали с первой точкой на градуировочной зависимости.

2.7.6.3 Линейность

Чтобы оценить линейность градуировочного графика, были приготовлены 8 растворов для DMS и плазма-FPSE экспериментов, 7 растворов для кровь-FPSE эксперимента. Концентрации (нг/мл) градуировочных растворов в DMS и плазма-FPSE экспериментах имели следующие значения 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 и 5000, в кровь-FPSE эксперименте – 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 и 5000 нг/мл. Отклонения открываемости для градуировочных растворов не должны превышать 15% от истинного значения. НПКО оценивают с использованием более мягкого критерия, значения открываемости не должны выходить за границы диапазона $\pm 20\%$ от истинного значения. Также одним из критериев линейности является приемлемое значение коэффициента корреляции, который не должен быть менее 0.99.

Концентрацию аналита определяли в соответствии с уравнением невзвешенной линейной регрессии:

$$Y = a + b \cdot X,$$

где Y – это отношение площадей пиков аналита к внутреннему стандарту, X – концентрация аналита.

Было показано, что графики линейны в диапазоне концентраций от 20 до 5000 нг/мл в DMS, плазма-FPSE экспериментах и в интервале от 50 до 5000 нг/мл в кровь-FPSE эксперименте. Наклон, свободный член уравнения и значение коэффициента корреляции для градуировочного графика в каждом из вариантов определения представлены в таблице 49.

Т а б л и ц а 49

Параметры градуировочных графиков

Методика	*a	**b	***r
DPS	1.87×10^{-5}	3.22×10^{-5}	0.991
DBS	4.18×10^{-6}	1.33×10^{-5}	0.998
плазма-FPSE	1.27×10^{-5}	7.28×10^{-5}	0.998
кровь-FPSE	5.17×10^{-6}	5.71×10^{-5}	0.992

Примечание: *свободный член уравнения; **наклон; ***коэффициент корреляции

2.7.6.4 Правильность и прецизионность

Расчет неизвестного содержания аналита выполнен по градуировочному графику в нижнем, среднем и верхнем диапазонах концентраций. Было проведено пять определений для каждой концентрации во всех интервалах аналитической области методики. Прецизионность методики выражали в виде относительного стандартного отклонения (CV, %) пяти параллельных определений одной концентрации во всех диапазонах аналитической области. Отклонение CV не должно превышать $\pm 15\%$ для нижнего, среднего, верхнего

интервалов и $\pm 20\%$ для НПКО. Оценка правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности проводилась в течение нескольких дней.

Результаты определения правильности и прецизионности разработанных методик представлены в таблицах 50 и 51. Величина CV на уровне НПКО не превышала 20% для всех способов пробоподготовки. При оценке прецизионности в течение нескольких дней, значения CV для метода DPS было не более 11.0%, для DBS $\leq 11.9\%$, для плазма-FPSE $\leq 11.6\%$, для кровь-FPSE $\leq 12.9\%$. Определение прецизионности между днями показало, что значения CV не превышало для метода DPS 9.0%, для DBS – 10.5%, для плазма-FPSE – 9.7%, для кровь-FPSE – 10.1%. Таким образом, ни одно значение CV не превысило допустимой нормы 15%. Правильность методики в течение дня и между днями для DPS метода находилась в интервале от 95.4 до 105.5% и от 97.7 до 103.8%, для DBS – от 97.9 до 102.1% и от 99.8 до 101.4%, для плазма-FPSE от 97.3 до 101.3% и от 98.6 до 100.0%, для кровь-FPSE от 95.6 до 102.6% и от 97.1 до 101.9%, соответственно. Значения правильности на уровнях НПКО и нижнего, среднего, верхнего диапазонов концентраций не выходили за пределы интервала $100 \pm 20\%$ и $100 \pm 15\%$, соответственно, для всех способов пробоподготовки.

Исходя из полученных экспериментальных и рассчитанных данных, можно констатировать, что методика прошла проверку на правильность и прецизионность на уровнях повторяемости и внутрилабораторной прецизионности для трех диапазонов концентраций с применением разных способов пробоподготовки.

Правильность и прецизионность методики определения соединения 1 в биологических жидкостях после обработки методом экстракции сухого пятна матрицы

№	DPS								DBS							
	НПКО (20 нг/мл)		Нижний (60 нг/мл)		Средний (2500 нг/мл)		Верхний (4000 нг/мл)		НПКО (20 нг/мл)		Нижний (60 нг/мл)		Средний (2500 нг/мл)		Верхний (4000 нг/мл)	
	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%
День 1	96.9	7.5	98.6	8.8	102.2	8.2	95.4	9.8	100.9	4.7	97.9	5.8	99.9	6.8	100.0	11.6
День 2	99.3	10.8	96.7	11.0	105.5	5.7	105.2	4.4	102.1	7.2	101.7	11.1	100.1	4.8	101.2	11.9
Между	98.1	8.5	97.7	9.0	103.8	6.5	100.3	8.5	101.4	5.5	99.8	8.3	100.0	5.3	100.6	10.5

Правильность и прецизионность методики определения соединения 1 в биологических жидкостях после обработки методом экстракции на модифицированном целлюлозном носителе

№	Плазма-FPSE								Кровь-FPSE							
	НПКО (20 нг/мл)		Нижний (60 нг/мл)		Средний (2500 нг/мл)		Верхний (4000 нг/мл)		НПКО (50 нг/мл)		Нижний (150 нг/мл)		Средний (2500 нг/мл)		Верхний (4000 нг/мл)	
	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%	Ср.,%	CV,%
День 1	98.0	3.5	97.3	8.6	98.3	9.9	98.6	7.3	101.0	7.2	101.0	4.1	95.6	10.6	102.6	9.2
День 2	99.4	9.8	99.8	9.6	100.5	11.6	101.3	10.2	102.2	10.9	101.2	5.3	98.5	9.9	101.3	12.9
Между	98.7	6.7	98.6	8.3	99.4	9.7	100.0	8.1	101.6	8.3	101.1	4.3	97.1	9.3	101.9	10.1

2.7.6.5 Извлечение и стабильность анализируемых растворов

Определение извлечения образца из биологических матриц позволяет оценить влияние пробоподготовки на правильность анализа. Образцы контроля качества соединения **1** с концентрациями 60 нг/мл в диапазоне низких концентраций и 4000 нг/мл в диапазоне высоких концентраций для DMS, плазма-FPSE экспериментов, а также 150 и 4000 нг/мл для кровь-FPSE экспериментов, были приготовлены и проанализированы в вышеприведенных условиях.

Экстракционное извлечение (**Rec, %**) образца рассчитывали по формуле:

$$\text{Rec, \%} = \frac{S_1}{S_2} \times 100 \%$$

Площадь пика соединения **1** (S_1) найдена при анализе раствора, приготовленного в соответствии с процедурой описанной ниже. Первым шагом было приготовление спайк-раствора согласно общей методике.

DMS: аликвоту объемом 20 мкл спайк-раствора наносили на бумагу. После высыхания пятно вырезали, помещали в чистую пробирку и экстрагировали 100%-ным ацетонитрилом. Экстракцию, центрифугирование и упаривание досуха выполняли в соответствии с разработанной методикой. Остаток растворяли в 100 мкл 50%-ного водного раствора метанола. Коэффициент разбавления в этом случае был равен 1:5.

FPSE: Аликвоту 20 мкл спайк-раствора разбавляли 280 мкл физраствора в пробирке вместимостью 1.5 мл. В каждую пробирку помещали FPSE-диск. Детали экстракции были приведены ранее. Обратную экстракцию проводили с использованием 100%-ного метанола в соответствии с разработанной методикой. Полученный раствор разбавляли водой в соотношении 1:1. Коэффициент разбавления в этом эксперименте составил 1:5. Все растворы были проанализированы.

Площадь пика соединения **1** (S_2) найдена при анализе раствора, приготовленного в соответствии с процедурой описанной ниже.

DMS: аликвоту объемом 20 мкл плазмы крови или цельной крови наносили на бумагу. Далее проводили все этапы пробоподготовки в соответствии с процедурой анализа. После упаривания досуха остаток растворяли в 50 мкл метанольного раствора соединения **1** с концентрацией 24 нг/мл (диапазон низких концентраций) и 1600 нг/мл (диапазон высоких концентраций), далее проводили разбавление деионизованной водой (1:1).

FPSE: Аликвоту 20 мкл плазмы крови или цельной крови разбавляли 280 мкл физраствора в пробирке объемом 1.5 мл. В каждую пробирку помещали FPSE-диск. Далее выполняли процедуру экстракции. Затем диск помещали в чистую пробирку, добавляли 50 мкл метанольного раствора соединения **1** с концентрацией 24 (плазма) и

60 (кровь) нг/мл (диапазон низких концентраций) и 1600 нг/мл (диапазон высоких концентраций). Далее полученный раствор разбавляли 50 мкл воды. Все растворы были проанализированы.

Экстракционное извлечение соединения **1** из биологических жидкостей в эксперименте прямого нанесения анализируемых образцов на DMS-карточки (в соответствии с описанной ранее методикой) варьировалось от 23.8 до 28.6%. С целью сравнения данного параметра, FPSE-ткань использовали вместо DMS-карточек при прямом нанесении спайк-растворов исследуемого соединения в условиях одинакового механизма экстракции. Можно отметить, что при применении FPSE-ткани в DMS-эксперименте среднее извлечение изменялось от 29.1 до 45.9% (Табл. 52).

Т а б л и ц а 52

**Экстракционное извлечение соединения 1
при использовании DMS-карточек и FPSE-ткани в условиях DMS эксперимента**

		DPS	DBS	*Плазма-FPSE	*Кровь-FPSE
		Извлечение (среднее значение \pm SD,%)			
Соединение 1	Нижний	24.3 \pm 3.1	23.8 \pm 2.0	29.1 \pm 3.1	31.7 \pm 2.7
	Верхний	28.6 \pm 2.5	26.4 \pm 2.3	45.9 \pm 3.9	39.4 \pm 4.4
n		6	6	6	6

Примечание: *не валидирована

Экстракционное извлечение соединения **1** из плазмы крови и цельной крови животных при помещении FPSE-ткани в спайк разбавленный физраствором (в соответствии с ранее описанным протоколом пробоподготовки) изменялось от 27.0 до 42.1%. Значение извлечения при использовании DMS-карточек в FPSE-эксперименте находилось в интервале от 26.1 до 33.8% (Табл. 53).

Т а б л и ц а 53

**Экстракционное извлечение соединения 1
при использовании DMS-карточек и FPSE-ткани в условиях FPSE эксперимента**

		*DPS	*DBS	Плазма-FPSE	Кровь-FPSE
		Извлечение (среднее значение \pm SD,%)			
Соединение 1	Нижний	26.1 \pm 2.4	23.7 \pm 2.9	34.6 \pm 3.7	27.0 \pm 3.9
	Верхний	33.8 \pm 1.1	29.1 \pm 2.0	42.1 \pm 2.4	35.7 \pm 3.0
n		6	6	6	6

Примечание: *не валидирована

Не всегда анализ удается провести в день измерения аналитического сигнала, поэтому требуется установить стабильность анализируемых растворов. Образцы после всех этапов пробоподготовки хранили при + 10°C в течение 24 ч. После хранения растворы анализировали. В течение заданного времени растворы оставались стабильными.

2.7.6.6 Перенос соединения 1 в методе экстракции сухого пятна матрицы

Холостой образец анализировали после градуировочного раствора с максимальной концентрацией (5000 нг/мл), чтобы оценить перенос вещества. Остаточного пика по времени удерживания, соответствующего соединению **1**, во всех экспериментах не наблюдали.

В результате проделанной работы, разработаны и валидированы методики определения соединения 1 в плазме крови и цельной крови животных с применением для обработки образцов методов экстракции сухого пятна матрицы и экстракции на модифицированном целлюлозном носителе в сочетании с ВЭЖХ-МС/МС анализом. Разработанные методики могут быть использованы для дальнейших фармакокинетических исследований [197].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При разработке новых фармацевтических препаратов методики представленные в диссертационной работе будут использованы для определения действующего вещества и контроля чистоты по содержанию технологических примесей, элементных примесей и остаточных органических растворителей. Разработанные биоаналитические методики могут быть применены для получения фармакокинетических и фармакодинамических данных исследуемого физиологически активного соединения, что является неотъемлемой частью доклинических испытаний нового препарата.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Методами элементного анализа, УФ-, ИК-, ЯМР ^1H - и ^{13}C -спектроскопии доказаны состав и строение анализируемого соединения. Методом РСА подтверждено пространственное расположение атомов в соединении. Установлена растворимость в растворителях разной полярности. Получены термические и спектральные характеристики. Обработанные данные позволили приступить к формированию соответствующих разделов регистрационного досье на фармацевтическое соединение аналгетического действия.

2. Разработана и валидирована методика идентификации органических примесей и определения содержания действующего вещества методом ВЭЖХ-УФ. Установлено, что содержания возможных органических примесей находятся ниже найденных пределов обнаружения, а среднее значение содержания действующего вещества не менее 99.6%. При оценке правильности открываемости имеет значения $99.6 \pm 0.6\%$ для нижнего диапазона концентраций, $99.8 \pm 0.9\%$ для среднего диапазона концентраций, $99.8 \pm 0.8\%$ для верхнего диапазона концентраций. Относительное стандартное отклонение составляет 0.7% при оценке повторяемости и 0.8% при оценке внутрилабораторной прецизионности. Хроматографическая методика является специфичной, надежной, точной и достоверной для идентификации органических примесей и определения действующего вещества в исследуемом соединении и может быть внедрена для оценки чистоты при получении соединения.

3. Разработана и валидирована методика определения содержания остаточных органических растворителей методом ГХ-ПИД. В работе выполнено сравнение трех подходов – сочетание парофазного анализа с разделением определяемых растворителей на стандартной колонке HP-5MS, введение в испаритель жидкой пробы с разделением на колонке, заполненной модифицированным поли(1-триметилсилил-1-пропин)ом, и прямой ввод пробы в испаритель и разделение на коммерческой капиллярной колонке DB-624. Содержания *n*-гексана и дихлорметана находились ниже ПО. Средние значения открываемости составили $100.2 \pm 0.8\%$ для этилацетата и $99.6 \pm 0.5\%$ для метил-*трет*-бутилового эфира. Стандартные отклонения результатов при определении содержаний ЭА и МТБЭ в соединении с использованием разработанной методики не превышали 0.03 и 0.09 ppm, соответственно.

4. Разработана методика определения элементных примесей методом атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой. Так как спектрометр рассчитан на работу с жидкими образцами, а фармацевтическое соединение представляет собой твердое вещество нерастворимое в воде, были оптимизированы условия пробоподготовки в микроволновой системе автоклавного растворения. Подобраны инструментальные параметры

работы на спектрометре модели 4100 с применением установки генерации гидридных форм для определения As и Hg, без установки – для определения остальных элементных примесей. Содержания V, Co, As, Mo, Ru, Pd, Ag, Cd, Pt и Hg находились ниже экспериментально установленных пределов обнаружения. Найдены содержания Al $(1.4 \pm 0.6) \times 10^{-4}\%$, Fe $(4.3 \pm 0.9) \times 10^{-4}\%$, Cu $(0.8 \pm 0.6) \times 10^{-4}\%$, Pb $(5.8 \pm 1.5) \times 10^{-5}\%$ с применением метода «введено-найденно» и Al $(1.6 \pm 0.5) \times 10^{-4}\%$, Fe $(3.9 \pm 0.5) \times 10^{-4}\%$, Ni $(3.2 \pm 0.7) \times 10^{-5}\%$, Pb $(2.6 \pm 0.9) \times 10^{-5}\%$ с применением метода «введено-найденно» в сочетании с методом внутреннего стандарта.

5. Разработаны и валидированы методики определения исследуемого соединения в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС/МС. Средние значения извлечения соединения методом экстракции сухого пятна плазмы крови и цельной крови составили 26.5 и 25.1%, соответственно. Средние значения извлечения соединения из плазмы крови и цельной крови с применением метода экстракции на модифицированном целлюлозном носителе были выше и составили 38.4 и 31.4%, соответственно. Все четыре методики могут быть применены для определения физиологически активного соединения в биологических средах и построения фармакокинетического профиля.

6. На основе полученных данных о физико-химических свойствах и чистоте анализируемого соединения разработан стандартный образец предприятия, который может быть в дальнейшем использован для определения действующего вещества и примесей разных классов в фармацевтическом соединении анальгетического действия.

В заключение хотелось бы выразить благодарность моему научному руководителю – д.х.н. Фадеевой Валентине Павловне за помощь и поддержку при выполнении и написании моей диссертационной работы; член-корр. Салахутдинову Нариману Фаридовичу за постоянную помощь и консультации в области работы с физиологически активными соединениями; д.х.н. Волчо К.П. за консультации на всех этапах работы; за предоставленные для анализа образцы к.х.н. Ильиной И.В. и ведущему инженеру ЛФАВ Курбаковой С.Ю; к.х.н., с.н.с. ЛФАВ НИОХ СО РАН Рогачеву А.Д. за совместную работу и консультации при разработке биоаналитических методик определения исследуемого соединения в биологических жидкостях методом ВЭЖХ-МС/МС; к.х.н., н.с. ЛКЖСОС ИК СО РАН Яковлевой Е.Ю. и ведущему инженеру ЛЭИиХА НИОХ СО РАН Коллегову В.Ф. за обучение основам газовой хроматографии и обсуждение полученных результатов.

Автор также благодарен сотрудникам Международного университета Флориды, США, Ph.D., prof. Kabir A., Ph.D., prof. Furton K.G. за предоставленные модифицированные целлюлозные экстракционные материалы для пробоподготовки.

Выражаю благодарность также сотрудникам Химического сервисного центра коллективного пользования НИОХ СО РАН за измерения физико-химических характеристик исследуемого вещества, за проведение РСА и получение спектров ЯМР.

А также благодарность всем сотрудникам и заведующей лаборатории микроанализа за доброжелательное отношение и поддержку.

Список цитируемой литературы

- 1 Пат. 2555361 Российская Федерация, МПК⁵¹ А61К 31/381, А61К 31/353, А61Р 29/00. Производные 2Н-хромена в качестве анальгезирующих средств / Хайд Е.В., Павлова А.В., Михальченко О.С., Корчагина Д.В., Толстикова Т.Г., Волчо К.П., Хазанов В.А, Салахутдинов Н.Ф.; патентообладатель ФГБУН НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, ООО «Леофорс». – опубл. 10.07.15, Бюл. № 19. – 8с.
- 2 Nazimova E., Pavlova A., Mikhailchenko O., Il'ina I., Korchagina D., Tolstikova T., Volcho K., Salakhutdinov N. Discovery of highly potent analgesic activity of isopulegol-derived (2R,4aR,7R,8aR)-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2H-chromen-4-ol // *Med. Chem. Res.* – 2016. – V. 25. – N. 7. – P. 1369-1383.
- 3 Государственная Фармакопея РФ XIV / М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2018. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>
- 4 Guideline I. C. H. Impurities in New drug substances // Q3A (R2), Current Step. – 2006. – V. 4. – P. 1-11.
- 5 Sambandan E., Kathavarayan T., Sellappan S., Shiea J., Ponnusamy V.K. Identification and characterization of unknown degradation impurities in beclomethasone dipropionate cream formulation using HPLC, ESI-MS and NMR // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2019. – V. 167. – P. 123-131.
- 6 Narayanam M., Sahu A., Singh S. Characterization of stress degradation products of benazepril by using sophisticated hyphenated techniques // *J. Chromatogr. A* – 2013. – V. 1271. – N. 1. – P. 124-136.
- 7 Kumar V., Shah R.P., Singh S. LC and LC–MS methods for the investigation of polypills for the treatment of cardiovascular diseases: Part 1. Separation of active components and classification of their interaction/degradation products // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – V. 47. – N. 3. – P. 508-515.
- 8 Reis N.F.A., De Assis J.C., Fialho S.L., Pianetti G.A., Fernandes C. Stability-indicating UHPLC method for determination of nevirapine in its bulk form and tablets: identification of impurities and degradation kinetic study // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – V. 126. – P. 103-108.
- 9 Bhardwaj S.P., Singh S. Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC–MS and development of a validated stability-indicating assay method // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – V. 46. – N. 1. – P. 113-120.

-
- 10 Gavin P.F., Olsen B.A. A quality by design approach to impurity method development for atomoxetine hydrochloride (LY139603) // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – V. 46. – N. 3. – P. 431-441.
- 11 Bansal G., Singh M., Jindal K.C., Singh S. LC–UV–PDA and LC–MS studies to characterize degradation products of glimepiride // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – V. 48. – N. 3. – P. 788-795.
- 12 Bedse G., Kumar V., Singh S. Study of forced decomposition behavior of lamivudine using LC, LC–MS/TOF and MSn // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2009. – V. 49. – N. 1. – P. 55-63.
- 13 Kumar V., Shah R.P., Malik S., Singh S. Compatibility of atenolol with excipients: LC–MS/TOF characterization of degradation/interaction products, and mechanisms of their formation // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2009. – V. 49. – N. 4. – P. 880-888.
- 14 Mehta S., Shah R.P., Priyadarshi R., Singh S. LC and LC–MS/TOF studies on stress degradation behaviour of candesartan cilexetil // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – V. 52. – N. 3. – P. 345-354.
- 15 Shah R.P., Sahu A., Singh S. Identification and characterization of degradation products of irbesartan using LC–MS/TOF, MSn, on-line H/D exchange and LC–NMR // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – V. 51. – N. 5. – P. 1037-1046.
- 16 Murthy M.V., Srinivas K., Kumar R., Mukkanti K. Development and validation of a stability-indicating LC method for determining Palonosetron hydrochloride, its related compounds and degradation products using naphthalethyl stationary phase // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2011. – V. 56. – N. 2. – P. 429-435.
- 17 Modhave D.T., Handa T., Shah R.P., Singh S. Stress degradation studies on lornoxicam using LC, LC–MS/TOF and LC–MSn // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2011. – V. 56. – N. 3. – P. 538-545.
- 18 Thomas S., Bharti A., Maddhesia P.K., Shandilya S., Agarwal A., Biswas S., Bhansal V., Gupta A.K., Tewari P.K., Mathela C.S. Highly efficient, selective, sensitive and stability indicating RP-HPLC–UV method for the quantitative determination of potential impurities and characterization of four novel impurities in eslicarbazepine acetate active pharmaceutical ingredient by LC/ESI-IT/MS/MS // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2012. – V. 61. – P. 165-175.
- 19 Wang M.J., Xue J., Zou W.B., Wang Y., Hu C.Q., Hoogmartens J., Adams E. Identification of the components of bitespiramycin by liquid chromatography–mass spectrometry // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2012. – V. 66. – P. 402-410.
- 20 Béni Z., Háda V., Varga E., Mahó S., Aranyi A., Szántay Jr C. New oxidative decomposition mechanism of estradiol through the structural characterization of a minute impurity and its degradants // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2013. – V. 78. – P. 183-189.

-
- 21 Kahsay G., Adegoke A.O., Van Schepdael A., Adams E. Development and validation of a reversed phase liquid chromatographic method for analysis of griseofulvin and impurities // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2013. – V. 80. – P. 9-17.
- 22 Narayanam M., Sahu A., Singh S. Use of LC–MS/TOF, LC–MSn, NMR and LC–NMR in characterization of stress degradation products: Application to cilazapril // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2015. – V. 111. – P. 190-203.
- 23 Liu L., Cao N., Ma X., Xiong K., Sun L., Zou Q., Yao L. Stability-indicating reversed-phase HPLC method development and characterization of impurities in vortioxetine utilizing LC–MS, IR and NMR // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – V. 117. – P. 325-332.
- 24 Jadhav S.B., Kumar C.K., Bandichhor R., Bhosale P.N. Development of RP UPLC-TOF/MS, stability indicating method for omeprazole and its related substances by applying two level factorial design; and identification and synthesis of non-pharmacopoeial impurities // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – V. 118. – P. 370-379.
- 25 Zhang H., Sun L., Zou L., Hui W., Liu L., Zou Q., Ouyang P. Identification, characterization and HPLC quantification of process-related impurities in trelagliptin succinate bulk drug: six identified as new compounds // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2016. – V. 128. – P. 18-27.
- 26 Ruggenthaler M., Grass J., Schuh W., Huber C.G., Reischl R.J. Levothyroxine sodium revisited: A wholistic structural elucidation approach of new impurities via HPLC-HRMS/MS, on-line H/D exchange, NMR spectroscopy and chemical synthesis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2017. – V. 135. – P. 140-152.
- 27 Kumar A., Devineni S.R., Dubey S.K., Kumar P., Srivastava V., Ambulgekar G., Jain M., Gupta D.K., Singh G., Kumar R., Hiriyanna S. G. Identification, synthesis and structural characterization of process related and degradation impurities of acrivastine and validation of HPLC method // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2017. – V. 133. – P. 15-26.
- 28 Arar S., Sweidan K., Qasem S. Identification and characterization of the degradation products of prasugrel hydrochloride tablets using LC-MS technique // *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* – 2018. – V. 41. – N. 1. – P. 14-23.
- 29 Zielińska-pisklak M., Pisklak D.M., Wawer I. Application of ¹³C CPMAS NMR for qualitative and quantitative characterization of carvedilol and its commercial formulations // *J. Pharm. Sci.* – 2012. – V. 101. – N. 5. – P. 1763-1772.
- 30 Nasu M., Nemoto T., Mimura H., Sako K. Development of qualitative and quantitative analysis methods in pharmaceutical application with new selective signal excitation methods for

13C solid-state nuclear magnetic resonance using 1H T1rho relaxation time // *J. Pharm. Sci.* – 2013. – V. 102. – N. 1. – P. 154-161.

31 Pisklak D.M., Zielińska-Pisklak M., Szeleszczuk Ł., Wawer I. 13C cross-polarization magic-angle spinning nuclear magnetic resonance analysis of the solid drug forms with low concentration of an active ingredient-propranolol case // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2014. – V. 93. – P. 68-72.

32 Pindelska E., Szeleszczuk L., Pisklak D.M., Majka Z., Kolodziejski W. Crystal structures of tiotropium bromide and its monohydrate in view of combined solid-state nuclear magnetic resonance and gauge-including projector-augmented wave studies // *J. Pharm. Sci.* – 2015. – V. 104. – N. 7. – P. 2285-2292.

33 Szeleszczuk Ł., Jurczak E., Zielińska-Pisklak M., Harwacki J., Pisklak D.M. Comparison of the analytical methods (solid state NMR, FT-IR, PXRD) in the analysis of the solid drug forms with low concentration of an active ingredient–17-β-estradiol case // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2018. – V. 149. – P. 160-165.

34 Ramkumaar G.R., Srinivasan S., Bhoopathy T.J., Gunasekaran S. Quantum chemical and experimental studies on polymorphism of antiviral drug Lamivudine // *Spectrochim. Acta, Part A.* – 2012. – V. 98. – P. 265-270.

35 Pindelska E., Szeleszczuk L., Pisklak D.M., Mazurek A., Kolodziejski W. Solid-state NMR as an effective method of polymorphic analysis: Solid dosage forms of clopidogrel hydrogensulfate // *J. Pharm. Sci.* – 2015. – V. 104. – N. 1. – P. 106-113.

36 Szeleszczuk Ł., Pisklak D.M., Zielińska-Pisklak M., Wawer I. Spectroscopic and structural studies of the diosmin monohydrate and anhydrous diosmin // *Int. J. Pharm.* – 2017. – V. 529. – N. 1-2. – P. 193-199.

37 Ding L., Wang X., Yang Z., Chen Y. The use of HPLC/MS, GC/MS, NMR, UV and IR to identify a degradation product of eperisone hydrochloride in the tablets // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – V. 46. – N. 2. – P. 282-287.

38 Latosińska J.N., Latosińska M., Seliger J., Žagar V. An innovative method for the non-destructive identification of photodegradation products in solid state: 1H–14N NMR–NQR and DFT/QTAIM study of photodegradation of nifedipine (anti-hypertensive) to nitrosonifedipine (potential anti-oxidative) // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2012. – V. 47. – N. 1. – P. 97-107.

39 Guideline I. C. H. Impurities in New Drug Products // Q3B (R2), Current Step. – 2006. – P. 1-12.

40 Witschi C., Doelker E. Residual solvents in pharmaceutical products: acceptable limits, influences on physicochemical properties, analytical methods and documented values // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 1997. – V. 43. – N. 3. – P. 215-242.

-
- 41 Государственная Фармакопея РФ XIII изд / М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2015. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea13.php>
- 42 Государственная Фармакопея РФ XII изд // М.: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2008. – 704 с.
- 43 The United States Pharmacopeia XXXX. <731> General Chapter / Rockville MD, 2017. – Режим доступа: <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c731.pdf>.
- 44 Grodowska K., Parczewski A. Analytical methods for residual solvents determination in pharmaceutical products // Acta Pol. Pharm. – 2010. – V. 67. – N. 1. – P. 13-26.
- 45 The United States Pharmacopeia XXXI. <467> General Chapter / Rockville MD, 2007. – Режим доступа: http://www.uspbpep.com/usp31/v31261/usp31nf26s1_c467.asp
- 46 The United States Pharmacopeia XXXX. <467> General Chapter / Rockville MD, 2017. – Режим доступа: <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c467.pdf>
- 47 European Pharmacopoeia Commission, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. European pharmacopoeia. <2.4.24.> Identification and control of residual solvents – Council of Europe, 2010. – V. 1. P. 123-124.
- 48 Kersten B.S. Drug matrix effect on the determination of residual solvents in bulk pharmaceuticals by wide-bore capillary gas chromatography // J. Chromatogr. Sci. – 1992. – V. 30. – N. 4. – P. 115-119.
- 49 Smith I.D., Waters D.G. Determination of residual solvent levels in bulk pharmaceuticals by capillary gas chromatography // Analyst. – 1991. – V. 116. – N. 12. – P. 1327-1331.
- 50 Foust D.W., Bergren M.S. Analysis of solvent residues in pharmaceutical bulk drugs by wall-coated open tubular gas chromatography // J. Chromatogr. A – 1989. – V. 469. – P. 161-173.
- 51 Li Q.C., Cohen K.A., Zhuang G.A capillary gas chromatographic procedure for the analysis of nine common residual solvents in water-insoluble bulk pharmaceuticals // J. Chromatogr. Sci. – 1998. – V. 36. – N. 3. – P. 119-124.
- 52 Otero R., Carrera G., Dulsat J.F., Fábregas J.L., Claramunt J. Static headspace gas chromatographic method for quantitative determination of residual solvents in pharmaceutical drug substances according to European Pharmacopoeia requirements // J. Chromatogr. A – 2004. – V. 1057. – N. 1-2. – P. 193-201.
- 53 Klick S., Sköld A. Validation of a generic analytical procedure for determination of residual solvents in drug substances // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2004. – V. 36. – N. 2. – P. 401-409.

-
- 54 Sitaramaraju Y., Riadi A., D'Autry W., Wolfs K., Hoogmartens J., Van Schepdael A., Adams E. Evaluation of the European Pharmacopoeia method for control of residual solvents in some antibiotics // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – V. 48. – N. 1. – P. 113-119.
- 55 Cheng C., Liu S., Mueller B.J., Yan Z. A generic static headspace gas chromatography method for determination of residual solvents in drug substance // *J. Chromatogr. A* – 2010. – V. 1217. – N. 41. – P. 6413-6421.
- 56 Li Z., Han Y.H., Martin G.P. Static headspace gas chromatographic analysis of the residual solvents in gel extrusion module tablet formulations // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2002. – V. 28. – N. 3-4. – P. 673-682.
- 57 Li J., Shao S., Solorzano M., Allmaier G.J., Kurtulik P.T. Determination of the residual ethanol in hydroalcoholic sealed hard gelatin capsules by static headspace gas chromatography with immiscible binary solvents // *J. Chromatogr. A* – 2009. – V. 1216. – N. 15. – P. 3328-3336.
- 58 Sitaramaraju Y., Van Hul A., Wolfs K., Van Schepdael A., Hoogmartens J., Adams E. Static headspace gas chromatography of (semi-) volatile drugs in pharmaceuticals for topical use // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2008. – V. 47. – N. 4-5. – P. 834-840.
- 59 Hachenberg H., Schmidt A.P. Gas chromatographic headspace analysis. – Heyden, 1977.
- 60 Drozd J., Novák J. Headspace gas analysis by gas chromatography // *J. Chromatogr. A* – 1979. – V. 165. – N. 2. – P. 141-165.
- 61 Snow N.H., Slack G.C. Head-space analysis in modern gas chromatography // *TrAC, Trends Anal. Chem.* – 2002. – V. 21. – N. 9-10. – P. 608-617.
- 62 Wang M., Fang S., Liang X. Natural deep eutectic solvents as eco-friendly and sustainable dilution medium for the determination of residual organic solvents in pharmaceuticals with static headspace-gas chromatography // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2018. – V. 158. – P. 262-268.
- 63 Feng X.Z., Han G.C., Qin J., Yin S.M., Chen Z. Determination of residual solvents in linezolid by static headspace GC // *J. Chromatogr. Sci.* – 2015. – V. 54. – N. 4. – P. 487-491.
- 64 Huzar E., Wodnicka A. Determination of ethanol content in medicated syrups by static headspace gas chromatography // *Acta Pol. Pharm.* – 2013. – V. 70. – P. 41-49.
- 65 Liu H., Tang Q., Markovich R.J., Rustum A.M. A general static-headspace gas chromatographic method for determination of residual benzene in oral liquid pharmaceutical products // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2011. – V. 54. – N. 2. – P. 417-421.
- 66 Pawliszyn J. Solid phase microextraction: theory and practice. – John Wiley & Sons, 1997.

-
- 67 Lord H., Pawliszyn J. Evolution of solid-phase microextraction technology // *J. Chromatogr. A* – 2000. – V. 885. – N. 1-2. – P. 153-193.
- 68 U. S. Pat. 15484133. Extraction and determination of residual organic solvents in pharmaceutical products by spme method using a new nanocomposite fiber / Ghiasvand A. et al. – 2017.
- 69 Djozan D., Jouyban A., Norouzi J. Ultrasonic assisted SPME Coupled with GC and GC—MS using Pencil Lead as a Fiber for Monitoring the Organic Volatile Impurities of Ceftazidime // *J. Chromatogr. Sci.* – 2008. – V. 46. – N. 8. – P. 680-685.
- 70 Li H., Yang M., Wan J., Qu Q. Determination of Residual Organic Volatile Solvents in Cefpiramide Sodium by Headspace Gas Chromatography with Solid-Phase Microextraction // *Chinese J. Pharm. Anal.* – 2005. – V. 25. – N. 1. – P. 37-39.
- 71 Camarasu C.C. Headspace SPME method development for the analysis of volatile polar residual solvents by GC-MS // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2000. – V. 23. – N. 1. – P. 197-210.
- 72 Официальный сайт компании Phenomenex. – Режим доступа: <https://www.phenomenex.com/Products/Detail/Zebtron>
- 73 Официальный сайт компании Agilent. – Режим доступа: <https://www.agilent.com/>
- 74 Официальный сайт компании Restek. – Режим доступа: <https://www.restek.com/>
- 75 Сайт официального дистрибьютора. – Режим доступа: <https://www.sigmaaldrich.com/russian-federation.html>
- 76 Сайт официального дистрибьютора. – Режим доступа: <http://www.allpump.co.kr/alltech/c6328gccolumn.pdf>
- 77 Официальный сайт компании SGE. – Режим доступа: <http://www.sge.com/home/>
- 78 Официальный сайт компании Machery-Nagel. – Режим доступа: <https://www.mn-net.com/>
- 79 Официальный сайт компании Quadrex. – Режим доступа: <https://quadrexcorp.com/>
- 80 Westmoreland D.G., Rhodes G.R. Analytical techniques for trace organic compounds-II. Detectors for gas chromatography // *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.* – 1989. – V. 61. – N. 6. – P. 1147-1160.
- 81 Urakami K., Higashi A., Umemoto K., Godo M. Matrix media selection for the determination of residual solvents in pharmaceuticals by static headspace gas chromatography // *J. Chromatogr. A* – 2004. – V. 1057. – N. 1-2. – P. 203-210.

-
- 82 Dubernet C., Rouland J.C., Benoit J.P. Comparative study of two ethylcellulose forms (raw material and microspheres) carried out through thermal analysis // *Int. J. Pharm.* – 1990. – V. 64. – N. 2-3. – P. 99-107.
- 83 Mumper R.J., Jay M. Poly (L-lactic acid) microspheres containing neutron-activatable holmium-165: A study of the physical characteristics of microspheres before and after irradiation in a nuclear reactor // *Pharm. Res.* – 1992. – V. 9. – N. 1. – P. 149-154.
- 84 Pardun H., Vogel P. Eine Schnellmethode zur Bestimmung von Lösungsmittelresten in extrahierten Ölen // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 1972. – V. 74. – P. 2. – P. 69-72.
- 85 Vachon M.G., Nairn J.G. Physico-chemical evaluation of acetylsalicylic acid-Eudragit® RS100 microspheres prepared using a solvent-partition method // *J. Microencapsulation.* – 1995. – V. 12. – N. 3. – P. 287-305.
- 86 Avdovich H.W., Lebel M.J., Savard C., Wilson W.L. Nuclear magnetic resonance identification and estimation of solvent residues in cocaine // *Forensic Sci. Int.* – 1991. – V. 49. – N. 2. – P. 225-235.
- 87 Wypych G. *Handbook of solvents.* – ChemTec Publishing, 2001.
- 88 Benoit J.P., Courteille F., Thies C. A physicochemical study of the morphology of progesterone-loaded poly (D, L-lactide) microspheres // *Int. J. Pharm.* – 1986. – V. 29. – N. 2-3. – P. 95-102.
- 89 The United States Pharmacopeia XXXII / Rockville MD, 2009. – Режим доступа: <https://www.uspnf.com/>
- 90 Barin J.S., Mello P.A., Mesko M.F., Duarte F.A., Flores E.M. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2016. – V. 408. – N. 17. – P. 4547-4566.
- 91 Guideline I. C. H. Guideline for elemental impurities // Q3D, Current Step. – 2018. – Режим доступа: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3D/Q3D_Step_4.pdf
- 92 Lewen N., Mathew S., Schenkenberger M., Raglione T. A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2004. – V. 35. – N. 4. – P. 739-752.
- 93 European Pharmacopoeia Commission, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. European pharmacopoeia. <2.4.8.> Heavy metals – Council of Europe, 2010. – V. 1. – P. 114-117.
- 94 Japanese Pharmacopoeia, 13th ed. Yakiy Nippo Ltd. Tokyo. Japan. – 1996. P. 42-43.

95 Ковалева Е.Л., Беланова А.И., Панова Л.И., Захарченко А.А. Современные требования к оценке элементных примесей (тяжелых металлов) в лекарственных средствах // Хим.-фарм. журнал. – 2018. – Т. 52. – №. 1. – С. 54-59.

96 Basotra M., Singh S.K., Gulati M. Development and validation of a simple and sensitive spectrometric method for estimation of cisplatin hydrochloride in tablet dosage forms: application to dissolution studies // Anal. Chem. – 2013. – V. 2013. – P. 1-8.

97 Yin G., Ma P., Zhang Q., Li P. The application of thioacetamide and Millipore membrane filter in heavy metals limit test // Yaowu Fenxi Zazhi. – 1989. – V. 9. – N. 5. – P. 316-318.

98 Mattiazzi P., Bohrer D., Becker E., Viana C., Nascimento P.C., Carvalho L.M. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for screening elemental impurities in drugs to adhere to the new international guidelines // Talanta. – 2019. – V. 197. – P. 20-27.

99 Sugisawa K., Kaneko T., Sago T., Sato T. Rapid quantitative analysis of magnesium stearate in pharmaceutical powders and solid dosage forms by atomic absorption: method development and application in product manufacturing // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2009. – V. 49. – N. 3. – P. 858-861.

100 Lasztity A., Kelko-Levai A., Varga I., Zih-Perenyi K., Bertalan E. Development of atomic spectrometric methods for trace metal analysis of pharmaceuticals // Microchem. J. – 2002. – V. 73. – N. 1-2. – P. 59-63.

101 Zachariadis G.A., Raidou E.S., Themelis D.G., Stratis J.A. Determination of mineral content of active dry yeast used in pharmaceutical formulations // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2002. – V. 28. – N. 3-4. – P. 463-473.

102 Jia X., Wang T., Wu J. Determination of palladium by graphite furnace atomic absorption spectroscopy without matrix matching // Talanta. – 2001. – V. 54. – N. 4. – P. 741-751.

103 Orisakwe O.E., Nduka J.K. Lead and cadmium levels of commonly administered pediatric syrups in Nigeria: a public health concern? // Sci. Total Environ. – 2009. – V. 407. – N. 23. – P. 5993-5996.

104 Goncalves L.M.L., Costa I.M., Brito J.A.A. Assessment of metal elements in final drug products by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry // Anal. Methods. – 2011. – V. 3. – N. 7. – P. 1468-1470.

105 Marguá E., Fontas C., Buendía A., Hidalgo M., Queralt I. Determination of metal residues in active pharmaceutical ingredients according to European current legislation by using X-ray fluorescence spectrometry // J. Anal. At. Spectrom. – 2009. – V. 24. – N. 9. – P. 1253-1257.

-
- 106 Choudhury R., Kumar A., Reddy A., Garg A. Thermal neutron activation analysis of essential and trace elements and organic constituents in Trikatu: An ayurvedic formulation // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* – 2007. – V. 274. – N. 2. – P. 411-419.
- 107 Kamath S.U., Pemiah B., Rajan K.S., Krishnaswamy S., Sethuraman S., Krishnan U.M. Variations in physicochemical properties of a traditional mercury-based nanopowder formulation: Need for standard manufacturing practices // *Indian J. Pharm. Sci.* – 2014. – V. 76. – N. 6. – P. 495.
- 108 Hernández A. Determination of elemental levels in radiopharmaceuticals by instrumental neutron activation analysis // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* – 2001. – V. 249. – N. 3. – P. 657-661.
- 109 Menoutis J., Parisi A., Verma N. Study of the use of axial viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with ultrasonic nebulization for the determination of select elemental impurities in oral drug products // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2018. – V. 152. – P. 12-16.
- 110 Zachariadis G.A., Michos C.E. Development of a slurry introduction method for multi-element analysis of antibiotics by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using various types of spray chamber and nebulizer configurations // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2007. – V. 43. – N. 3. – P. 951-958.
- 111 Lam R., Salin E.D. Analysis of pharmaceutical tablets by laser ablation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and mass spectrometry (LA-ICP-AES and LA-ICP-MS) // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2004. – V. 19. – N. 7. – P. 938-940.
- 112 Jia X., Wang T., Bu X., Tu Q., Spencer S. Determination of ruthenium in pharmaceutical compounds by graphite furnace atomic absorption spectroscopy // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2006. – V. 41. – N. 1. – P. 43-47.
- 113 Simitchiev K., Stefanova V., Kmetov V., Andreev G., Kovachev N., Canals A. Microwave-assisted cloud point extraction of Rh, Pd and Pt with 2-mercaptobenzothiazole as preconcentration procedure prior to ICP-MS analysis of pharmaceutical products // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2008. – V. 23. – N. 5. – P. 717-726.
- 114 Tu Q., Wang T., Welch C.J. High-throughput metal screening in pharmaceutical samples by ICP-MS with automated flow injection using a modified HPLC configuration // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – V. 51. – N. 1. – P. 90-95.
- 115 Al-Ammar A.S., Northington J. Accuracy improvement in the determination of palladium in pharmaceuticals by eliminating volatility error when using ICP-MS coupled with direct introduction of sample dissolved in organic solvents // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2011. – V. 26. – N. 7. – P. 1531-1533.

-
- 116 Antes F.G., Mesko M.F., Barin J.S., Moreira C.M., Flores É.M., Dressler V.L. Development of multi-elemental method for quality control of parenteral component solutions using ICP-MS // *Microchem. J.* – 2011. – V. 98. – N. 1. – P. 144-149.
- 117 Dash K., Venkateswarlu G., Thangavel S., Rao S.V., Chaurasia S.C. Ultraviolet photolysis assisted mineralization and determination of trace levels of Cr, Cd, Cu, Sn, and Pb in isosulfan blue by ICP-MS // *Microchem. J.* – 2011. – V. 98. – N. 2. – P. 312-316.
- 118 Nam K.H., Isensee R., Infantino G., Putyera K., Wang X. Microwave-induced combustion for ICP-MS: a generic approach to trace elemental analyses of pharmaceutical products // *Spectroscopy.* – 2011. – V. 26. – N. 4. – P. 36-41.
- 119 Lin M.L., Jiang S.J. Determination of trace Cr, Mo, Pd, Cd, Pt and Pb in drug tablets by ultrasonic slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2011. – V. 26. – N. 9. – P. 1813-1818.
- 120 Venzago C., Popp M., Kovac J., Kunkel A. Pharmacopeial requirements for elemental impurities: a novel approach to the trace determination of osmium by oxidative pressure vessel sample digestion and measurement using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after complexation and stabilisation // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2013. – V. 28. – N. 7. – P. 1125-1129.
- 121 Fischer L., Zipfel B., Koellensperger G., Kovac J., Bilz S., Kunkel A., Venzago C., Hann S. Flow injection combined with ICP-MS for accurate high throughput analysis of elemental impurities in pharmaceutical products according to USP< 232>/< 233 > // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2014. – V. 95. – P. 121-129.
- 122 Rudovica V., Viksna A., Actins A. Application of LA-ICP-MS as a rapid tool for analysis of elemental impurities in active pharmaceutical ingredients // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2014. – V. 91. – P. 119-122.
- 123 Barin J.S., Tischer B., Picoloto R.S., Antes F.G., Da Silva F.E., Paula F.R., Flores E.M. Determination of toxic elements in tricyclic active pharmaceutical ingredients by ICP-MS: a critical study of digestion methods // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2014. – V. 29. – N. 2. – P. 352-358.
- 124 Muller A.L., Oliveira J.S., Mello P.A., Muller E.I., Flores E.M. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements // *Talanta.* – 2015. – V. 136. – P. 161-169.
- 125 Kaczala S., Costa A.B., Posselt E.L., Barin J.S., Flores E.M., Dressler V.L. Element determination in pharmaceuticals using direct solid analysis-electrothermal vaporization inductively

coupled plasma optical emission spectrometry // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2015. – V. 26. – N. 3. – P. 475-483.

126 Wollein U., Bauer B., Habernegg R., Schramek N. Potential metal impurities in active pharmaceutical substances and finished medicinal products—A market surveillance study // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2015. – V. 77. – P. 100-105.

127 Begu E., Snell B., Arslan Z. Simultaneous separation of arsenic and cadmium from interfering salt matrix of multivitamin/mineral supplements by sequential coprecipitation and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry // *Microchem. J.* – 2019. – V. 145. – P. 412-418.

128 Welz B., Sperling M. *Atomic absorption spectrometry.* – John Wiley & Sons, 2008.

129 Rousseau R.M. Detection limit and estimate of uncertainty of analytical XRF results // *Rigaku J.* – 2001. – V. 18. – N. 2. – P. 33-47.

130 Santoso M., Lestiani D.D., Markwitz A., Hopke P.K. Nuclear analytical techniques INAA and PIXE application for characterization of airborne particulate matter in Indonesia // *J. Appl. Sci. Environ. Sanitation.* – 2010. – V. 5. – N. 2. – P. 213-222.

131 Vysetti B., Vummiti D., Roy P., Taylor C., Kamala C.T., Satyanarayanan M., Kar P., Subramanyam A.K., Raju A.K., Abburi K. Analysis of geochemical samples by microwave plasma-AES // *At. Spectrosc.* – 2014. – V. 35. – N. 2. – P. 65-78.

132 Hou X., Jones B.T. Inductively coupled plasma/optical emission spectrometry // *Encyclopedia of analytical chemistry.* – 2000. – V. 11. – P. 9468-9485.

133 Balaram V., Rao T.G. Rapid determination of REEs and other trace elements in geological samples by microwave acid digestion and ICP-MS // *At. Spectrosc.* – 2003. – V. 24. – N. 6. – P. 206-212.

134 Tu Q., Wang T., Antonucci V. High-efficiency sample preparation with dimethylformamide for multi-element determination in pharmaceutical materials by ICP-AES // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – V. 52. – N. 2. – P. 311-315.

135 Maciel J.V., Knorr C.L., Flores E.M., Müller E.I., Mesko M.F., Primel E.G., Duarte F.A. Feasibility of microwave-induced combustion for trace element determination in *Engraulis anchoita* by ICP-MS // *Food Chem.* – 2014. – V. 145. – P. 927-931.

136 Matusiewicz H. *Wet digestion methods.* – Wilson & Wilson's. – 2003. – V. 41. – 1286 pp.

137 Van Hoecke K., Catry C., Vanhaecke F. Optimization of sample preparation and a quadrupole ICP-MS measurement protocol for the determination of elemental impurities in pharmaceu-

tical substances in compliance with USP guidelines // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2012. – V. 27. – N. 11. – P. 1909-1919.

138 Flores É.M., Barin J.S., Mesko M.F., Knapp G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels—a brief overview and recent applications // *Spectrochim. Acta, Part B* – 2007. – V. 62. – N. 9. – P. 1051-1064.

139 Muller A.L., Mello P.A., Mesko M.F., Duarte F.A., Dressler V.L., Muller E.I., Flores E.M. Bromine and iodine determination in active pharmaceutical ingredients by ICP-MS // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2012. – V. 27. – N. 11. – P. 1889-1894.

140 Da Silva S.V., Picoloto R.S., Flores E.M.M., Wagner R., Dos Santos Richards N.S.P., Barin J.S. Evaluation of bromine and iodine content of milk whey proteins combining digestion by microwave-induced combustion and ICP-MS determination // *Food Chem.* – 2016. – V. 190. – P. 364-367.

141 Flores E.M., Muller E.I., Duarte F.A., Grinberg P., Sturgeon R.E. Determination of trace elements in fluoropolymers after microwave-induced combustion // *Anal. Chem.* – 2012. – V. 85. – N. 1. – P. 374-380.

142 Jin C. Clean chemistry for elemental impurities analysis of pharmaceuticals in compliance with USP 232 // *AAPS Pharm. Sci. Tech.* – 2016. – V. 17. – N. 5. – P. 1141-1149.

143 Tian H., Sun D., Dou G., Yuan D., Meng Z. Quantitative determination of β , β -dimethylacrylshikonin (DASK) in rat whole blood by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with pre-column derivatization and its pharmacokinetic application // *Biomed. Chromatogr.* – 2009. – V. 23. – N. 4. – P. 365-370.

144 Bianco G., Buchicchio A., Lelario F., Cataldi T.R. Molecular formula analysis of fragment ions by isotope-selective collision-induced dissociation tandem mass spectrometry of pharmacologically active compounds // *J. Mass Spectrom.* – 2014. – V. 49. – N. 12. – P. 1322-1329.

145 Ji B., Zhao Y., Zhang Q., Wang P., Guan J., Rong R., Yu Z. Simultaneous determination of cinnamaldehyde, cinnamic acid, and 2-methoxy cinnamic acid in rat whole blood after oral administration of volatile oil of *Cinnamoni Ramulus* by UHPLC-MS/MS: An application for a pharmacokinetic study // *J. Chromatogr. B* – 2015. – V. 1001. – P. 107-113.

146 Rudzki P.J., Gniazdowska E., Buś-Kwaśnik K. Quantitative evaluation of the matrix effect in bioanalytical methods based on LC–MS: A comparison of two approaches // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2018. – V. 155. – P. 314-319.

-
- 147 Ahmad N., Ahmad R., Alam M.A., Ahmad F.J. Enhancement of oral bioavailability of doxorubicin through surface modified biodegradable polymeric nanoparticles // *Chem. Cent. J.* – 2018. – V. 12. – N. 1. – P. 65.
- 148 Shi Y., Rankin M.M., Norquay L.D., Weng N., Patel S. Bioanalysis of sulprostone, a prostaglandin E2 analogue and selective EP3 agonist, in monkey plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B* – 2018. – V. 1092. – P. 51-57.
- 149 Bollen P.D., De Graaff-Teulen M.J., Schalkwijk S., Van Erp N.P., Burger D.M. Development and validation of an UPLC-MS/MS bioanalytical method for simultaneous quantification of the antiretroviral drugs dolutegravir, elvitegravir, raltegravir, nevirapine and etravirine in human plasma // *J. Chromatogr. B* – 2019. – V. 1105. – P. 76-84.
- 150 Sharma P.K., Avula B., Panda A., Wang Y.H., Khan I.A., Murthy S.N. A sensitive bioanalytical method for quantitative determination of resiniferatoxin in rat plasma using ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and its application in pharmacokinetic study // *Pharm. Biomed. Anal.* – 2019. – V. 165. – P. 284-291.
- 151 Chen J., Korfmacher W.A., Hsieh Y. Chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for stereoisomeric pharmaceutical determinations // *J. Chromatogr. B* – 2005. – V. 820. – N. 1. – P. 1-8.
- 152 Yuan L., Zhang D., Jemal M., Aubry A.F. Systematic evaluation of the root cause of non-linearity in liquid chromatography/tandem mass spectrometry bioanalytical assays and strategy to predict and extend the linear standard curve range // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2012. – V. 26. – N. 12. – P. 1465-1474.
- 153 Yamaguchi J.I., Hachiuma K., Kimura Y., Ogawa N., Higuchi S. Highly sensitive determination of TS-962 (HL-004), a novel acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor, in rat and rabbit plasma by liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry combined with a column-switching technique // *J. Chromatogr. B* – 2001. – V. 750. – N. 1. – P. 99-108.
- 154 Trivedi R.K., Layek B., Kumar T.S., Vittal S., Ganneboina R., Dubey P.K., Mullangi R., Srinivas N.R. Chiral bioanalysis of torcetrapib enantiomers in hamster plasma by normal-phase liquid chromatography and detection by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry // *J. Chromatogr. B* – 2007. – V. 860. – N. 2. – P. 227-234.
- 155 Coulter C., Crompton K., Moore C. Detection of phencyclidine in human oral fluid using solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection // *J. Chromatogr. B* – 2008 – V. 863. – N. 1. – P. 123-128.

-
- 156 Khatal L., Gaur A., Naphade A., Kandikere V., Mookhtiar K. Impact of APCI ionization source in liquid chromatography tandem mass spectrometry based tissue distribution studies // *Biomed. Chromatogr.* – 2016. – V. 30. – N. 10. – P. 1676-1685.
- 157 Kazakevich Y.V., Lohbrutto R. HPLC for pharmaceutical scientists. – John Wiley & Sons, 2007.
- 158 Iqbal M., Ezzeldin E., Al-Rashood K.A., Asiri Y.A., Rezk N.L. Rapid determination of canagliflozin in rat plasma by UHPLC–MS/MS using negative ionization mode to avoid adducts formation // *Talanta.* – 2015. – V. 132. – P. 29-36.
- 159 Ke E.E., Wu Y.L. Afatinib in the first-line treatment of epidermal-growth-factor-receptor mutation-positive non-small cell lung cancer: a review of the clinical evidence // *Ther. Adv. Respir. dis.* – 2016. – V. 10. – N. 3. – P. 256-264.
- 160 Sparidans R.W., Van Hoppe S., Rood J.J., Schinkel A.H., Schellens J.H., Beijnen J.H. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay for the tyrosine kinase inhibitor afatinib in mouse plasma using salting-out liquid–liquid extraction // *J. Chromatogr. B* – 2016. – V. 1012. – P. 118-123.
- 161 Upadhyay V., Trivedi V., Shah G., Yadav M., Shrivastav P.S. Rapid and Sensitive UPLC–MS/MS Determination of Tacrolimus in Wistar Rats and Human Blood // *J. Chromatogr. Sci.* – 2012. – V. 52. – N. 1. – P. 59-67.
- 162 Park J.S., Cho H.R., Kang M.J., Choi Y.S. A rapid and sensitive method to determine tacrolimus in rat whole blood using liquid–liquid extraction with mild temperature ultrasonication and LC–MS/MS // *Arch. Pharmacol. Res.* – 2016. – V. 39. – N. 1. – P. 73-82.
- 163 Rogachev A.D., Yarovaya O.I., Ankov S.V., Khvostov M.V., Tolstikova T.G., Pokrovsky A.G., Salakhutdinov N.F. Development and validation of ultrafast LC–MS/MS method for quantification of anti-influenza agent camphene in whole rat blood using dried blood spots and its application to pharmacokinetic studies // *J. Chromatogr. B* – 2016 – V. 1036. – P. 136-141.
- 164 Harris H.M., Sufka K.J., Gul W., ElSohly M.A. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on cisplatin-induced neuropathy in mice // *Planta Med.* – 2016. – V. 82. – N. 13. – P. 1169-1172.
- 165 Reddy D.S. The utility of cannabidiol in the treatment of refractory epilepsy // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2017. – V. 101. – N. 2. – P. 182-184.
- 166 Merrick J., Lane B., Sebree T., Yaksh T., O'Neill C., Banks S.L. Identification of psychoactive degradants of cannabidiol in simulated gastric and physiological fluid // *Can. J. Res.* – 2016. – V. 1. – N. 1. – P. 102-112.

167 Palazzoli F., Citti C., Licata M., Vilella A., Manca L., Zoli M., Vandelli M.A., Forni F., Cannazza G. Development of a simple and sensitive liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC–MS/MS) method for the determination of cannabidiol (CBD), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites in rat whole blood after oral administration of a single high dose of CBD // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2018. – V. 150. – P. 25-32.

168 Cui H., Hu Y., Hong C., Hu G., Fan L. A 15 years study of the causes of death among elderly hypertensive patients in a hospital-based sample of China // *Arch. Gerontol. Geriatr.* – 2012. – V. 55. – N. 3. – P. 709-712.

169 Wang Y., Zhao L., Li T., Yang W., Li Q., Sun L., Ding L. Pharmacokinetics and tissue distribution study of clevidipine and its primary metabolite H152/81 in rats // *Biomed. Chromatogr.* – 2018. – V. 32. – N. 2. – P. 40-48.

170 Martin J., Deslandes G., Dailly E., Renaud C., Reliquet V., Raffi F., Jolliet P. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for quantification of nevirapine, indinavir, atazanavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, lopinavir, efavirenz, tipranavir, darunavir and maraviroc in the plasma of patients infected with HIV // *J. Chromatogr. B* – 2009. – V. 877. – N. 27. – P. 3072-3082.

171 Ter Heine R., Alderden-Los C.G., Rosing H., Hillebrand M.J., Van Gorp E.C., Huitema A.D., Beijnen J.H. Fast and simultaneous determination of darunavir and eleven other antiretroviral drugs for therapeutic drug monitoring: method development and validation for the determination of all currently approved HIV protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2007. – V. 21. – N. 15. – P. 2505-2514.

172 Jung B.H., Rezk N.L., Bridges A.S., Corbett A.H., Kashuba A.D. Simultaneous determination of 17 antiretroviral drugs in human plasma for quantitative analysis with liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Biomed. Chromatogr.* – 2007. – V. 21. – N. 10. – P. 1095-1104.

173 Penchala S.D., Fawcett S., Else L., Egan D., Amara A., Elliot E., Challenger E., Back D., Boffito M., Khoo S. The development and application of a novel LC–MS/MS method for the measurement of Dolutegravir, Elvitegravir and Cobicistat in human plasma // *J. Chromatogr. B* – 2016. – V. 1027. – P. 174-180.

174 Hayashi H., Kita Y., Iihara H., Yanase K., Ohno Y., Hirose C., Yamada M., Todoroki K., Kitaichi K., Minatoguchi S., Itoh Y. Simultaneous and rapid determination of gefitinib, erlotinib and afatinib plasma levels using liquid chromatography/tandem mass spectrometry in patients with non-small-cell lung cancer // *Biomed. Chromatogr.* – 2016. – V. 30. – N. 7. – P. 1150-1154.

175 Saibaba S.V., Pilli N.R., Bimireddy B.P.K., Pandiyan P.S. A novel and rapid LC–MS/MS assay method for the determination of canagliflozin in human plasma by solid phase extraction technique and its application to a pharmacokinetic study // J. Pharm. Sci. – 2018. – V. 4. – N. 2. – P. 131-138.

176 Nelms S. Multi-element determination in pharmaceutical preparations using the Thermo Scientific iCAP Q ICP-MS // Mercury. – 2012. – V. 1. – N. 3.75. – P. 5-7.

177 Støvning C., Jensen H., Gammelgaard B., Stürup S. Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2013. – V. 84. – P. 209-214.

178 Wills J., Kutscher D. Analysis of Pharmaceutical Products for their Elemental Impurities with the Thermo Scientific iCAP RQ ICP-MS // Power (W). – 2016. – V. 1. – N. 15. – P. 200-209.

179 The United States Pharmacopeia XXXX. <233> Elemental impurities – procedures / Rockville MD, 2017. – Режим доступа: <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c233.pdf>

180 Эрмер Й., Миллер Д. Валидация методик в фармацевтическом анализе: примеры наилучшей практики // М.: Группа компаний ВИА-ЛЕК. – 2013.

181 Baishya G., Sarmah B., Hazarika N. An environmentally benign synthesis of octahydro-2H-chromen-4-ols via modified montmorillonite K10 catalyzed Prins cyclization reaction // Synlett. – 2013. – Т. 24. – N. 09. – С. 1137-1141.

182 Губен И. Методы органической химии. – Directmedia, 2016.

183 Ластовка А.В., Фадеева В.П., Ильина И.В., Курбакова С.Ю., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф. Исследование физико-химических свойств и разработка методики количественного определения (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ола, обладающего высокой анальгетической активностью // Зав. лаб. Диагностика материалов. – 2017. – Т. 83. – № 10. С. 11-17.

184 Ластовка А.В., Фадеева В.П., Ильина И.В., Салахутдинов Н.Ф. Аналитический контроль производного (-)-изопулегола – соединения с анальгетической активностью по показателям «примеси» и «действующее вещество» // Хим.-фарм. Журнал. – Принята к печати.

185 Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. – Рипол Классик, 2013.

186 Белоцерковская В.Ю., Яковлева Е.Ю. Хроматографические свойства поли(1-триметилсилил-1-пропина) // Журн. Физ. Химии. – 2011. – Т. 85. – №. 5. – С. 939-944.

-
- 187 Patrushev Y.V., Yakovleva E.Y., Shundrina I.K., Ivanov D.P., Glazneva T.S. The properties of capillary columns with sorbents based on poly-(1-trimethylsilyl-1-propyne) modified with nitrous oxide // *J. Chromatogr. A* – 2015. – V. 1406. – P. 291-298.
- 188 Яковлева Е.Ю., Патрушев Ю.В., Пай З.П. Капиллярные колонки с сорбентом на основе модифицированного поли(1-триметилсилил-1-пропина) для элюирующего анализа природного газа // *Журн. Физ. Химии.* – 2018. – Т. 92. – №. 5. – С. 824-830.
- 189 Ластовка А.В., Яковлева Е.Ю., Коллегов В.Ф., Фадеева В.П., Салахутдинов Н.Ф. Определение остаточных органических растворителей методом газовой хроматографии в субстанции (2*R*,4*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-диметил-2-(тиофен-2-ил)октагидро-2*H*-хромен-4-ол, обладающей анальгетической активностью // *Зав. лаб. Диагностика материалов.* – 2018. – Т. 84. – № 9. С. 13-20.
- 190 Lastovka A.V., Fadeeva V.P., Bazhenov M.A., Tikhova V.D. Rapid Determination of Tellurium in Tellurium-Containing Organic Compounds by Microwave Plasma – Atomic Emission Spectrometry // *Orient. J. Chem.* – 2017. – V. 33. – N. 6. – P. 2796-2802.
- 191 Михеев И.В., Карпухина Е.А., Усольцева Л.О., Самарина Т.О., Волков Д.С., Проскурнин М.А. Применение атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой и генерацией гидридов для определения мышьяка и селена в минеральной воде // *Зав. Лаб. Диагностика материалов.* – 2016. – Т. 82. – №. 6. – С. 5-9.
- 192 Osteresch B., Cramer B., Humpf H.U. Analysis of ochratoxin A in dried blood spots– Correlation between venous and finger-prick blood, the influence of hematocrit and spotted volume // *J. Chromatogr. B* – 2016. – V. 1020. – P. 158-164.
- 193 Salis E.R., Reith D.M., Broadbent R.S., Medlicott N.J. Haematocrit influences insulin concentration measurements in dried blood spots // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* – 2016. – V. 29. – N. 19. – P. 3208-3211.
- 194 Kumar R., Malik A.K., Kabir A., Furton K.G. Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection // *J. Chromatogr. A* – 2014. – V. 1359. – P. 16-25.
- 195 Locatelli M., Kabir A., Innosa D., Lopatriello T., Furton K.G. A fabric phase sorptive extraction-High performance liquid chromatography-Photo diode array detection method for the determination of twelve azole antimicrobial drug residues in human plasma and urine // *J. Chromatogr. B* – 2017. – V. 1040. – P. 192-198.
- 196 Kabir A., Furton K.G., Tinari N., Grossi L., Innosa D., Macerola D., Tartaglia A., Di Donato V., D'Ovidio C., Locatelli, M. Fabric phase sorptive extraction-high performance liquid chroma-

tography-photo diode array detection method for simultaneous monitoring of three inflammatory bowel disease treatment drugs in whole blood, plasma and urine // *J. Chromatogr. B* – 2018. – V. 1084. – P. 53-63.

197 Lastovka A.V., Rogachev A.D., Il'ina I.V., Kabir A., Volcho K.P., Fadeeva V.P., Pokrovsky A.G., Furton K.G., Salakhutdinov N.F. Comparison of dried matrix spots and fabric phase sorptive extraction methods for quantitation of highly potent analgesic activity agent (2*R*,4*aR*,7*R*,8*aR*)-4,7-dimethyl-2-(thiophen-2-yl)octahydro-2*H*-chromen-4-ol in rat whole blood and plasma using LC–MS/MS // *J. Chromatogr. B* – 2019. – V. 1132. – P. 121813.