

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В СОЗДАНИИ И КОНТРОЛЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В УКРАИНЕ

В.П. Георгиевский

*ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств»
61085, Харьков, ул. Астрономическая, 33
bekas1937@mail.ru*

Представлен краткий обзор истории создания хроматографических методов в химическом анализе.

Рассмотрены теоретические основы стандартизации хроматографических методов (ТСХ, ВЭЖХ, ГХ, МЖХ).

На конкретных примерах показано применение каждого из хроматографических методов при контроле качества лекарственных средств и лекарственного растительного сырья.

Отмечена решающая роль хроматографических методов при аналитическом обеспечении Фармацевтической разработки.

Ключевые слова: хроматографические методы, контроль качества, лекарственные средства, валидация, фармацевтическая разработка.

1. Краткий обзор истории создания хроматографических методов.

Хроматография относится к выдающимся открытиям прошедшего столетия, которые преобразовали жизнь человечества, все научные достижения химии, физики, создание новых материалов, вычислительной техники и, конечно, биологии, медицины и фармации. Особо следует отметить, что большинство работ, удостоенных Нобелевских премий в перечисленных областях не были бы выполнены без применения хроматографии. Это работы по химии каротиноидов, флавонов, витаминов А и В (П.Каррер, К.Кун – 1937-1938 г.), полипептидов и высших терпенов, выделения половых гормонов (Л.Ружичка, А.Буденант – 1939 г.), адренкортикоидных гормонов (Т.Рейхштейн, Р.Хейнч, Е.Кандел – 1950 г.), работы по гормонам гипофиза и синтезу полипептидных гормонов (В.Дью-Винью – 1955 г.), структуре инсулина (Ф.Сенгер – 1958 г.), исследования в области химической структуры рибонуклеазы (К.Анфинсен, С.Мур, В.Стейн – 1972 г.) [1,2].

Создателем же этого метода является русский ботаник и биохимик Михаил Семенович Цвет, который на заседании общества естествоиспытателей 14 марта 1903 года сделал доклад об открытии нового метода разделения сложных смесей «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу» [3]. Объектами исследования были природные вещества, содержащиеся в растениях. В дальнейшем изложение М.С.Цветом нового открытия было опубликовано в монографии «Хлорофиллы в растительном и животном мире» [4] и еще 62 научных работах, в которых были сформулированы методические основы метода, введены основные понятия и термины нового метода – «хроматография», «хроматограмма», «проявление», «вытеснение». Он изучил пригодность свыше 120 адсорбентов, впервые провел «модификацию» адсорбентов нагреванием. Хроматографический метод М.С.Цвет применил для количественного анализа, предусмотрев введение реперных компонентов с целью идентификации бесцветных веществ [5]. Для получения отдельных соединений им была указана возможность изменения подвижной фазы в ходе хроматографического процесса (градиентное элюирование), а также показана высокая результативность многокомпонентных вариантов

хроматографии [6]. Также разработал аппаратуру для жидкостной хроматографии. Подчеркнем, что высказанное М.С. Цветом мнение о необходимости подвергать хроматографическому анализу все пигменты для установления их состава [4] в дальнейшем было положено в основу для идентификации БАВ при всех хроматографических исследованиях состава лекарственного растительного сырья и ЛС, что было отмечено Нобелевскими премиями, указанными выше.

Расширением исследований по хроматографии явилось открытие Харьковскими учеными – сотрудниками Института Экспериментальной Фармации (в дальнейшем — ХНИХФИ, ВНИИХТЛС, ГНЦЛС) Николаем Аркадьевичем Измайловым и Мариам Симховной Шрайбер *тонкослойной хроматографии* — новой формой реализации хроматографического процесса, когда подвижная фаза заключена не в колонке, а имеет форму плоского слоя. Работа «Капельно-хроматографический метод анализа и его применение в фармации» была опубликована в 1938 году в журнале «Фармация» [7]. В выводах статьи авторы отметили, что в разработанном ими методе «разделения веществ по зонам наблюдается в тонком слое сорбента», что фактически является определением тонкослойной хроматографии, в которой в качестве неподвижной фазы используется тонкий слой сорбента, нанесенный на плоскую подложку. Воспроизведение первой работы Н.А.Измайлова и М.С.Шрайбер приведенные в одноименной статье в брошюре «Н.А. Измайлов и М.С. Шрайбер «Открытие тонкослойной хроматографии» [8] позволили Березкину А.Г. сделать вывод: «результаты анализа позволяют утверждать, что в работе впервые описана не только ТСХ (на незакрепленном слое сорбента), что является общепризнанным, но также следующие ее важные варианты: 1) круговая ТСХ, 2) фронтальная круговая ТСХ, 3) элюэнтная круговая ТСХ и 4) вариант фронтально-элюэнтной круговой ТСХ». В качестве адсорбентов были использованы как пластины с закрепленным слоем фирмы «Merk», так и пластины с незакрепленным слоем фирмы «Merk». Подвижной фазой служил этиловый спирт (ректификат).

В настоящее время приоритет Н.А. Измайлова и М.С. Шрайбер в открытии ТСХ подтверждается всеми исследователями, работающими в этой области, о чем свидетельствует монография Э.Шталя, в первом издании которой признан приоритет харьковских ученых, приведены цитаты и рисунки из их работы [9-10].

В 1941 году английскими исследователями А.Мартин и Р.Синж разработан метод жидкостно-жидкостной (распределительной) хроматографии для разделения смесей аминокислот, что в 1952 году было отмечено Нобелевской премией. В ходе исследования авторами было отмечена возможность применения в исследованиях в качестве носителя помимо силикагеля целлюлозы, что привело к созданию авторами бумажной хроматографии в 1944 году. Метод нашел широкое применение, о чем свидетельствует более 40 монографий по применению БХ, в анализе растительного сырья, БАВ, контроле качества лекарственных средств и освещен в капитальном труде чехословацких ученых под общей редакцией И.М.Хайса и К.Мацека «Хроматография на бумаге» [11], вышедшем в 1957 году и изданом на русском языке под ред. к.б.н. М.Н. Запрометова [12]. Книга состоит из 2-х частей – общей и специальной. В общей части приведена классификация хроматографических методов и проявления хроматограмм, а также краткий вывод основных уровней теории хроматографии, обсуждены вопросы связи между структурой. Рассмотрены физические, химические и биологические методы обнаружения пятен на хроматограммах, способы элюирования и методы количественного определения этих компонентов после их извлечения. Показана возможность препаративной хроматографии на бумаге и на полосках целлюлозы. В специальной части, которая составляет большую часть текста, рассмотрены случаи конкретного применения хроматографии на бумаге к отдельным

классам соединений (аминокислот, пептидов, углеводов, алкалоидов, стероидов, фенолов, ароматических и алифатических кислот, азотсодержащих гетероциклов, пуринов и пиримидинов). Бумажная хроматография сыграла большую роль в анализе лекарственных средств в 1944-1960 гг., но в дальнейшем была вытеснена тонкослойной хроматографией.

Знаменательной вехой в развитии хроматографии было создание А.Мартином и Э.Джеймсом в 1952-1953 гг. метода газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) и теории разделения веществ термин «теоретических тарелок».

В создании высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) приняли участие ряд ученых, но основную роль сыграли Ш. Хорват (США) и Дж. Кирклэнд (Великобритания), разработавшие независимо друг от друга основы метода ВЭЖХ, а Ш.Хорват создал первый высокоэффективный жидкостной хроматограф, предложил и развил ВЭЖХ с обращенной фазой.

Достаточно молодым методом как в варианте ТСХ, так и ВЭЖХ является мицеллярная хроматография, подвижной фазой в которой служат поверхностно-активные вещества (ПАВ), а стационарная фаза такая же как при ТСХ или ВЭЖХ. Развитие мицеллярной хроматографии как самостоятельного метода анализа началось в 1979-1983 гг. с работ Амстронга с соавторами [13-16], которого считают основателем этого метода. Ученого, научный интерес которого - исследования мицеллярного катализа и др. специфических эффектов мицеллярных растворов ПАВ. В настоящее время применение этого вида хроматографии связано не только с его эффективностью, но и решению задач «зеленой» химии – в сокращении использования опасных органических растворителей [17]. При этом замена опасных органических растворителей дает и экономический эффект, т.к. утилизация используемых неводных растворителей связана с дополнительными затратами.

Отдадим дань возможностям препаративного (технологического) применения хроматографии в получении БАВ методом ионообменной хроматографии - технологии получения алкалоидов (опийных, пуриновых, тропановых) [18-21] и полиамидных сорбентов, создании ряда фитопрепаратов, содержащих флавоноиды, кумарины, антрахиноны [22-24], терпеноиды [25], инсулины [26], фосфолипиды [27] а с созданием технологического оборудования с использованием препаративной ВЭЖХ [25]. Основным применением хроматографических методов в фармации и медицине является аналитика, а конкретнее — аналитическое обеспечение создания и контроля качества лекарственных средств (ЛС). Ни один аналитический метод не может конкурировать по эффективности разделения сложных многокомпонентных систем, а также по универсальности и широте применения. Это послужило основой применения хроматографических методов в контроле производства ЛС: анализ исходного сырья, анализ продуктов на всех технологических стадиях, анализ и контроль вредных веществ в производственных помещениях и их выброса в атмосферу, анализ чистоты оборудования, контроль качества готовых ЛС, в т.ч. и установление их стабильности, сроков годности и условий хранения. Также – применения хроматографии при проведении фармако-кинетических исследований и изучении метаболизма БАВ при создании готовых лекарственных форм (ГЛФ) с оптимальным составом действующих и вспомогательных веществ, доказательство биоэквивалентности препаратов-генериков, что будет рассмотрено далее.

Методы хроматографического разделения введены как Общие Статьи «Физические и физико-химические методы анализа» в ЕФ и ГФУ Дополнение 3, что дает возможность применять общие требования для всех хроматографических методов, а принципы разделения, оборудование и методики описаны в Общих статьях.

2. Теоретические основы стандартизации ТСХ, ВЭЖХ, ГХ

Начиная с открытия метода ТСХ харьковскими учеными Н.А. Измайловым и М.С. Шрайбер хроматографические методы получили развитие в стенах ГНЦЛС, Харьковского национального университета им. Каразина и Научно-экспертном фармакопейном центре, НИИ НАН Украины, НФаУ, Львовском и Запорожском медуниверситетах и др.

Основные направления, которые развиваются, связаны со стандартизацией хроматографических методов в аналитическом обеспечении создания и контроля качества лекарственных препаратов, выполнялись под руководством чл.-корр. НАН Украины В.П. Георгиевского, профессоров А. И. Гризодуба, Л. П. Логиновой и С. Н. Коваленко, ст.н.с. А. А. Зинченко, А. Ю. Куликова, Г. В. Георгиевского.

2.1. Тонкослойная и высокоэффективная жидкостная хроматография

В рамках выполнения этой задачи развивались следующие основные направления:

1. Стандартизация подвижных фаз (ПФ).
2. Оптимизация разделения.
3. Характеристика сорбентов и ПФ по механизму хроматографического разделения.
4. Создание единого элюотропного ряда однокомпонентных и многокомпонентных ПФ.
5. Стандартизация ТСХ-пластин для фармакопейного анализа.
6. Воспроизводимость величин R_f .

2.1.1. Стандартизация ПФ

Предложено понятие функциональной устойчивости (ФУ) бинарной подвижной фазы (ПФ) и введена функция устойчивости [34], которая для ТСХ характеризует процентную долю изменения значений R_f на участке от 0 до 0,1 объемной доли активного компонента ПФ в разнице значений R_f в двух чистых растворителях 1 и 2:

Чем меньше величина ФУ, тем более устойчивы (и воспроизводимы), при прочих равных условиях, значения R_f данного соединения в данной бинарной ПФ на данном сорбенте. С этой точки зрения, например, значения R_f в бинарных ПФ гептан-бензол гораздо устойчивее и воспроизводимее, чем бинарных ПФ бензол-этилацетат.

$$\Phi_U = \frac{R_f(0.1) - R_{f1}}{R_{f2} - R_{f1}} \cdot 100\% \quad (1)$$

Аналогичное (1) выражение для ФУ через объемы удерживания имеется и для колоночной хроматографии.

Функциональную устойчивость необходимо обязательно учитывать при разработке методик ТСХ для введения их в аналитические нормативные документы (АНД). В противном случае, величины R_f будут плохо воспроизводиться в разных лабораториях.

2.1.2. Оптимизация разделения

2.1.2.1. Бинарные подвижные фазы

Теоретически обосновано и экспериментально подтверждено существование линейной зависимости между величинами R_M двух разных соединений (X и Y) при изменении состава бинарной ПФ [34-36]:

$$R_M^Y = k \cdot R_M^X + b \quad (2)$$

Линейная зависимость (2) хорошо выполняется в различных бинарных ПФ. Данное уравнение было использовано для оптимизации разделения в бинарных ПФ [34-36].

2.1.2.2. Трехкомпонентные подвижные фазы

Уравнение (2) позволило также получить важный теоретический вывод — улучшение разделения в трехкомпонентной ПФ 123 по сравнению с бинарными ПФ 12, 13 и 23 возможно только в том случае, если в этих бинарных ПФ имеются экстремумы удерживания [37]. Только в этом случае происходит расширение области значений R_M (а, значит, и улучшение разделения) по сравнению исходными бинарными ПФ. Этот результат обобщается и на большее число компонентов ПФ.

Данный теоретический вывод необходимо учитывать при выборе растворителей для многокомпонентных ПФ. Например, трехкомпонентная ПФ гептан-бензол-этилацетат не имеет преимуществ перед бинарными ПФ гептан-бензол, бензол-этилацетат и бензол-этилацетат, поскольку в этих бинарных ПФ не наблюдаются экстремумы R_M или R_f [37].

2.1.3. Характеристика сорбентов и ПФ по механизму хроматографического разделения

Для характеристики сорбентов и подвижных фаз по механизму хроматографического разделения были развиты Модель единого адсорбционного центра (МЕАЦ) и Концепция эффективной концентрации ПФ.

Данные модели (см. ниже) опираются на известное уравнение Сочевинского для бинарной ПФ [38, 44]:

$$R_M = \lg k' = a_0 - a_1 \cdot \lg C, \quad (3)$$

где C — концентрация активного компонента бинарной ПФ.

Учитывая, что согласно данным Шатца [40], прямые (3) для родственных соединений пересекаются в одной точке $[-b_1, b_0]$, т.е. между парами коэффициентов a_0 и a_1 разных веществ существует линейная корреляция:

$$a_0 = b_0 - b_1 \cdot a_1, \quad (4)$$

где параметры b_0 и b_1 — индивидуальны для каждого сорбента.

Были проведены экспериментальные исследования по применимости уравнения (3) для описания величин удерживания в бинарных ПФ.

2.1.3.1. Описание зависимости R_f — состав подвижной фазы при значении R_f в одном из растворителей, близком к нулю

Наиболее практически важным видом бинарных ПФ являются такие, в которых один из растворителей является разбавителем, т.е. значения R_f исследуемых соединений в нем близко к нулю. В этом случае наиболее просто регулировать удерживания исследуемых соединений. Показано, что для таких бинарных ПФ простое уравнение Сочевинского (3) лучше описывает экспериментальные зависимости удерживания от состава бинарной ПФ, чем более сложные уравнения Осцика и Снайдера-Яронека [40]. Это дало возможность опираться на уравнение (3) в дальнейших теоретических исследованиях.

2.1.3.2. Модель единого адсорбционного центра

Наиболее важными сорбентами в ВЭЖХ являются оксидные сорбенты (обычно силикагель) с привитыми органическими группами. Известно, что около половины поверхности оксидного сорбента остается незакрытой. Основываясь на этом теоретически обоснована **Модель единого адсорбционного центра (МЕАЦ)** [41, 42] — хроматографируемая молекула адсорбируется одновременно на нескольких типах адсорбционных центров. Эта модель приводит к уравнению, которое можно рассматривать как обобщенное уравнение Сочевинского для многокомпонентных ПФ:

$$R_M = \lg k' = a - \sum_{i=1}^n b_i \cdot \lg C_i \quad (5)$$

где C_i — концентрации компонентов n -компонентной ПФ.

Показано, что многомерные плоскости, описываемые данным уравнением для разных соединений в одной и той же многокомпонентной ПФ, пересекаются в одной точке $[-b_1, -b_2, \dots, -b_n, b_0]$ [41]:

$$a_0 = b_0 - \sum_{i=1}^n b_i \cdot a_i \quad (6)$$

где параметры b_0 и b_i – индивидуальны для каждого сорбента. Уравнение (6) является обобщением уравнения Шатца (4) для бинарных ПФ на случай многокомпонентных ПФ [44].

Уравнения (5-6) выполняются на всех типах привитых и непривитых сорбентов в различных многокомпонентных ПФ [41, 42, 43, 44].

Коэффициенты b_i имеют физический смысл парциальных элюирующих сил компонентов ПФ. Из уравнения (5) следует (и это подтверждается экспериментом [45]), что все компоненты многокомпонентной ПФ являются активными (хотя и в разной степени), и понятия «прямофазный» и «обращено-фазный» сорбенты носят условный характер. Коэффициенты b_i позволяют также количественно оценить хроматографическую гетерогенность сорбентов и могут быть использованы для их стандартизации.

2.1.4. Создание единого элюотропного ряда однокомпонентных и многокомпонентных ПФ

Теоретически обоснована и экспериментально подтверждена **Концепция эффективной концентрации** многокомпонентной ПФ [44]. Данная концепция основана на том предположении, что удерживание в многокомпонентной ПФ может быть описано простым уравнением Сочевинского (3) для бинарных ПФ, но только вместо концентрации активного компонента бинарной ПФ в этом уравнении фигурирует некая «эффективная» концентрация многокомпонентной ПФ в пересчете на один из компонентов этой ПФ.

Математически это означает следующее. В бинарных ПФ 12 и 13 выполняются линейные зависимости Сочевинского:

$$\begin{aligned} R_M(12) &= a_2 - b_2 \cdot \lg C_2 \\ R_M(13) &= a_3 - b_3 \cdot \lg C_3 \end{aligned} \quad (7)$$

С точки зрения Концепции эффективной концентрации, в этом случае удерживание в трехкомпонентной ПФ 123 описывается уравнением:

$$R_M(123) = a_2 - b_2 \cdot \lg C_{эфф} \quad (8)$$

Установлено, что эффективная концентрация трехкомпонентной ПФ $C_{эфф}$ находится из соотношения:

$$C_{эфф} = C_2 + 10^{(a_2 - a_3)/b_2} \cdot C_2^{(b_3/b_2)} \quad (9)$$

Эти уравнения могут обобщаться на случай любого числа компонентов ПФ.

Концепция эффективной концентрации позволяет не только прогнозировать величины удерживания в многокомпонентных ПФ по данным бинарных ПФ, но и построить единый элюотропный ряд однокомпонентных и многокомпонентных ПФ.

2.1.5. Стандартизация ТСХ-пластин для фармакопейного анализа

Было показано, что значения R_f на пластинках некоторых изготовителей могут очень сильно варьироваться в рамках одной пластинки (до 0.15), что делает такие пластинки непригодными для фармакопейного анализа [45]. Причиной этого является плохая стандартизация нанесения сорбента [45]. Для стандартизации сорбента по однородности величин R_f в рамках одной пластинки нами введен соответствующий тест в Государственную Фармакопею Украины (ГФУ). Различие R_f в рамках одной пластинки не должно превышать 0,02.

2.1.6. Воспроизводимость величин R_f

В результате большого межлабораторного исследования качества таблеток бисептола (все областные Госинспекции, 263 аптеки, 337 образцов, 128 серий, 8 производителей) было показано [46], что воспроизводимость величин R_f характеризуется следующими стандартными отклонениями: SD (внутри пластины) = 0,009, SD (между пластинами) = 0,031; SD (между лабораториями) = 0,11. Эти исследования подтверждают требования к однородности величин R_f внутри пластинок, введенные в ГФУ [45], и свидетельствуют о некорректности введения в настоящее время конкретных величин R_f в спецификации на лекарственные средства.

2.2. Газовая хроматография

Одним из важнейших показателей качества субстанций является контроль в них остаточных количеств органических растворителей.

Для контроля этого показателя в лаборатории фармакопейного анализа Фармакопейного центра была обоснована, разработана и введена в действие (1996 г.) общая статья «Летучие органические примеси» [47, 48], регламентирующая содержание 25 остаточных растворителей (ОР). В 2009 г. Статья «Остаточные количества органических растворителей» была введена в Дополнение 1 ГФУ и изложена в соответствии с Руководством по Регламентации остаточных количеств органических растворителей CHM/ICH/293/95 Guidelines for residual solvents (далее – остаточные растворители), устанавливающих пределы содержания растворителей, которые могут оставаться в субстанциях, вспомогательных веществах и ГЛС в результате производственного процесса. Остаточные растворители не имеют терапевтического действия, адекватного действию ЛС и должны удаляться до такой степени, чтобы удовлетворять требованиям спецификаций Надлежащей Производственной Практики (GMP) или другим требованиям по качеству содержаться в НТД, которые подтверждены данными по безопасности.

Приведен перечень растворителей, включенных в Руководство с указанием 3-х классов по степени токсичности:

- 1) растворители, использование которых следует избегать;
- 2) растворители, использование которых должно ограничиваться;
- 3) малотоксичные растворители, для которых не требуется устанавливать предел токсичности.

Приведенная схема испытаний при идентификации и определения предельного содержания остаточных растворителей включены в ГФУ [47, 49].

2.3. Валидация хроматографических методик контроля качества лекарственных средств

Сформулированы требования к воспроизводимости хроматографического сигнала в тесте «Пригодность хроматографической системы» при проведении количественного определения. Данные требования увязаны с допусками содержания, являются основой валидационных критериев и введены в ГФУ [48]. На основании этого были разработаны стандартные процедуры валидации хроматографических методик количественного определения [49], контроля примесей [48] и остаточных количеств органических растворителей [48]. Для существенного сокращения хроматографического времени при проведении количественного определения, тестов на однородность дозирования и растворение, была предложена метрологически обоснованная процедура проведения анализа [45-49].

Проведенные исследования послужили теоретической базой широкого внедрения хроматографических методов в спецификации на лекарственные средства и превращения их в рутинные методы фармакопейного анализа.

3. Теоретические основы МЖХ

3.1. Физико-химическая модель удерживания в мицеллярной жидкостной хроматографии

Группой сотрудников Харьковского университета под руководством профессора Л.П. Логиновой была предложена модель удерживания на основе квазихимической концепции мицеллообразования: основа модели приведена на рис. 1. Модель оказалась удачной как для описания хроматографического процесса, так и в предсказательной части – она позволяет проводить выбор и оптимизацию состава мицеллярной подвижной фазы, в том числе и за рамками проведенного предварительного эксперимента [50-53].

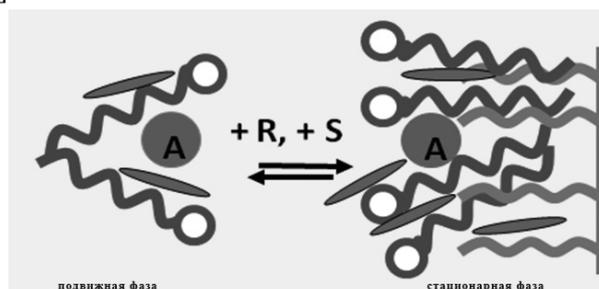


Рис.1. Распределение анализта (А) между мицеллой и модифицированной стационарной фазой в МЖХ

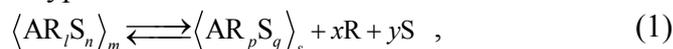
Предложенная модель изменения микроокружения сорбата основывается на следующих предположениях:

(1) сорбат А в подвижной фазе находится в мицеллах, содержащих органический модификатор, и «сольватирован» в мицеллярной псевдофазе l молекулами органического модификатора (R) и n мономерами ПАВ (S);

(2) на поверхности неподвижной фазы сорбат находится в некой «полумицелле» и «сольватирован» p молекулами органического модификатора и q мономерами ПАВ;

(3) органический модификатор R распределен между мицеллярной псевдофазой, водной фазой и модифицированной ПАВ стационарной фазой. Ввиду отсутствия коэффициентов распределения органического модификатора между водной и стационарной фазами, в модели делается предположение, что этот коэффициент равен коэффициенту распределения модификатора между водной фазой и мицеллярной псевдофазой.

Изменение количества молекул органического модификатора и ПАВ в окружении анализта при переходе последнего из подвижной фазы на поверхность стационарной можно представить уравнением:



где: $x = l - p$; $y = n - q$; x и y – коэффициенты, которые могут принимать как положительные, так и отрицательные значения; индексы m и s относятся к подвижной и стационарной фазам соответственно.

Уравнение закона действующих масс (ЗДМ) для реакции (1) может быть представлено как:

$$K = \frac{[AR_p S_q]_s [R]^x [S]^y}{[AR_l S_n]_m}, \quad (2)$$

где: $[S]$ и $[R]$ – молярные концентрации несвязанных органического модификатора и ПАВ в подвижной фазе; $[AR_l S_n]_m$ и $[AR_p S_q]_s$ – молярные концентрации

сольватированного/солюбилизированного анализита в подвижной и стационарной фазах, соответственно; K – константа ЗДМ.

Фактор удерживания k можно выразить как отношение количества анализита в стационарной фазе ($n(A)_s$) к количеству анализита в подвижной фазе ($n(A)_m$):

$$k = \frac{n(A)_s}{n(A)_m} = \frac{[AR_pS_q]_s}{[AR_lS_n]_m} \phi \quad (3)$$

Отношение $[AR_pS_q]_s$ к $[AR_lS_n]_m$ может быть переписано с учетом константы ЗДМ как:

$$\frac{[AR_pS_q]_s}{[AR_lS_n]_m} = K[R]^{-x}[S]^{-y} \quad (4)$$

Учитывая равновесие (1) можно записать основное уравнение модели удерживания:

$$\log k = \text{const} - x \log c_R + y \beta \log c_S + x \log(1 + (P-1) \nu_S (c_S - \text{CMC})) + y \beta \log(1 - \beta), \quad (5)$$

где: $\text{const} = y \log K' + \log K + \log \phi$ (K' – константа ЗДМ для реакции мицеллообразования ПАВ, K – константа ЗДМ для квазихимической реакции при переходе анализита с подвижной на стационарную фазу); c_R , c_S – концентрации модификатора и ПАВ, соответственно, в мицеллярном элюенте; CMC – критическая концентрация мицеллообразования; ν_S – мольный объем ПАВ (для SDS $\nu_S = 0.246$ моль/л [54]).

Определенные в работе [52, 53] значения параметров x и y оказались отрицательными, т.е. при переходе анализита из подвижной фазы на поверхность стационарной число молекул ПАВ и спирта-модификатора в его микроокружении увеличивается.

Уравнение (5) можно использовать для описания удерживания в МЖХ при одновременном варьировании, как концентрации ПАВ, так и концентрации органического модификатора, однако для этого необходимы независимые данные о характеристиках мицеллообразования в присутствии органических модификаторов.

В работах [55, 56] отмечены высокие линейные корреляции между $\log c_R$ и $\log(1 + (P-1) \nu_S (c_S - \text{CMC}))$, а также между $\beta \log c_S$ и $\beta \log(1 - \beta)$, что позволило предложить для описания удерживания анализита в МЖХ упрощенное эвристическое уравнение

$$\log k = a + b \log c_S + c \log c_R, \quad (6)$$

обладающее хорошей описательной и предсказательной способностью. Применимость физико-химической модели удерживания, основанной на квазихимической концепции мицеллообразования, показана для ряда фармацевтических препаратов сложной структуры (β -блокаторов и бенздиазепинов), представлена в работе [56]. Как и в работе [51], рассчитанные значения коэффициентов x и y для фармацевтических препаратов оказались отрицательными, что соответствует более плотному окружению анализитов молекулами модификатора и мономерами на поверхности стационарной фазы по сравнению с подвижной фазой [53].

3.2. Влияние динамически модифицированной стационарной фазы на хроматографическое поведение веществ в МЖХ

Хотя предложенная модель и позволяет описывать процессы в МЖХ, множество вопросов остается еще не изученными. Например, как выбрать состав подвижной фазы (подходы, предложенные в ОФ ВЭЖХ, оказались не рабочими в МЖХ). Также неизученным является вопрос о влиянии динамически модифицированной стационарной фазы на хроматографическое поведение веществ, который особенно

важен при воспроизводимости методик при использовании мицеллярной хроматографии.

Эти вопросы решены в работах Куликова А.Ю., выполненных в соавторстве с сотрудниками ГП «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств» и Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина при разработке методологических основ и практических рекомендаций по применению метода мицеллярной жидкостной хроматографии для одновременного определения гидрофильных и гидрофобных соединений в многокомпонентных смесях в изократическом режиме элюирования, а также повышение надежности воспроизводимости методик анализа биологически активных веществ по сравнению с аналогичными методиками ОФ ВЭЖХ [57].

При разработке теоретических основ применения МЖХ решены ряд вопросов в рамках развития и подтверждения предложенной модели изменения микроокружения сорбата, для определения селективности сорбентов с привитыми С8 и С18 группами, определены характеристики удерживания веществ, обоснованы параметры селективности разделения при разных механизмах удерживания, классифицированы колонки по выбранным критериям с применением различных хемометрических подходов [57, 58].

Для изучения свойств сорбентов с целью из дальнейшего сравнения Куликов А.Ю. использовал ранее предложенный подход в ОФ ВЭЖХ: взаимодействие аналит-стационарная фаза подразделяли на ряд взаимодействий, а для их определения используются вещества, при хроматографировании которых в их удерживании преобладает тот или иной тип взаимодействий. В таблице 1 представлены тестовые вещества, по данным удерживания которых были рассчитаны соответствующие показатели селективности для сорбентов на основе силикагеля с привитыми С18 и С8 группами.

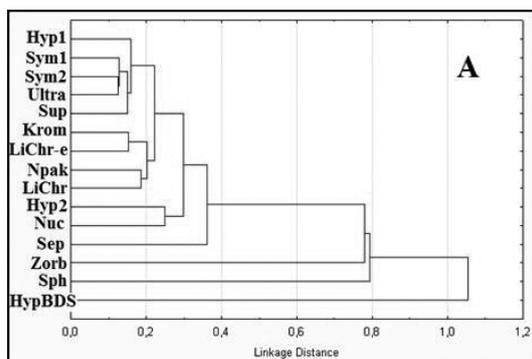
Таблица 1. Тестовые вещества, характеристики удерживания и параметры селективности для сравнения сорбентов

Тестовая смесь веществ	Характеристика удерживания или разделения	Показатель селективности разделения
Нафталин	k' нафталина	Гидрофобность
Антрацен	$\alpha_{\text{антрацен/нафталин}}$	Гидрофобная селективность
Этилбензол	$\alpha_{\text{этилбензол/толуол}}$	Метиленовая селективность
Толуол		
Бензойная кислота	$\alpha_{\text{бензойная к-та/сорбиновая к-та}}$	Стерическая селективность
Сорбиновая кислота		
Бензиловый спирт	$\alpha_{\text{бензиловый спирт/толуол}}$	Гидрофильная селективность
Фенол	$\alpha_{\text{фенол/кофеин}}$	Емкость водородных связей
Кофеин	$\alpha_{\text{анилин/фенол}}$	Ионообменная емкость
Анилин	$\alpha_{\text{фенол/бензиловый спирт}}$	Фенольная селективность
Мицеллярные подвижные фазы: 1) 0.075 моль/л ДСН, 1.5 % (об.) 1-пентанола (рН=6.9); 2) 0.075 моль/л ДСН, 1.5 % (об.) 1-пентанола, $6.5 \cdot 10^{-3}$ моль/л трифторуксусной кислоты (рН=2.7); 3) 0.02 моль/л Вгіj®-35, 1.5 % (об.) 1-РеОН в 0.025М фосфатном буферном растворе рН 7.5 ; 4) 0.02 моль/л Вгіj®-35, 1.5 % (об.) 1-РеОН в 0.025М фосфатном буферном растворе рН 2.5		

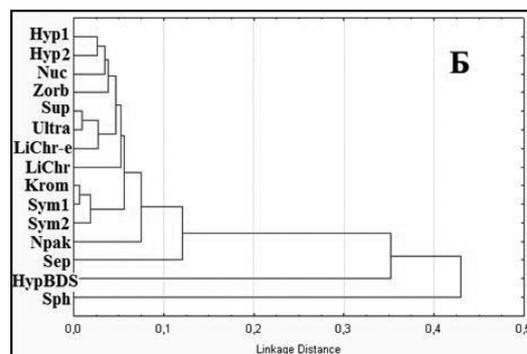
В качестве хемометрического подхода для обработки данных был использован кластерный анализ, который позволяет представить результаты сравнения в виде

дендрограммы. На рис. 2 приведены дендрограммы, полученные при изучении селективности сорбентов в МЖХ. Дендрограмма А характеризует хроматографическую систему «в целом» (включает все параметры селективности), а дендрограмма Б показывает похожесть сорбентов, и включает те показатели селективности, которые в большей степени характеризуют стационарную фазу. Отмечено, что похожесть большинства сорбентов находится на уровне 0.1 эвклидова расстояния (сорбент Spherisorb проявлял аномальное поведение при всех исследованиях, причину которых установить не удалось). Чтобы понять – много это или мало, было проведено дополнительное исследование.

Используя протокол тестирования Танаки [59] с некоторыми модификациями были протестированы те же сорбенты в режиме ОФ ВЭЖХ, рассчитаны соответствующие показатели селективности и построены дендрограммы аналогичности сорбентов. Как видно на рис. 3, дендрограммы, которые характеризуют хроматографическую систему «в целом», практически одинаковы для МЖХ и ОФ ВЭЖХ. Это можно объяснить тем, что при использовании додецилсульфата натрия как мицеллообразующего ПАВ в МЖХ значительное влияние на хроматографическое поведение веществ оказывают ионообменные взаимодействия, полностью исключить которые невозможно.



А: гидрофобность, гидрофобная селективность, метиленовая селективность, стерическая селективность, гидрофильность, емкость водородных связей (МПФ 1 и 2), ионообменная емкость (МПФ 2), фенольная селективность



Б: гидрофобность, гидрофобная селективность, метиленовая селективность, стерическая селективность, гидрофильность

Рис. 2. Дендрограммы, характеризующие похожесть сорбентов в МЖХ: а) характеристика хроматографической системы «в целом»; б) характеристика стационарной фазы

Дендрограммы, которые характеризуют свойства сорбента (рис. 3), свидетельствуют о существенном различии между ОФ ВЭЖХ и МЖХ. Для сорбентов в условиях МЖХ нет сильного различия в свойствах поверхности, как это наблюдается в ОФ ВЭЖХ. Следовательно, мицеллярная псевдофаза, которая образуется на поверхности сорбента, сглаживает различия в хроматографических свойствах сорбентов, и в МЖХ не следует ожидать проблем с воспроизводимостью методик на сорбентах одного типа разных фирм-производителей.

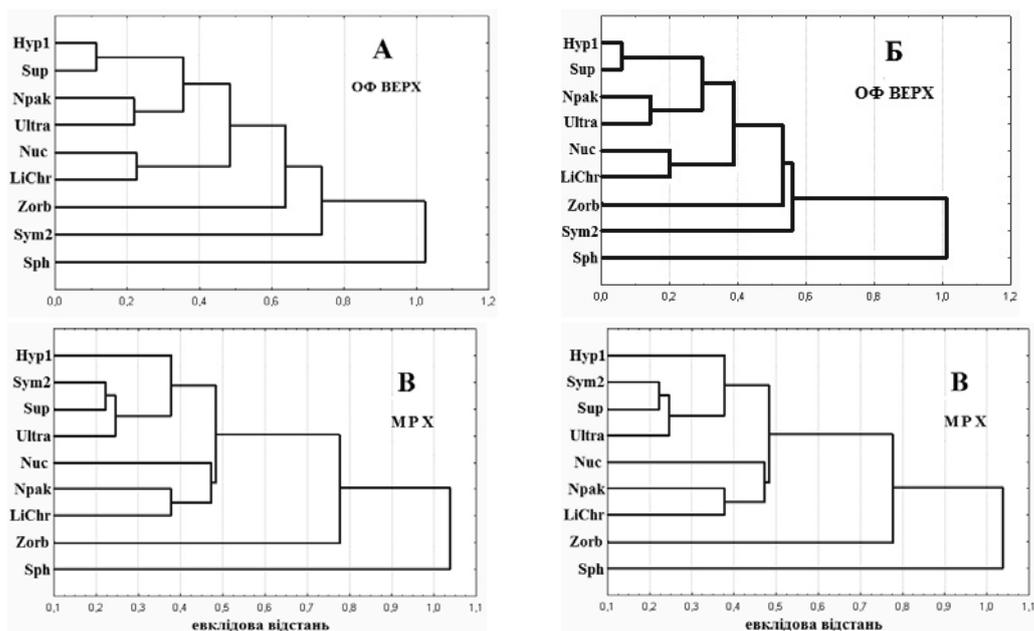


Рис. 3. Сравнение хроматографических свойств сорбентов в режимах ОФ ВЭЖХ (а, б) и МЖХ (в, г). Свойства хроматографической системы (а, в); свойства стационарных фаз (б, г)

Для подтверждения этого были проведены исследования по разделению примесей в салициловой кислоте – классический пример различий в свойствах сорбентов в ОФ ВЭЖХ (рис. 4).

Дендрограмма, построенная для сорбентов по данным удерживания в ОФ ВЭЖХ (рис. 4), указывает, что по данным кластеризации сорбенты Hypersil-Supelcosil и Nucleosil-LiChrospher соответственно принадлежат к одному кластеру. Следовательно, можно ожидать, что хроматографические свойства у них одинаковые. На самом деле, даже при существующих подходах для стандартизации сорбентов это далеко не так: результат кластеризации не соответствует хроматографическим свойствам сорбентов, которые должны быть похожи по хроматографическому поведению веществ.

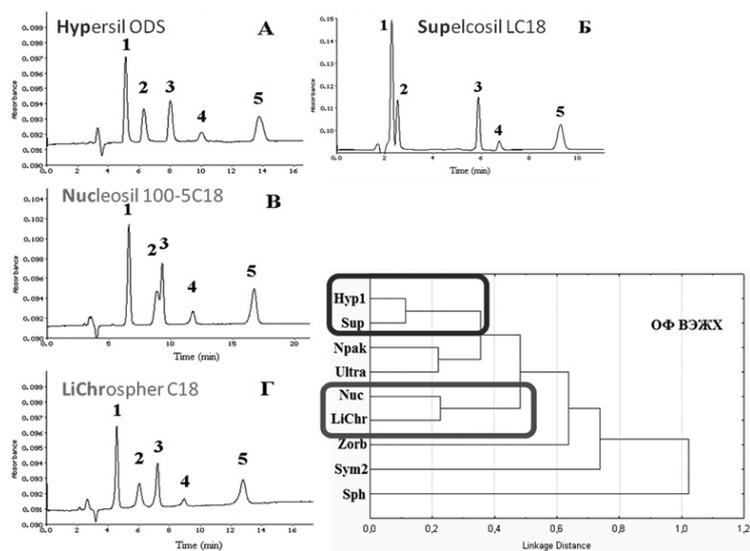


Рис. 4. Дендрограмма «аналогичности» сорбентов и соответствующие «аналогичным» колонкам хроматограммы разделения 4-гидроксibenзойной кислоты (1), 4-гидроксиизофталевой кислоты (2), фенола (3), ацетилсалициловой (4) и салициловой (5) кислот на колонках C18 в режиме ОФ ВЭЖХ

Для МЖХ (рис. 5.) также можно выделить пары сорбентов, относящихся к одному кластеру. И, в отличие от ОФ ВЭЖХ, видно, что кластеризация или похожесть сорбентов коррелирует с их хроматографическими свойствами. Следовательно, подход, предложенный для сравнения сорбентов в МЖХ, дает адекватные результаты, а различия в хроматографических свойствах сорбентов в условиях МЖХ незначительны.

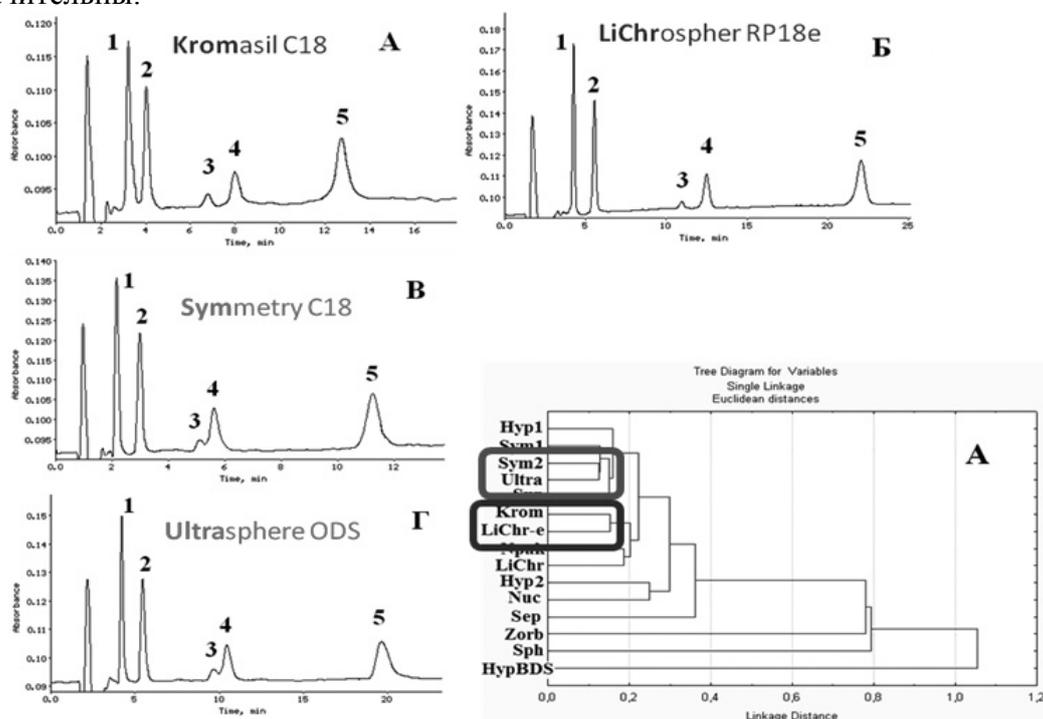
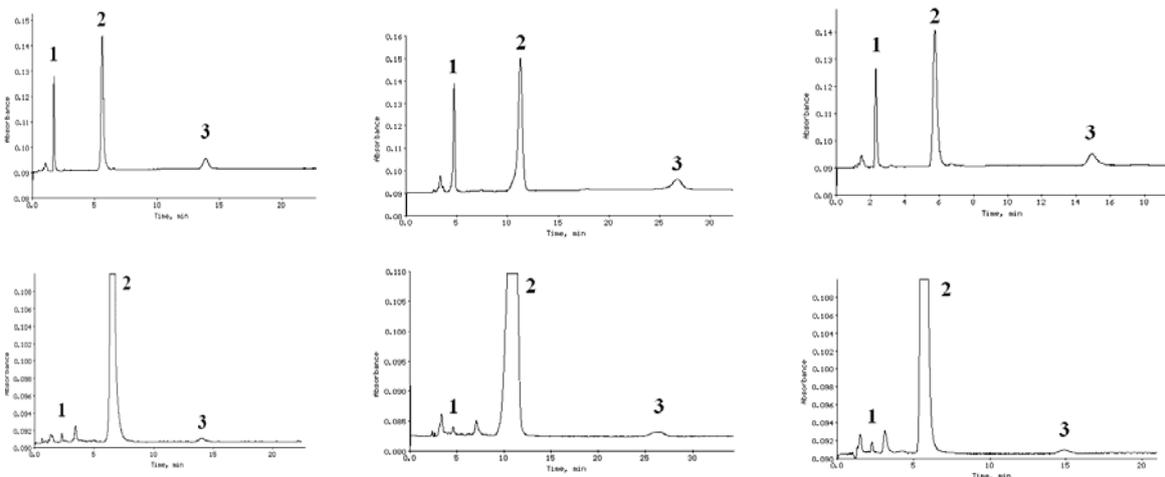


Рис. 5. Дендрограмма «аналогичности» сорбентов и соответствующие «аналогичным» колонкам хроматограммы разделения 4-гидроксibenзойной кислоты (1), 4-гидроксиизофталевой кислоты (2), фенола (3), ацетилсалициловой (4) и салициловой (5) кислот на колонках в режиме МЖХ

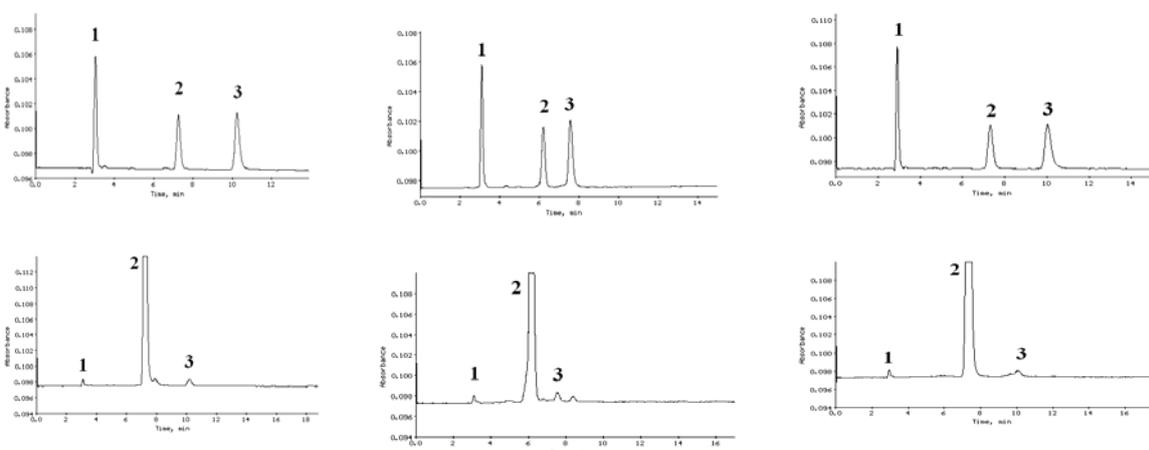
Проверка правильности предлагаемого подхода по тестированию сорбентов в МЖХ была также проверена на примере разделения примесей фолиевой кислоты. На рис. 6 представлены хроматограммы модельной смеси примесей фолиевой кислоты и исследуемого образца субстанции, полученные в режиме ОФ ВЭЖХ и в режиме МЖХ. Как можно увидеть из данных по хроматографической чистоте изучаемой субстанции фолиевой кислоты показывают, что результаты в ОФ ВЭЖХ зависят от типа используемой хроматографической колонки (различие почти в 1% суммарного содержания примесей), в то время как для МЖХ такого кардинального различия не наблюдается.

Из всего вышесказанного сделали вывод, что в режиме МЖХ за счет образования мицеллярной псевдофазы различия в свойствах сорбентов нивелируются, и для МЖХ проблема аналогичных сорбентов не актуальна. Воспроизводимость результатов разделения веществ не зависит от марки используемого сорбента с одной и той же привитой группой. То есть проблема «аналогичных сорбентов» для МЖХ не актуальна.

Мицеллярная жидкостная хроматография



Обращено-фазовая ВЭЖХ



Колонка Kromasil C8.
Хроматографическая
чистота $96.8 \pm 0.4\%$
(ВЭЖХ) и $96.8 \pm 0.7\%$
(МЖХ)

Колонка Supelcosil LC8DB.
Хроматографическая
чистота $97.2 \pm 0.4\%$ (ВЭЖХ)
и $96.6 \pm 0.8\%$ (МЖХ)

Колонка Zorbax C8.
Хроматографическая
чистота $97.8 \pm 0.3\%$
(ВЭЖХ)
и $96.5 \pm 0.5\%$ (МЖХ)

Рис. 6. Хроматограммы, полученные при определении примесей в субстанции кислоты фолиевой методами ОФ ВЭЖХ и МЖХ. Представлены хроматограммы раствора для проверки пригодности хроматографической системы (вверху) и хроматограммы образца субстанции (внизу)

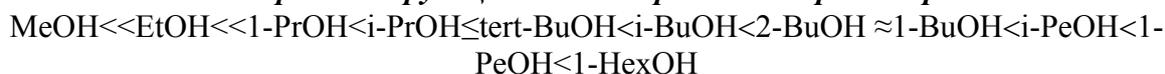
Дополнительную информацию по особенностям мицелло-модифицированных обращено-фазовых сорбентах можно найти в монографии Артема Юрьевича Куликова «Мицеллярная жидкостная хроматография. Особенности мицелло-модифицированных обращено-фазовых сорбентов» [58].

3.3. Органические модификаторы мицеллярных подвижных фаз

На селективность разделения в МЖХ в значительной степени оказывает влияние мицеллярная подвижная фаза, хотя и влияние стационарной фазы тоже нельзя отбрасывать. С использованием разработанного ранее протокола тестирования сорбентов в МЖХ [60] были протестированы ряд сорбентов с использованием додецилсульфата как мицеллообразующего ПАВ и нормальных и изоспиртов как органических модификаторов.

На основании проведенных исследований был расширен ряд элюирующей силы спиртов-модификаторов и впервые предложен ряд селективности спиртов-модификаторов, который позволяет выбирать органический модификатор для разделения тех или иных веществ методом МЖХ.

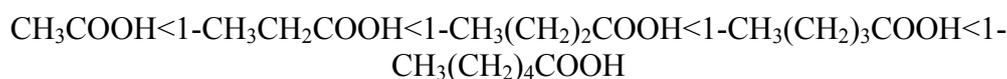
ряд элюирующей силы спиртов-модификаторов



ряд селективности спиртов-модификаторов



Также в работах [61, 62] отмечается, что алифатические карбоновые кислоты с числом атомов углерода от 2 до 6 выступать модификаторами мицеллярных подвижных фаз, объединяя в себе способность к регулированию элюирующей силы подвижной фазы и pH-поддерживающего компонента. Элюирующая сила гибридных мицеллярных элюентов увеличивается в ряду:



4. Практическое применение хроматографических методов

Хроматографические методы находят широкое применение в 3 основных направлениях создания лекарственных средств:

- поиск биологически активных веществ при синтезе и изучении лекарственного растительного сырья;
- аналитическое обеспечение фармацевтической разработки создания и внедрения в производство лекарственного средства;
- усовершенствование контроля качества существующих лекарственных средств согласно требованиям Государственной Фармакопеи Украины.

Результатом применения хроматографических методов посвящен этот раздел статьи.

Хроматографические методы в поиске биологически активных веществ при синтезе и изучении лекарственного растительного сырья.

В этом направлении хроматографические методы находят применение в:

- 1) создании новых схем синтеза ряда БАВ [63-75];
- 2) поиске новых потенциально возможных субстанций для создания новых лекарственных препаратов [76-91];
- 3) изучении хроматографических характеристик БАВ и связи строения и хроматографического поведения для использования в выборе оптимальных условий [12, 30].

В этих исследованиях разработчики применяют ТСХ для контроля прохождения реакций и установления чистоты синтезируемых соединений [64, 66-69, 71, 73, 75, 78, 81, 82, 85, 87, 88, 91], как и ВЭЖХ [63, 70, 72, 74], а хромато-масс-спектроскопию для доказательства строения и чистоты синтезируемых соединений [65, 75, 76, 80, 83, 84, 89].

Как и при синтезе, ТСХ, ВЭЖХ и ГХ находят широкое применение в изучении лекарственного растительного сырья [93-97, 98, 99, 100], а ГХ в сочетании с масс-спектроскопией и с сопоставлением с данными библиотек масс-спектров NIST02, NIST05, WILLEY-2007 [101-105] позволяют наиболее полно оценить как качественный, так и количественный состав БАВ.

4.1. ТСХ, ВЭЖХ и ГХ в синтезе и создании отечественных транквилизаторов (анксиолитиков) бензодиазепинового ряда

Создание новых отечественных транквилизаторов базируется на обширном материале по связи структура – свойства - активность, фармакокинетики и метаболизму, представлении и молекулярных механизмах веществ, обладающих анксиолитической активностью [105, 106]. Эти исследования проводятся более 40 лет в Физико-химическом институте им. А.В.Богатского НАН Украины и Научно-исследовательском институте фармакологии и токсикологии АМН Украины. Практическое применение результатов этих исследований привело к созданию и внедрению в производство БАВ на НТП «Интерхим» - субстанции феназепама, гизазепама, ципезепама («Левана») и их таблетированных лекарственных форм. Промышленный выпуск указанных лекарственных средств реализован в условиях GMP в соответствии с европейскими требованиями.

Отметим, что контроль синтеза, чистоту полученных субстанций, а также установление структуры биотрансформаций клинической фармакокинетики феназепама и гизазепама впервые в Украине применен радиохроматографический метод анализа на пластинках Силуфол-254 в системе хлороформ-ацетон-аммиак водный (70:30:0,01). Обнаружение примесей в феназепама проведено в системе этилацетат – гексан - муравьиная кислота (15:5:1) восходящим способом на пластинках силикагеля GF₂₅₄, а в гизазепама в системе метанол-ацетон-бензол (2:15:25) на пластинках Силуфол УФ-254.

Растворителем для приготовления испытуемого раствора в обоих случаях служил ацетон, в котором все примеси растворимы. Проявляли УФ-светом при длине волны 254 нм.

Величины R_f

1.	гизазепам	0,41
2.	7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3-Н-1,4-бенздиазепин-2-он	0,49
3.	1-метокси-карбонилметил-7-бром-5-фенил-1,2-дигидрокси-3-Н-1,4-бенздиазепин-2-он	0,64
4.	2-N- (карбоксиметил)амино-5-бромбензафенон	0,67
5.	5-бром-2-аминобензафенон	0,74

Чувствительность обнаружения для гизазепама, примесей 2 и 3 – 0,2 мкг, для примесей 4 и 5 – 0,4 мкг. Для феназепама чувствительность обнаружения примесей – 0,2 мкг.

Контроль обнаружения примесей в препарате «Левана».

Субстанция ципезепама (моно-[7-бром-2-оксо-5-(2-хлорфенил)-2,3-дигидро-1Н-бенз[1,4]-диазепин-3-ил] сукцината) выпускается под торговой маркой «Левана» ОАО «ИнтерХим».

Определение посторонних примесей в препарате «Левана».

Определения проводят методом тонкослойной хроматографии, используя ТСХ пластинки со слоем силикагеля 60 F₂₅₄.

Испытуемый раствор. 0,200 г субстанции растворяют в 10 мл ацетона. Раствор готовят непосредственно перед использованием.

Раствор сравнения (а). 10 мг фармакопейного стандартного образца (ФСО) 7-бром-3-гидрокси-5-(2-хлорофенил)-1,3-дигидробензо[1,4]диазепин-2-она (примесь А) помещают в колбу объемом 50 мл, растворяют в 20 мл ацетона и доводят до метки ацетоном (раствор А). В колбу объемом 50 мл помещают 7,5 мл полученного раствора А и доводят до метки ацетоном.

Раствор сравнения (б). 10 мг ФСО «Левана» растворяют в 10 мл ацетона. 1 мл полученного раствора помещают в колбу объемом 50 мл и доводят до метки ацетоном.

Раствор сравнения (с). 1,000 г ФСО «Левана» помещают в колбу объемом 50 мл и растворяют в 10 мл ацетона, добавляют 7,5 мл раствора А и доводят до метки ацетоном.

На линию старта хроматографической пластинки наносят 10 мкл (200 мкг) испытуемого раствора, 10 мкл (0,3 мкг) раствора сравнения (а), 10 мкл (0,2 мкг) раствора сравнения (b) и 10 мкл (200 мкг ФСО левана и 0,3 мкг примеси А) раствора сравнения (с). Пластинку высушивают на воздухе в течение 5 мин и помещают в камеру со смесью растворителей толуол - хлороформ - ацетон - метанол - кислота уксусная ледяная (60:20:20:5:1). Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат в потоке теплого воздуха и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора пятно, соответствующее 7-бром-3-гидрокси-5-(2-хлорофенил)-1,3-дигидр-бензо[1,4]дiazепин-2-ону, не должно быть интенсивнее пятна на хроматограмме раствора сравнения (а) (0,15 %); никакое пятно, кроме основного, не должно быть интенсивнее пятна на хроматограмме раствора сравнения (b) (0,1 %).

Результаты анализа считаются достоверными, если на хроматограмме раствора сравнения (с) оказываются два четко разделенных пятна.

Субстанции «Левана» исследована методом тонкослойной хроматографии на наличие и содержание следующих примесей:

- А: 7-бром-3-гидрокси-5-(2-хлорофенил)-1,3-дигидробензол[1,4]-diazепин-2-он;
- В: 7-бром-5-(2-хлорофенил)-2-оксо-2,3-дигидро-1Н-бензо[1,4]diazепин-3-ил ацетат,
- С: 7-бром-5-(2-хлорофенил)-2,3-дигидро-1Н-бензо[1,4]diazепин-2-он;
- Д: неидентифицированная примесь.

Пороговые значения для информирования ($> 0,05$ %), идентификации ($> 0,1$ %) и квалификации ($> 0,15$ %), приняты согласно требованиям к максимальной суточной дозе левана, которая равняется 2 мг.

Экспериментально установлено, что в анализируемых образцах опытных серий примеси В,С,Д ни разу не были обнаружены на уровне 0,05%, а содержимое примеси А было менее 0,1%.

Остаточные количества органических растворителей (хлороформа не больше 0,006 % и 96 % спирта не больше 0,5 %) проводили методом газовой хроматографии, используя метод стандарта.

Экспериментально установлено, что в образцах трех опытных серий препарата содержание хлороформа не превышало 0,005 %, а содержание 96 % спирта - на уровне 0,038 - 0,0046 %.

Количественный и качественный анализ гидазепама и его метаболитов методом ВЭЖХ

Общий принцип извлечения веществ основной природы из биоматериала заключается в превращении их в основания путем подщелачивания плазмы, цельной крови, мочи или гомогената органов с последующим извлечением (экстракцией) органическим растворителем. При этом учитывалось вероятность гидролитического расщепления гидразиновой группы и бенздиазепаинового цикла гидазепама в щелочной среде, что требует выбора оптимального рН. Для указанных целей использовался боратный буфер (рН 9,0), оюдадающий большой емкостью. В качестве экстрагента был выбран свежеперегнанный диэтиловый эфир (темп. кипения 34,5°C), извлекающий меньше. Чем другие экстрагенты, эндогенные примеси.

Определение провели с помощью хроматографической системы Altex Beckman 160 UV с колонкой Ultraspherer, стационарная фаза – С-18-5 МКМ, размер – 4,6×150 мм. Для дополнительной очистки экстрактов от внесенных из крови коэкстрактивных

веществ, способных быстро дезактивировать аналитическую колонку, применили предколонку размером 4,6x50 мм, наполненную тем же сорбентом. Скорость потока элюента (этанол:глициновый буфер (рН 2,2) – 4,3:5,7) – 1,0 мл/мин. Давление в хроматографе при этой скорости – 1000 Па, температура элюента 22 °С, УФ-детектирование проведено при длине волны 254 нм.

Непосредственно перед использованием элюент дегазировали в течение 3 мин и фильтровали через фильтр с размером пор 5 мкм. Во время хроматографирования элюент пропускали через двухмикронный стальной фильтр. При такой системе очистки достигалась высокая чистота и стабильность элюента, которая в свою очередь позволила избежать во время анализа дополнительных необъяснимых пиков. Объем анализируемой пробы, вводимой из петли в хроматограф. Был постоянным и составлял 20 мкл. Количество гидазепама и его метаболитов в хроматографических фракциях определяли методом нормализации по данным калибровки с внутренним стандартом, которым служил диазепам. В указанных условиях времени удерживания для гидазепама и его метаболитов 1 и 2 и внутреннего стандарта составили соответственно – 4 мин 30 с, 5 мин 20 с, 6 мин 25 с, 8 мин 10 с. Чувствительность разработанного метода количественного определения гидазепама и его метаболитов равна 45, 40 и 40 мг/мл.

ВЭЖХ в контроле качества таблеток феназепама

Количественное определение. Определения проводят методом жидкостной хроматографии в соответствии с требованиями ГФУ, 2.2.29, 2.2.46.

Испытуемый раствор. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 20 таблеток препарата, добавляют 700 мл подвижной фазы, выдерживают раствор в ультразвуковой бане на протяжении 30 мин, доводят объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивают и фильтруют сквозь мембранный фильтр из тефлона (PTFE) или полипропилена (GHP) с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые несколько миллилитров фильтрата.

Раствор сравнения. Около 80 мг (точная навеска) Фармакопейного стандартного образца Государственной Фармакопеи Украины (ФСО ГФУ) феназепама помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 70 мл метанола Р2, доводят объем раствора метанолом Р2 до метки и перемешивают.

В мерную колбу вместимостью 200 мл помещают 5,0 мл полученного раствора, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают. Хроматографируют несколько раз (n_0) по 10 мкл раствора сравнения и испытуемого раствора на жидкостном хроматографе с ультрафиолетовым детектором в следующих условиях:

- колонка размером 150 × 4,6 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р с размером частиц 5 мкм: Xbridge C18 или аналогичная, для которой выполняются требования пригодности хроматографической системы;
- температура термостата колонки: 35 °С;
- длина волны детектирования: 231 нм;
- скорость потока подвижной фазы: 1,0 мл/мин;
- подвижная фаза: смесь 0,05 М фосфатного буферного раствора из рН 3,5 - метанола Р2 – ацетонитрила для хроматографии Р (50:25:25).

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- коэффициент симметрии, рассчитанный для пиков феназепама должен быть не больше 1,5;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам феназепама должна быть не менее 2000 т.т.

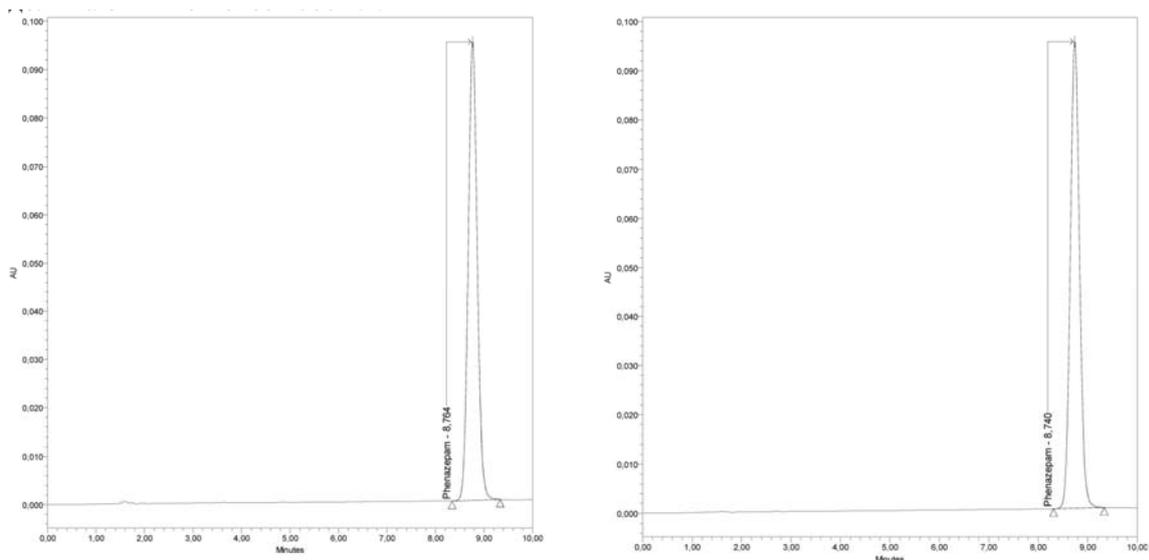


Рис. 7. Типичные хроматограммы испытуемого раствора (слева) и раствора сравнения (справа), полученные в условиях количественного определения, которая используется в разделах «Идентификация», «Однородность дозированных единиц» «Количественное определение»

4.2. ТСХ и ГХ в контроле качества противовирусных препаратов (флуоренизид, амиксин)

4.2.1. Определение сопутствующих примесей в субстанции флуоренизида

Флуоренизид представляет собой синтетическую субстанцию со специфической противотуберкулезной и антихламидийной активностью. Технология синтеза флуоренизида (схема), разработанная на кафедре аналитической химии Львовского Государственного медицинского университета им. Данила Галицкого под руководством проф. Петрух Л.И., позволяет получить субстанцию высокой степени чистоты. Возможными примесями флуоренизида могут быть исходные продукты его синтеза – флуоренон-9 и изониазид [108].

В свою очередь, наличие в молекуле изониазида высокореакционной гидразиновой группы, которая проявляет восстановительные свойства и связанной с такой же реакционно-способной 4-пиридинкарбоновой кислотой, указывает на возможность протекания окислительно-восстановительных реакций с участием изониазида, в частности с образованием токсичной примеси – гидразина [109].

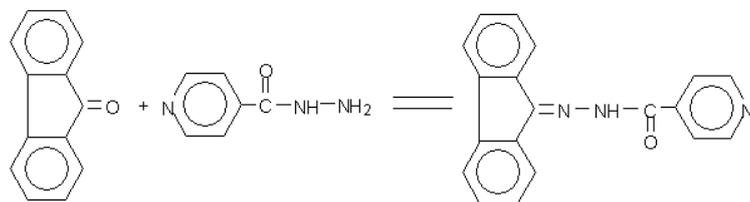


Схема синтеза флуоренизида

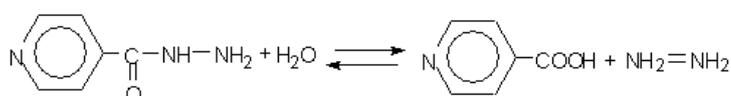


Схема разложения продуктов синтеза флуоренизида

В связи с тем, что флуоренизид, флуоренон-9 и изониазид поглощают в УФ-области спектра, для хроматографирования использовали пластинки Silicagel 60 F₂₅₄ (50×200 мм) со стеклянной подложкой и флюоресцентной добавкой (фирма Merck, Германия). Детектирование пятен проводили в УФ-свете при длине волны 254 нм. Для детектирования пятна гидразина использовали 1% раствор п-диметилбензальдегида в 95% спирте.

Порог чувствительности исследуемых веществ, составляет: для флуоренизида – 0.5 мкг, для флуоренона-9 – 0.1 мкг, для изониазида – 0.15 мкг, для гидразина – 0.02 мкг. Исследования показали, что наиболее удовлетворительные результаты разделения веществ (1,2,5) достигаются в системах хлороформ-этанол и хлороформ-метанол (обе в соотношении 8:2). Наиболее оптимальной оказалась последняя система, в которой пятно гидразина имеет R_f=0.45 (табл. 2).

Таблица 2. Показатели разделения сопутствующих примесей в субстанциях флуоренизида

Вещество	Значение R _f в системах растворителей	
	Хлороформ-этанол (8:2)	Хлороформ-метанол (8:2)
Флуоренизид	0.72	0.57
Изониазид (гидразид изоникотиновой кислоты)	0.28	0.25
Флуоренон-9	0.81	0.71

При нанесении на линию старта хроматографической пластинки растворов флуоренизида в количестве, эквивалентном 100, 200 и 300 мкг, на уровне пятен флуоренона-9 и изониазида оказались дополнительные пятна. Пятен, соответствующих по значению R_f пятну гидразина, обнаружено не было, то есть его содержание в субстанции не превышает 0.006%.

Выбраны и обоснованы условия определения, позволяющие с необходимой точностью и достоверностью контролировать содержание сопутствующих примесей в субстанции флуоренизида и лекарственных формах на ее основе.

4.2.2. ТСХ и ГХ в контроле примесей субстанции «Амиксин»

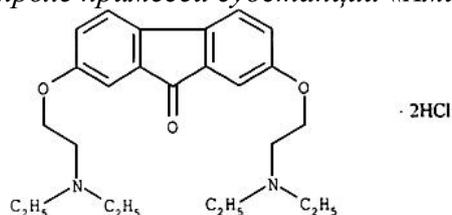


Рис. 8. Амиксин

Технологическая схема производства предусматривает фильтрование промежуточного раствора основания амиксина в толуоле через слой оксида алюминия. Такая обработка приводит к полному удалению гидроксил-содержащих компонентов из препарата. В связи с этим примеси I, II и III отсутствуют в определяемых количествах (0,1 %).

В отдельных случаях после такой обработки в продукте обнаруживаются продукты окисления (V).

В качестве специфических примесей в амиксине могут содержаться: 2,7-диокси флуорен-9-он (I), продукт его моноалкилирования (II), 2-оксифлуорен-9-он (III), 2-[2-(диэтиламино)этокси]флуорен-9-он (IV) и продукты окислительной деструкции (V).

Для обнаружения органических примесей предложен метод адсорбционной хроматографии в тонком слое силикагеля (пластинки «Silufol», «Silufol-UV-254», «Silufol-UV-366») при детектировании пятен парами йода или раствором йода в гексане, облучении УФ-светом с применением соответствующих светофильтров. При прочих равных условиях наибольшая чувствительность определения была достигнута с применением пластинок «Silufol-UV-254» при облучении их ультрафиолетовым светом с применением светофильтра с максимумом пропускания 254 нм (светофильтр УФС-1).

Проверено наличие перечисленных примесей в образцах амиксина методом хроматографии в тонком слое сорбента на пластинах «Silufol-UV-254» в смеси растворителей бензол-триэтиламин-метанол (100:10:1) при детектировании пятен в УФ-свете (254 нм).

В данной системе растворителей для амиксина R_f 0,25-0,35; для примеси IV – 0,4-0,5. При этом продукты окислительной деструкции находятся на старте.

Чувствительность определения для каждой из всех описанных примесей находится в диапазоне 0,02-0,05 мкг, что при нанесении 50 мкг амиксина составляет не более 0,1%. Допускается наличие на хроматограмме амиксина дополнительного пятна, при условии, что оно не будет по интенсивности окраски и площади превышать пятно от СОВС.

Значения нормированных R_f примесей приведены в табл. 3, хроматограмма – на рис. 3.

Таблица 3. Значения R_f примесей и их нормированные по R_f амиксина значения.

	Продукты окисления	Примесь IV (СОВС)	Амиксин
R_f	0,01	0,45	0,3
нормированное R_f	0,036	1,5	1,0

Во всех серийных образцах при нанесении 50 мкг препарата пятна примесей отсутствовали, т.е. содержание каждой не превышало 0,1%. Поэтому установлена норма примесей (не более 0,1% каждой).

Остаточные количества органических растворителей.

В синтезе амиксина и на стадии перекристаллизации в качестве растворителей применяют толуол и ацетон, содержание каждого из которых в серийных образцах – не должно превышать 0,1%.

Для анализа использовали раствор амиксина в этиловом спирте Р, что позволяет создать достаточную концентрацию препарата в растворе. Методика основана на применении для количественного определения остаточных количеств толуола и ацетона в препаратах амиксина метода внутреннего стандарта. В качестве вещества внутреннего стандарта взят 1,4-диоксан.

Хроматографирование образцов проводили на ГХ-хроматографе «Хром-5» с пламенно-ионизационным детектором на неподвижной фазе «Chromaton NAW» (0,125-0,160 мм) с закрепленной жидкой фазой «15% Carbowax 20 M» (Lachema, n.p. Brno, Czechoslovakia). Возможно также использование различных серийных газовых хроматографов и неподвижных фаз, отвечающим требованиям нормативной документации изготовителя и показывающих положительный результат при проведении теста «Общие требования пригодности хроматографической системы».

4.3. Хроматографические методы в синтезе производных 1,2,4-триазола и создание на их основе оригинальных препаратов для лечения болезней системы кровообращения (ангиолин, гипертрил) при выполнении фармацевтической разработки

В настоящее время группой украинских ученых под руководством Заслуженного деятеля науки и техники Украины профессора И.А.Мазура синтезирован ряд производных 1,2,4-триазола, из которых тиотриазолин (морфолиний 3-метил-1,2,4-триазоллил-5-тиоацетат), кардиотрил (1-(β -фенилэтил)-4-(п-диметиламинобензилиденамино)-1,2,4-триазолий бромид), гипертрил (1-(β -фенилэтил-4-амино-1,2,4-триазолий бромид – он же МТ) и ангиолин (*D,L*-лизиний 3-метил-1,2,4-триазоллил-5-тиоацетат – он же Лизиний), на базе которых созданы готовые лекарственные формы для лечения болезней системы кровообращения. Эти препараты по эффективности фармакологического действия превышают референтные препараты и структурные аналоги [110-112].

Для выполнения аналитического обеспечения синтеза, стандартизации и организации производства этих соединений и их лекарственных форм предложен и успешно выполнен доктором фарм. наук, ст.н.с. Г.В. Георгиевским алгоритм создания и контроля качества активных фармацевтических ингредиентов (АФИ – они же БАВ) на примере «Лизиния» (торговое название «Ангиолин») и МТ (торговое название «Гипертрил») [113-117].

Алгоритм предусматривает разработку комплекса физико-химических методов, из которых наибольшее применение находят хроматографические (ТСХ, ГХ, ВЭЖХ) и их сочетание с масс-спектрометрией. Хроматографические методики стали основой для разработки досье на препараты «Ангиолин» и «Гипертрил».

Изучены хроматографические свойства исследуемых соединений методами ТСХ, ВЭЖХ и ГХ для установления величин R_f (ТСХ) и времен удерживания (ВЭЖХ и ГХ), определения открываемого минимума (порога чувствительности), что позволяет идентифицировать и количественно определить активные фармацевтические ингредиенты и их сопутствующие примеси.

Чувствительность обнаружения (определяемый минимум) при ТСХ установлен нанесением на хроматограмму разных проб растворов, содержащих от 0.01 мкг до 30 мкг вещества в пробе. Исследуемые вещества наносили в виде 0.5 % растворов в 96 % спирте в количестве 10-30 мкг; проявитель – пары йода. Полученные величины R_f исследуемых активных фармацевтических ингредиентов и их технологических примесей позволяют проводить их идентификацию при взаимном присутствии, а установленные минимальные пределы чувствительности детектирования пятен на хроматограмме позволяют определить минимум наличия технологических примесей с целью оценки чистоты субстанции при постадийном контроле производства. Исследованы хроматографические свойства исследуемых соединений методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Условия проведения исследования приведены в табл. 4 [118].

Исследования методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) активных фармацевтических ингредиентов - производных 1,2,4-триазола.

Выбор условий хроматографирования методом ВЭЖХ *D,L*-лизиний 3-метил-1,2,4-триазоллил-5-тиоацетата. Для выбора условий хроматографирования были использованы расчетные данные величин коэффициента распределения в системе октанол - вода ($\log P_{o/w}$, гидрофобные вещества), константы протонизации, а также литературные данные, из которых следует, что при хроматографировании азотсодержащих соединений наиболее часто используют кислые подвижные фазы [118].

Таблица 4. R_f Производных 1,2,4-триазола и их сопутствующих примесей

№	Вещество	Система		
		метанол- вода (3:7)	пропанол -1-вода (10:1)	ацетон- вода (50:2)
		Пластинка		
		Sorbfil-ПТСХ-П-А	Плазмохром	
			ом	
1.	тиосемикарбазид	0.68		0.71
2.	ацетилтиосемикарбазид	0.54		0.84
3.	3-метил-1,2,4-триазолил-5-тион	0.63		0.86
4.	морфолиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат (Тиотриазолин)	0		0
5.	<i>D,L</i> -лизин	0.16		0.18
6.	<i>D,L</i> -лизиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат (Лизиний)	0.06		0.04
7.	4-амино-1,2,4-триазол	0.18	0.43	0.19
8.	диметиламинобензальдегид	0.04	0.11	0.05
9.	β -бромфенилэтилбензол	0.20	0.22	0.23
10	1-(β -фенилэтил)-4-(<i>p</i> -диметиламинобензилиденамино)-1,2,4-триазолий бромид (Кардиотрил)	0.68	0.91	0.77
11	1-(β -фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолий бромид (МТ)	0.22	0.78	0.14

С помощью программы ACD Labs (ACD/Labs 10) были рассчитаны величины гидрофобности, которые для тиотриазолина и 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусной кислоты составили $\text{Log}p=0.45$ и $\text{Log}p=-0.842$, соответственно. Исходя из полученных величин, был сделан вывод, что соли 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусной кислоты должны удерживаться на обращенно- фазовых сорбентах типа C_{18} с использованием кислых подвижных фаз с низким (до 10 %) содержанием органического модификатора. Кроме того, наличие карбонильной группы дает основание считать, что подвижная фаза должна быть кислой ($\text{pH} < 3$).

Эксперимент показал, что приемлемого и воспроизводимого удерживания (около 10 мин) солей 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусной кислоты достигается с использованием подвижной фазы состава ацетонитрил-вода, доведенной до $\text{pH} 2,0$ кислотой фосфорной концентрированной в объемном соотношении 2:98.

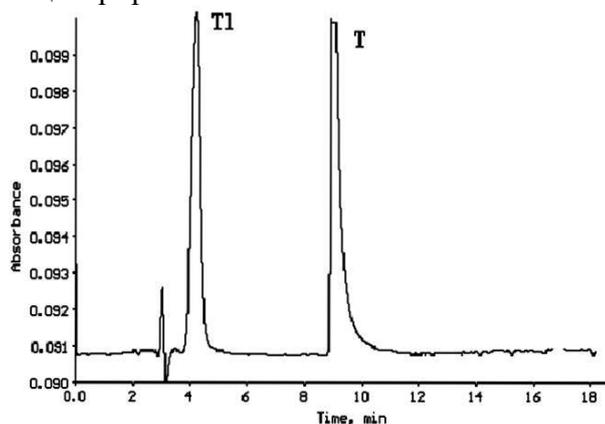


Рис. 9. Разделение *D,L*-лизиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетата (Т) с 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тионом (Т1)

На хроматограмме раствора D,1-лизиний 3-метил-1,2,4-триазалил-5-тиоацетата (рис.), который в дальнейшем будет подвергнут различным видам стрессового разложения, видно наличие примеси 3-метил-1,2,4-триазалил-5-тиона (около 0.2 %). Водно-ацетонитрильные растворы солей 3-метил-1,2,4-триазалил-5-тиоуксусной кислоты достаточно стойкие, и после 8 ч (хранился в защищенном от света месте) для данных растворов не наблюдалось увеличение содержания примесей (по данным ТСХ).

В приведенных условиях хроматографирования возможно установить наличие технологической примеси — 3-метил-1,2,4-триазалил-5-тиона в количестве ≥ 0.2 %.

Определение остаточных количеств органических растворителей в АФИ – Лизиний. Определение состава примесей в субстанции включает в себя контроль содержащего органических растворителей (стадия синтеза и очистки методом перекристаллизации) и определения примесей в субстанции (как полупродуктов синтеза, так и продуктов разложения субстанции в процессе хранения).

Стадии синтеза, включая перекристаллизацию D,1-лизиний-3-метил-1,2,4-триазалил-5-тиоацетата, проходят в этаноле или в его смеси с водой. В соответствии с Руководством по регламентации остаточных количеств органических растворителей (ICH Topic Q3c (R4) Impurities: Guideline for Residual Solvents) этанол принадлежит к растворителям класса 3 – малотоксичные растворители. Класс 3 растворителей имеет значение разрешенного суточного действия 50 мг/сут и больше, то есть критический предел концентрации этанола в субстанции ≤ 0.5 % и не требует обоснования. С целью максимального уменьшения навески субстанции применен метод непосредственного введения в колонку водного раствора субстанции. Для уменьшения погрешности определения из-за изменения объемов растворов, вводимых в хроматограф, применен метод «внутреннего стандарта». Как внутренний стандарт использован пропанол-1, пик которого на хроматограммах элюируется за пиком определяемого вещества.

Определение остаточных количеств этанола в субстанции Лизиний проведено методом ГХ в следующих условиях:

прибор	-	газовый хроматограф
детектор	-	пламенно - ионизационный
колонка	-	стеклянная, размером 160 см × 0.32 см
сорбент	-	Порапак Q с размером частиц (60–80) меш
температура колонки	-	175 °С
температура блока ввода проб	-	190 °С
температура детектора	-	220 °С
скорость газа - носителя	-	35 мл/мин

Типовые хроматограммы приведены на рис. 10.

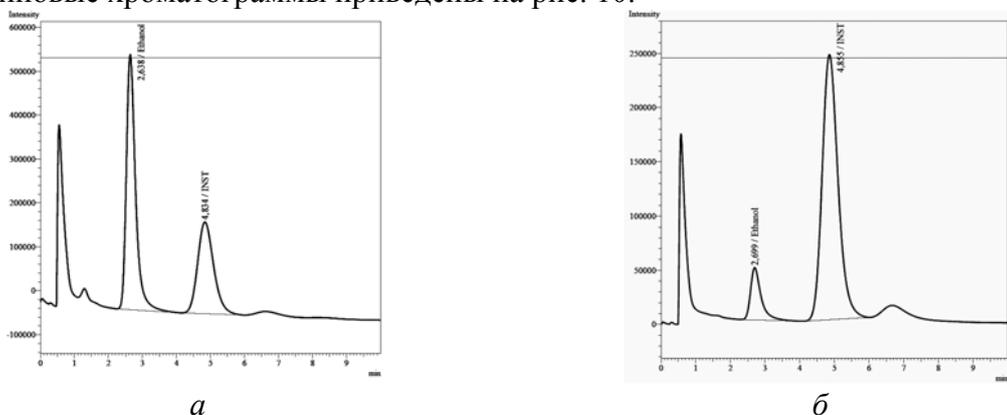


Рис. 10. Хроматограммы: *а* – раствора сравнения этанола; *б* – исследуемого раствора

Содержание этанола в субстанции составляет около 0.042, что не превышает критический предел 0.5 %.

Определение технологических примесей и стабильности в «стрессовых условиях» производных 1,2,4-триазола. Для решения задачи по изучению технологических примесей и примесей, которые могут создаваться в процессе хранения, количество которых определяют критические показатели качества, использовали вышеприведенные условия проведения анализа методом ВЭЖХ.

Фармацевтическая разработка требует приведения данных о стабильности лекарственной субстанции. Следует отметить, что при обосновании состава ГЛС необходимы данные о стабильности, которые в свою очередь влияют на рН, выбор растворителя, температурных влияний, света, и др. Поэтому при исследовании стабильности необходимо применять ускоренные испытания, спланированные таким образом, чтобы увеличить скорость химического разложения действующего вещества или ЛС путем создания особенно неблагоприятных условий, которые в деталях могут прогнозировать оптимальные как условия создания лекарственного средства, так и условия его хранения. (Руководство 42-3.3:2004 Руководства по качеству. Лекарственные средства. Испытание стабильности).

Исследование стабильности субстанций проведено с использованием разных методов их разложения (Директива ICH Q16). Стрессовое разложение субстанции проводили с использованием разных методов их разложения:

- 1) облучение светом, чаще ультрафиолетовым (по требованиям Руководства ICH Q16);
- 2) кислотный гидролиз (0.1 М раствор HCl);
- 3) щелочной гидролиз (0.1 М раствор NaOH);
- 4) гидролиз водных растворов и/или окислительное разложение (3% раствор H₂O₂).

Определение состава примесей в субстанции Лизиния было проведено с использованием метода ВЭЖХ в следующих условиях:

Приготовление буферного раствора. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 0,01 г натрия октансульфоната, растворяют в 800 мл воды, доводят объем раствора водой к отметке и перемешивают. Доводят рН полученного раствора до 2,2 кислотой фосфорной концентрированной (потенциометрически, ГФУ 2.2.3).

прибор	- ВЭЖХ-хроматограф
детектор	- УФ-детектор diode-array detector ELSD (Evaporated Liquid Scattering Detector)
колонка	- Resolv C18, размером (300 × 4,6) мм, заполненная сорбентом с размером частиц 5 мкм или аналогичная, для которой выполняются требования испытания «Проверка пригодности хроматографической системы»
подвижная фаза	- ацетонитрил – буферный раствор (20:980), дегазированная любым удобным способом
скорость подвижной фазы	- 1,0 мл/мин
температура колонки	- 30 °С
длина волны	- 220 нм

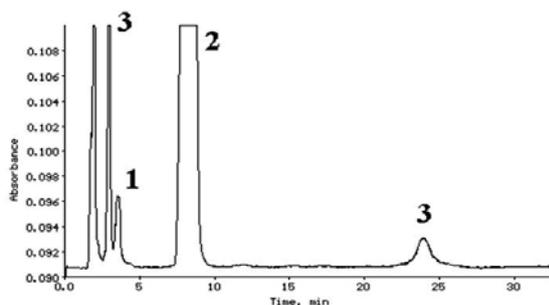


Рис. 11. Хроматограмма испытуемого раствора субстанции после облучения УФ - светом

1 - 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тион;
 2 - 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусная кислота;
 3 – продукты разложения

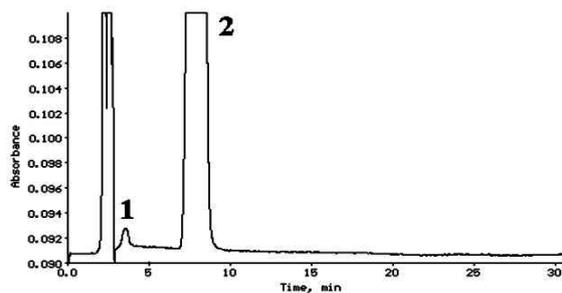


Рис. 12. Хроматограмма испытуемого раствора субстанции после кислотного гидролиза

1 - 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тион;
 2 - 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусная кислота

Контроль содержания 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиона (технологическая примесь, максимальное содержание не более 0,2%) и других примесей (не более 0,1%. суммарное содержание неизвестных примесей не более 0,2%).

Согласно требованиям ГФУ и Руководством ICH по валидации методик ВЭЖХ проведена валидация методики определения содержания посторонних примесей, для чего было проверено такие валидационные характеристики как специфичность и предел обнаружения. На рис. 13, 14 приведены хроматограммы растворов, полученных при определении специфичности методики.

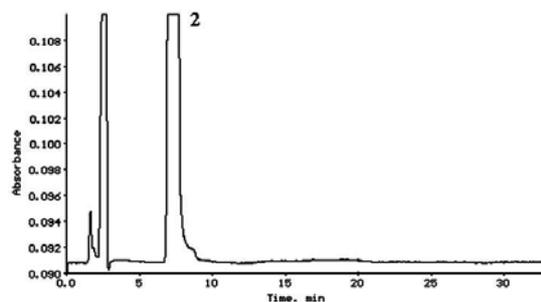


Рис. 13. Хроматограмма испытуемого раствора субстанции после щелочного гидролиза

1 - 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тион;
 2 - 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоуксусная кислота

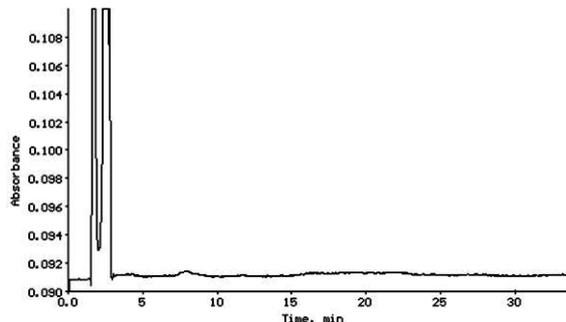


Рис. 14. Хроматограмма испытуемого раствора субстанции после обработки водорода пероксидом (препарат практически полностью разложился)

Предел обнаружения примесей составляет 0.032%. Для известной примеси - 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиона были проведены дополнительные валидационные испытания, определены критерии и величин, приведенные в табл. 5.

По результатам анализа в «стрессовых условиях», полученных по валидированной методике определения примесей, установлено:

- D,l-лизиний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат практически полностью разлагается, особенно при окислительных способах разложения (УФ - облучения и водорода пероксид).

- Термическая обработка субстанции не приводит к разложению.

• В нейтральных и слабо кислых (к рН 4) водных растворах субстанция является стойкой. В сильно кислых растворах (рН 1 и меньше) субстанция частично разлагается с образованием 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиона.

Проведенные исследования позволили сделать выводы о необходимости особых условий производства и хранения:

- Изготовление инъекционных растворов можно проводить без добавления антиоксидантов;
- Хранение субстанции нужно проводить в защищенном от света месте при комнатной температуре.

Условия определения стабильности были взяты за основу разработанной и валидированной методики количественного определения 2,5% раствора Лизиния для инъекций.

Таблица 5. Валидационные показатели и требования к ним методики определения примеси 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиона в субстанции Лизиния

Критерий	Требования	Получен о	Вывод
статистическая незначимость свободного члена	$ a < 2.3534 * S_a =$ 2.27	1.23	соответст
практическая незначимость	$ a \leq 6.8$	-1.23	соответст
относительное стандартное остаточное отклонение	$RSD_0/b \leq 6.8$	0.94	соответст
коэффициент корреляции	$r \geq 0.9916$	0,99973	соответст

4.3.1. Метод ВЭЖХ в фармако-кинетических исследованиях препарата «Лизит»

Для изучения фармакокинетических характеристик разработана методика количественного определения субстанции D,l-лизиний-3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетата в сыворотке крови. Разработка методики проведена в сотрудничестве с научными работниками отдела фармакокинетики (руководитель проф. Ярош А.К.) ГУ «ИФТ НАМН Украины».

Животным подопытной группы внутрибрюшинно вводили D,l-лизиний-3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат в дозе 50 мг/кг массы тела животного. Точную навеску Лизиния растворяли в воде. Пробы крови брали сразу после декапитации животных под эфирным наркозом через 3, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180 минут после введения исследуемого соединения.

Для непосредственного количественного определения содержаемого D,l-лизиний-3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетата нами было предложено пробоподготовка в соответствии со свойствами субстанции:

В пробирку вносили 0,8 мл сыворотки крови, добавляли 1,0 мл метанола и ставили на 5 минут в ультразвуковую баню при температуре 55 °С для полного осаждения белков. Центрифугировали при 8000 об/мин в течение 30 минут. Полученный прозрачный раствор декантировали в новую чистую пробирку, пипеткой измеряли его точный объем, который переносили в виалы для последующего хроматографирования.

Объем инъекции подготовленной биопробы составлял 5 мкл. Элюирования проводили в изократическом режиме со следующим промыванием колонки. Длительность анализа составляла 10 мин (с учетом промывки колонки).

прибор	- жидкостной хроматограф
детектор	- масс-селективный
колонок	- Rapid Resolution HT Cartridge 4,6x30 mm 1,8 μ m Zorbax SB-C 18 и Agilent XDB-C18 4,6x50 mm 1,8 μ m, соединенные последовательно
Скорость потока	- 0,5 мл/мин
температура	- 450°C
подвижная фаза	- деионизированная вода и ацетонитрил
Метод регистрации	- SIM Method (174 m/z)
Фрагментор	- 120
напряжение на капилляре	- 4000 В
температура газа	- 250°C
Скорость газа	- 12 л/хв
Давление распылителя	- 35 psig

Результаты экспериментов подавали статистической обработке с помощью компьютерных программ Excel Microsoft, Statistika 6,0 с использованием t-критерия Стьюдента. Хроматографирование проводили через 3,5,10,20,40,60,90 мин (**рис. 15**).

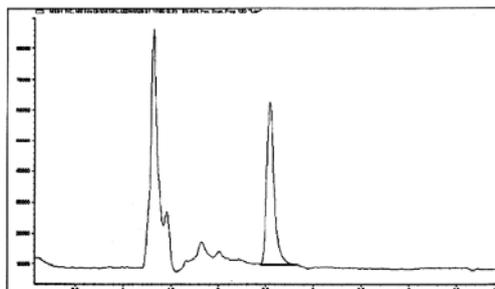


Рис. 15. Типичная хроматограмма D,1-лизиний-3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетата в крови подопытной крысы, полученная через 90 мин после парентерального введения соединения в дозе 50 мг/кг массы тела

После проведения эксперимента полученные хроматограммы исследуемых растворов были проинтегрированы. Концентрация Лизиния рассчитывана с использованием калибровочной кривой зависимости «площадь хроматографического пика – концентрация». Фармакокинетическая кривая D,1-лизиний-3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетату, которая воспроизводит зависимость концентрации действующей субстанции в крови от времени после ее введения животным приведена на рис. 16.

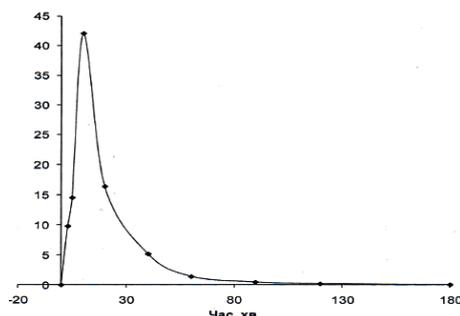


Рис. 16. Фармакокинетическая кривая зависимости концентрации (мкг/мл) D,1-лизиний-3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетата в крови крыс от времени (минуты) после введения действующей субстанции в дозе 50 мг/кг массы тела

Установлено, что Лизиний быстро всасывается в кровь с достижением максимальной концентрации через 10 мин после инъекции препарата. Высокие значения мнимого объема распределения указывают на хорошее распределение АФИ в тканях животных, а значения констант элиминации и среднего времени содержания в крови указывают на скорость выведения препарата из крови крыс. Результаты расчетов исследования приведены в табл. 6.

Таблица 6. Основные фармакокинетические параметры D,1-лизиний-3-метил-1,2,4-триазалил-5-тиоацетата в крови крыс после парентерального введения в дозе 50 мг/кг массы тела

№ п/п	Параметры	Обозначение	Значение
1.	Максимальная концентрация в крови	C_{max} , мкг/мл	$42,0 \pm 15,2$
2.	Время достижения максимальной концентрации	T_{max} , мин	$10,0 \pm 0$
2.	Константа элиминации	K_{el} , мин ⁻¹	$0,05 \pm 0,002$
3.	Условный объем разделения	V_d , мл/кг	$463,9 \pm 3,4$
4.	Площадь под фармакокинетической кривой	AUC, мкг·мин/мл	$2143,2 \pm 101,8$
5.	Общий клиренс	Cl_t , мкг/мин ⁻¹ ·кг ⁻¹	$23,3 \pm 1,1$
6.	Среднее время удерживания в крови	MRT, мин	$19,9 \pm 0,93$

Полученные фармакокинетические параметры были использованы для разработки схемы курсового использования D,1-лизиний-3-метил-1,2,4-триазалил-5-тиоацетата во лекарственных формах. Проведен анализ результатов фармакологических свойств D,1-лизиний-3-метил-1,2,4-триазалил-5-тиоацетата (Лизиния) в сравнении со структурными аналогами и референтными препаратами.

Анализ результатов биологической активности субстанции Лизиния по данным доклинических исследований, которые были нами стандартизированы и качественно и количественно оценены, свидетельствуют о следующем:

D,1-лизиний-3-метил-1,2,4-триазалил-5-тиоацетат (Лизиний), рекомендуемый для лечения сердечно-сосудистой и нервной систем, проявляет выраженную кардиопротекторную активность, в основе которой лежит способность препарата ослаблять явления эндотелиальной дисфункции и возобновлять структурно функциональные нарушения миокарда. Применение Лизиния в комплексе безотлагательных мер в острый период ишемии и в течение следующих суток интенсивной терапии позволяет повысить защиту миокарда в более полном объеме жизнедеятельности организма [123-129].

4.4. ВЭЖХ и ТСХ в создании и контроле качества отечественных препаратов – производных аминокислот (глутаргин, ацелизин)

Работа выполнена коллективом сотрудников лаборатории физико-химических процессов технологии препаратов с заданными биофармацевтическими свойствами Государственного предприятия «Государственный научный центр лекарственных средств» (ГП «ГНЦЛС»), г. Харьков. В последнее время большое внимание уделяется созданию лекарственных препаратов на основе аминокислот, которые имеют жизненно важную для организма роль «строительного материала» в биосинтезе специфических тканевых белков, ферментов, пептидных гормонов эндорфинов, вазо- и нейроактивных эндогенных субстанций, пуринов, витаминов и других веществ. Значительный интерес среди производных аминокислот представляют их соединения с другими лекарственными веществами, что позволяет расширить спектр терапевтических эффектов, повысить переносимость, а также создавать на их основе новые

лекарственные формы с более высокой биодоступностью. В ГП «ГНЦЛС» под руководством А.Т.Шейна, Е.С.Назаровой, А.А.Зинченко, Л.Г.Алмакаевой, Л.А.Чайки разработан ряд лекарственных препаратов, как на основе индивидуальных аминокислот (Аминол, Октамин, Глутаргин), так и их производных с известными биологически активными веществами (Ацелизин, инъекционный раствор таурина с кальция глюконатом, глазные капли таурина с экстрактом алоэ) [20, 127-129].

Аналитическое обеспечение создания и стандартизации указанных препаратов основано на применении ВЭЖХ с использованием спектрофотометрического детектирования с пред- или после-колоночной дериватизацией аминокислот реагентами для их модификации, например, ортофталиевым альдегидом, фенилизотиоцианатом, арилфторидом, фенилтиогидантоином, 9-флуоренилметилхлороформатом и другими веществами [129].

Исследования показали, что для серийного анализа аминокислотных препаратов наиболее подходит в качестве модификатора 2,4-динитро-1-фторбензол, производные которого значительно проще разделить методом обращенно-фазовой хроматографии на колонках с привитыми октосилильными и октодецилсилильными фазами (С8 и С18). Изучение кинетики образования ряда динитрофенилпроизводных аминокислот с применением метода ВЕРХ дало возможность выбрать оптимальный режим прохождения реакции дериватизации, что существенно расширило возможности использования этого метода.

Разработаны методики количественного анализа с использованием этого реагента для определения кислот глутаминовой и аргинина (в препарате Глутаргин и его лек. формах); таурина (в инъекционном препарате с кальция глюконатом и в глазных каплях с экстрактом алоэ); смеси 12 и 8 аминокислот (в препаратах Аминол и Октамин); глицина (в субстанции D,L-лизина ацетилсалицилата (Ацелизин)).

ГЛУТАРГИН представляет собой соль глутаминовой кислоты и аргинина – L - аргинина L-глутамат.

Условия хроматографирования: в изократическом режиме на хроматографической колонке Symmetry C18 размером (3,9x150) мм, с сорбентом с размером частиц 5 мкм; температура колонки – 30 °С; детектирование при длине волны 360 нм; подвижная фаза (ПФ): ацетонитрил - ацетатный буферный раствор с рН 5,5 (13:87), со скоростью 1,0 мл/мин.

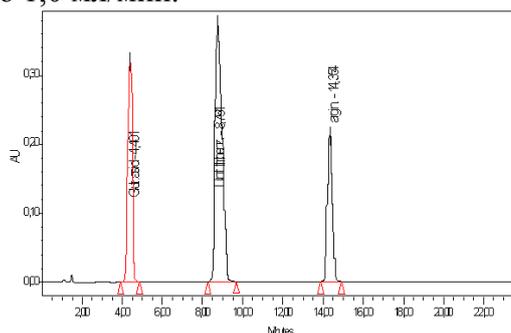


Рис. 17. Хроматограмма раствора РСО для анализа препарата Глутаргин. Порядок выхода пиков: 1 - 2,4-динитрофенилпроизводное глутаминовой кислоты; 2 - 2,4-динитрофторбензол, 3 - 2,4-динитрофенилпроизводное аргинина

Доказательство пригодности условий хроматографического определения обеспечивается введением в методику теста «Проверка пригодности хроматографической системы»: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам 2,4-динитрофенилпроизводных аргинина или кислоты глутаминовой (не менее 1000 теоретических тарелок); коэффициенты разделения пиков 2,4-динитрофенилпроизводной кислоты глутаминовой и 2,4-динитрофторбензола и

пиков 2,4-динитрофторбензола и 2,4-динитрофенилпроизводной аргинина должны быть не менее 1,5; относительное стандартное отклонение, вычисленное для площадей пиков 2,4-динитрофенилпроизводных из трех последовательных хроматограмм - не больше 1,34% и коэффициент симметрии – не больше 1,8.

АМИНОЛ, РАСТВОР ДЛЯ ИНФУЗИЙ содержит смесь 12 аминокислот: аргинина гидрохлорид, валин, гистидина гидрохлорид, глицин, изолейцин, лейцин, лизина гидрохлорид, метионин, аланин, пролин, треонин, триптофан, фенилаланин.

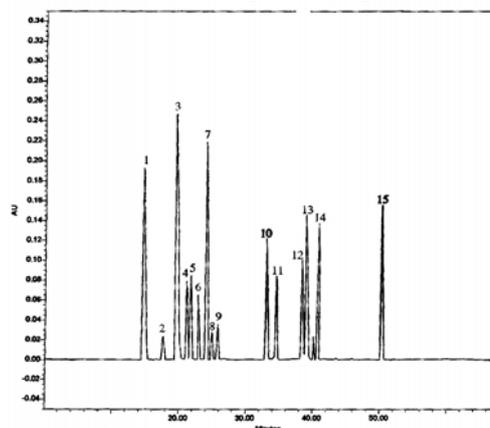


Рис. 18. Хроматограмма раствора РСО для анализа препарата Аминол. Порядок выхода пиков 2,4-динитрофенилпроизводных аминокислот: 1 - 2,4-динитрофторбензол, 2 - гистидина гидрохлорид, 3- глицин, 4- метионина сульфон, 5 - метионин, 6 - аргинина гидрохлорид, 7 - лизина гидрохлорид, 8 - аланин, 9 - пролин, 10 - треонин, 11 - валин, 12 - изолейцин, 13 – лейцин, 14 - фенилаланин, 15 - триптофан

Определение проводили на колонке Symmetry C18, (3,9x150) мм, детектирование при длине волны 360 нм в режиме градиентного элюирования со скоростью 1 мл/мин:

Время, мин	Подвижная фаза А (0,01 М раствор аммония ацетата рН 6,0)(% об/об)	Подвижная фаза Б (ацетонитрил) (% об/об)	Примечание
0-60	100 → 60	0 → 40	Линейный градиент
60-61	60 → 100	40 → 0	Линейный градиент
61-55	100	0	Изократический режим

ОКТАМИН ПЛЮС, КАПСУЛЫ содержит смесь 8 аминокислот: валин, изолейцин, лейцин, лизина гидрохлорид, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин и кальция пантотенат.

Определение проводили [135] на колонке Symmetry C18, (3,9x150) мм, детектирование при длине волны 360 нм в режиме градиентного элюирования со скоростью 1 мл/мин:

Время, мин	Подвижная фаза А (0,01 М раствор аммония ацетата рН 6,0) (% об/об)	Подвижная фаза Б (ацетонитрил) (% об/об)	Примечание
0-30	95 → 60	5 → 40	Линейный градиент
30-31	60 → 95	45 → 5	Линейный градиент
31-35	95	5	Изократический режим

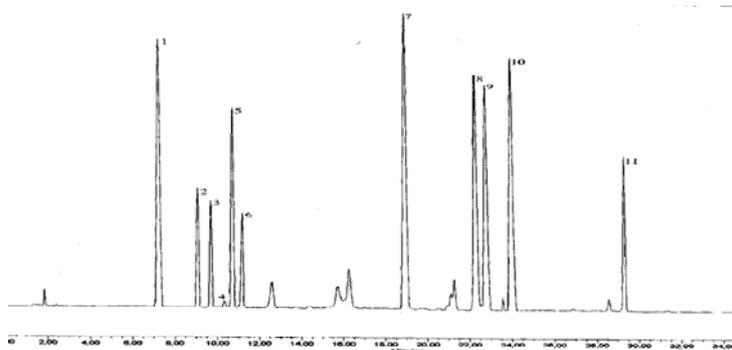


Рис. 19. Хроматограмма раствора РСО для анализа препарата Октамин плюс. Порядок выхода пиков 2,4-динитрофенилпроизводных аминокислот и кальция пантотената: 1 - 2,4-динитрофторбензол, 2 - метионина сульфон, 3 - метионин, 4 - кальция пантотенат; 5 - лизина гидрохлорид, 6 - треонин, 7 - валин, 8 - изолейцин, 9 - лейцин, 10 - фенилаланин, 11 - триптофан

АЦЕЛЗИН (D,L-лизина ацетилсалицилат) + глицин

Глицин определяли, как 2,4-динитрофенилпроизводное в следующих условия хроматографирования: в изократическом режиме на хроматографической колонке Hypersil ODS (4,6 x 250) мм, температура колонки – 30 °С; детектирование при длине волны 360 нм; ПФ: ацетонитрил - 0,01 М раствор аммония ацетата рН 6,0 (12:88), со скоростью 1,0 мл/мин.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику динитрофенилглицина, должна составлять не менее 2000 теоретических тарелок; коэффициент разделения пиков реагента и динитрофенилглицина составляет не менее 2,0; коэффициент симметрии пика, рассчитанный по пику динитрофенилглицина составляет не более 1,6; относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика динитрофенилглицина должно соответствовать требованиям Государственной фармакопеи Украины (ГФУ).

Более подробнее рассмотрим разработку методики определения аминокислот в виде 2,4-динитрофенилпроизводны на примере таурина.

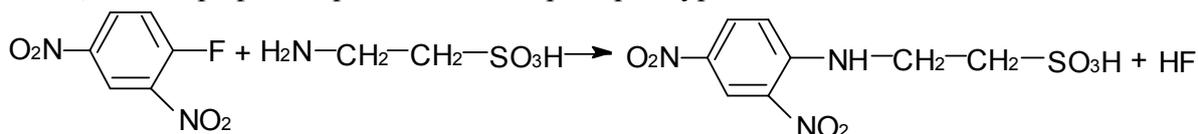


Рис. 20. Схема получения 2,4-динитрофенилпроизводного Таурина

Предыдущие исследования, которые были проведены для определения смеси аминокислот в таких препаратах, как Глутаргин, Аминол и Октамин показали, что для ускорения реакции образования 2,4-динитрофенилпроизводных целесообразно проводить эту реакцию при температуре от 40 до 60 °С.

Изучена кинетика реакции образования 2,4-динитрофенилпроизводного таурина при температуре 40±2 °С. Для чистоты эксперимента измерения проводили с использованием отдельных растворов для каждого промежутка времени - 5, 15, 30, 45, 60, 75 и 120 минут. Пробу готовили следующим образом: к 1,0 мл раствора таурина (3 мг/мл) в растворе натрия тетрабората (10 г/л) добавляли 9 мл раствора натрия тетрабората 10 г/л, 0,3 мл 3 % раствора 2,4-динитро-1-фторбензола в диоксане и выдерживали в термостате в течение вышеупомянутых промежутков времени. После чего растворы охлаждали до комнатной температуры, добавляли 10,0 мл 1,4-диоксана и доводили водой до объема 25 мл, перемешивали, фильтровали через мембранный

фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, и хроматографировали на жидкостном хроматографе фирмы «Waters» с использованием ультрафиолетового детектора. Кинетическая кривая получения 2,4-динитрофенилпроизводного таурина приведена на рис. 21.

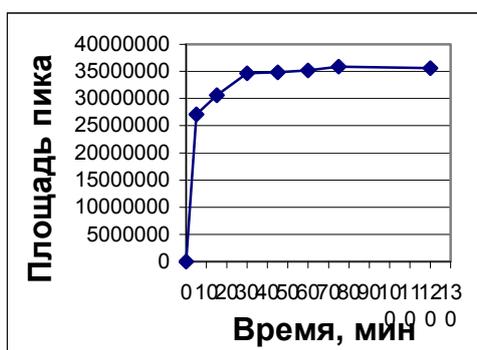


Рис. 21. Кинетическая кривая получения 2,4-динитрофенилпроизводного Таурина

Для анализа использовали хроматографическую колонку Kromasil C18 размером (4,6x250) мм, заполненную сорбентом с размером частиц 5 мкм и ПФ ацетонитрил - амониацетатный буферный раствор с pH 6,0 (25:75). Детектирование проводили при длине волны 360 нм. Условия пригодности хроматографической системы включали: эффективность хроматографической колонки, рассчитанную по пику 2,4-динитрофенилпроизводного таурина (не менее 1000 теоретических тарелок); коэффициент разделения пиков 2,4-динитрофторбензола и 2,4-динитрофенилпроизводного таурина должен быть не менее 2; относительное стандартное отклонение вычислено для площадей пиков 2,4-динитрофенилпроизводного таурина из трех последовательных хроматограмм не больше 1,34% и коэффициент симметрии (не больше 1,8). Для определения таурина использовали раствор стандартного образца (PCO) таурина, обработанный аналогично исследуемым пробам. Полученная типичная хроматограмма приведенная на рис. 22.

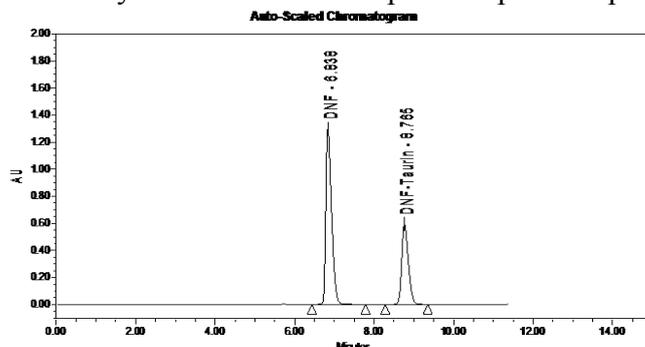


Рис. 22. Типичная хроматограмма определения Таурина методом ВЭЖХ после получения динитрофенилпроизводного Таурина. Порядок выхода пиков: 1 - 2,4-динитрофторбензол, 2 - 2,4-динитрофенилпроизводная таурина

На основании результатов, которые были получены при изучении кинетики реакции, следует, что разница между площадями пиков 2,4-динитрофенилпроизводного таурина после 30 и 60 минут составляет около 1,5 %. Таким образом, можно сделать вывод, что за 30 минут реакция образования 2,4-динитрофенилпроизводного таурина полностью завершена. В результате проведенных аналитических исследований была разработана и валидирована, в соответствии с требованиями ГФУ, методика количественного определения таурина в инъекционном препарате с кальция глюконатом. Валидацию проводили на искусственных смесях, по

составу соответствующих препарату по таким характеристикам, как селективность, правильность, точность, сходимост, линейност и область применения.

Правильност методики была проверена методом «введено-найдено». Результаты определения таурина в растворах, каждый из которых проанализирован трижды, в области аналитических концентраций, представлены в табл. 7. Из представленных данных следует, что для таурина методика анализа характеризуется достаточной сходимостю и правильностю во всем диапазоне концентраций от 80 до 120 %.

Таблица 7. Результаты анализа модельных смесей и их статистическая обработка для количественного определения Таурина

№ модельного раствора	Введено в % к концентрации раствора сравнения ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Средние площади пиков (S_i) ($S_{st} = 14590487$)	Найдено в % к концентрации раствора сравнения ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	Найдено в % к введенному ($Z_i = Y_i/X_i$, %)
1	81,97	11581296	81,97	99,46
2	87,23	12344820	87,23	99,62
3	93,27	13104130	93,27	98,88
4	97,27	13842729	97,27	100,16
5	103,13	14588598	103,13	99,58
6	108,53	15329861	108,53	99,42
7	113,73	16023701	113,73	99,18
8	118,90	16730252	118,90	99,05
9	123,30	17422175	123,30	99,46
Среднее, Z_{cp} , %				99,42
Относительное стандартное отклонение, RSDz, %				0,37
Относительный доверительный интервал, %				0,69
Критическое значение для сходимости результатов Δ_{As} , %				3,2
(границная неопределенност)				
Систематическая ошибка $\delta = Z_{cp} - 100 $				0,58
Критерий незначимости систематической ошибки 1) $0,69/3 = 0,23$ или 2) 1,02				Выполняется
Общий вывод о методике				Корректная

Установлена линейност зависимости площадей пиков 2,4-динитрофенилпроизводного таурина от концентрации в области приблизительно от 240 до 360 мкг/мл. На рис. 23 приведена линейная зависимость площади пика от концентрации таурина в нормализованных координатах.

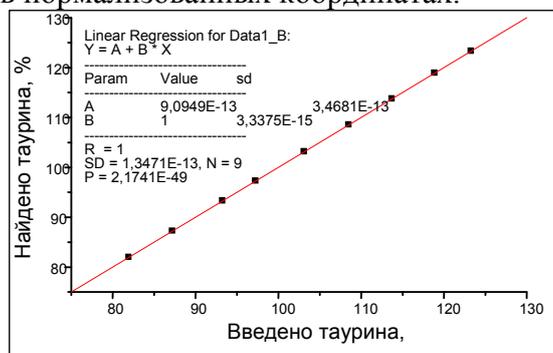


Рис. 23. Линейная зависимость площади пика от концентрации таурина в нормализованных координатах

Для доказательства отсутствия систематической погрешности при определении таурина определяли регрессионное уравнение зависимости между «введенным» и «найденным» в модельных смесях количеством таурина методом наименьших квадратов для 95 % доверительной достоверности. Как видно из Табл.2, выполняются требования к параметрам линейной зависимости, то есть линейность методики определения таурина также подтверждается во всем диапазоне концентраций (80-120 %).

Таблица 8. Расчет параметров линейной зависимости $Y = B \cdot X + A$ для таурина

Величина	Значение	Критерий (для допусков 90 – 110 %), $g = 9$)	Вывод
b	0,98697	-	-
S_b	0,00945	-	-
a	0,73816	1) $\leq 1,895 \cdot S_a = 1,86$ 2) если не выполняется 1), то $\leq 5,1$	Соответствует
S_a	0,98151	-	-
S_r	0,38124	-	-
r	0,99968	$\geq 0,9924$	Соответствует

Высокое значение коэффициента корреляции ($r = 0,99968$), которое превышает критерий приемлемости $r = 0,9924$, подтверждает линейность зависимости между взятым («настоящий») и найденным количеством таурина в области от 80 % до 120 % относительно его номинального содержания в препарате. Метрологические характеристики методики количественного определения таурина в модельных смесях, которые по составу соответствуют препарату, приведены в Табл.3.

Таблица 9. Метрологические характеристики количественного определения таурина

f	X , г/мл	X	S^2	S	S_x	P, %	$t(p, v)$	Δ_x	$\varepsilon, \%$
5	0,0283 0,0279 0,0284 0,0276 0,0282 0,0278	0,0281	$6,17 \times 10^{-8}$	$2,48 \times 10^{-4}$	$1,01 \times 10^{-4}$	95	2,57	$2,6 \times 10^{-4}$	0,93

Однако в некоторых случаях получение динитрофенилпроизводных аминокислот невозможно из-за влияния вспомогательных веществ, которые входят в состав препаратов, на характер хода реакции дериватизации или как в случае с Ацелизином, в состав которого входит D,L-лизина ацетилсалицилат. Так, например, в комбинированном растворе для перорального применения, который содержит смесь аргинина и кислоты аспарагиновой, на хроматограмме испытуемого раствора после проведения реакции с 2,4-динитро-1-фторбензолом время удерживания пиков не совпадает со временем удерживания этих пиков на хроматограмме раствора сравнения. Проведенные исследования показали, что нипагин и нипазол, которые введены в

состав препарата в качестве консервантов, взаимодействуют с аспарагиновой кислотой во время проведения реакции дериватизации.

Исходя из этого, была разработана методика [137-138] определения аргинина и кислоты аспарагиновой без получения производных с использованием хроматографической колонки Waters Spherisorb CNRP размером (4,6 × 250) мм, в качестве ПФ применяли ацетонитрил – фосфатный буферный раствор pH 6,0 (1:99), детектирование проводят при длине волны 200 нм. Типичная хроматограмма раствора стандартного образца (PCO) аргинина и кислоты аспарагиновой в отмеченных условиях приведена на рис. 24.

Условия пригодности хроматографической системы: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам аргинина и кислоты аспарагиновой, не менее 2000 теоретических тарелок; коэффициент разделения пиков аргинина и кислоты аспарагиновой – не менее 3,0; коэффициент симметрии пиков аргинина и кислоты аспарагиновой – не больше 1,8; относительное стандартное отклонение вычислено для площадей пиков из трех последовательных хроматограмм не больше 1,34 %.

В результате проведенных аналитических исследований была разработана и валидирована, в соответствии с требованиями ГФУ методика количественного определения аргинина и кислоты аспарагиновой в комбинированном препарате. Специфичность и селективность теста подтвердили тем, что время удерживания пиков аргинина и кислоты аспарагиновой на хроматограмме испытуемого раствора совпадает со временем удерживания этих пиков на хроматограмме раствора сравнения с точностью ± 2 % и выбранные условия хроматографирования позволяют разделить пики аргинина и кислоты аспарагиновой, а также других веществ (плацебо), которые входят в состав препарата.

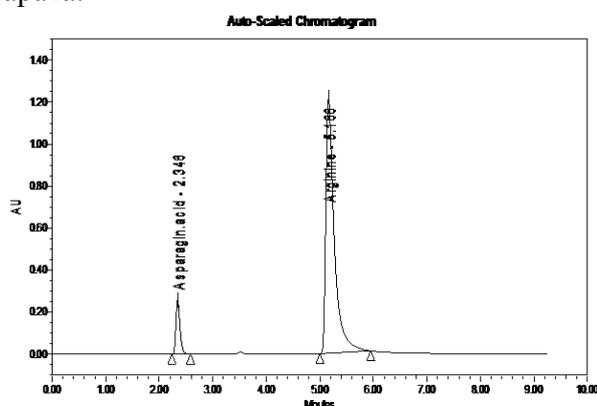


Рис. 24. Типичная хроматограмма раствора стандартного образца (PCO) аргинина и кислоты аспарагиновой методом ВЭЖХ

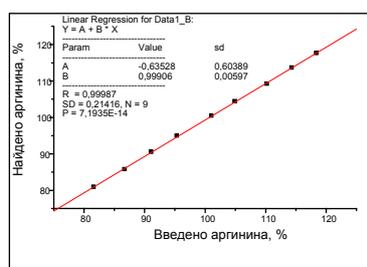


Рис. 25. Линейная зависимость площади пика от концентрации аргинина в нормализованных координатах

На модельных смесях, которые по составу соответствуют препарату, установлена линейность зависимости площадей пиков аргинина от концентрации в области 880 –

1320 мкг/мл и кислоты аспарагиновой в области 720 – 1080 мкг/мл. На Рис.9 и 10 приведена линейная зависимость площади пика от концентрации аргинина и кислоты аспарагиновой, соответственно, в нормализованных координатах.

С учетом результатов исследований по валидации аналитической методики количественного определения аргинина и кислоты аспарагиновой пределы $\pm 10\%$ от номинального содержания корректны поскольку методика характеризуется достаточной сходимостью (найденное значение относительного доверительного интервала величины \bar{Z} аргинина и кислоты аспарагиновой 0,43 и 0,62 %, соответственно, оказывается меньше критического значения для сходимости результатов 3,2 %), а величина полной неопределенности методики количественного определения аргинина и кислоты аспарагиновой (Δ_{As}) составляет 1,63 и 1,83 % соответственно, что не превышает критического значения $\max \Delta_{As} = 3,2\%$. Методика характеризуется достаточной правильностью, так как выполняется критерий незначимости систематической ошибки (δ) методики. Систематическая ошибка методики составляет для аргинина 0,74 % и для кислоты аспарагиновой 0,82 % удовлетворяет требованиям практической незначимости ($\delta \leq 1,02$).

Методика характеризуется достаточной правильностью, так как выполняется критерий незначимости систематической ошибки (δ) методики. Систематическая ошибка методики составляет для аргинина 0,74 % и для кислоты аспарагиновой 0,82 % удовлетворяет требованиям практической незначимости ($\delta \leq 1,02$).

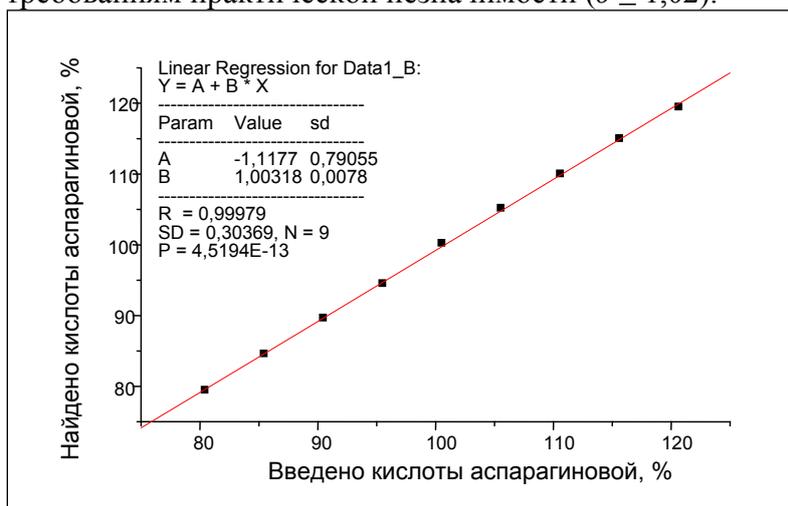


Рис. 26. Линейная зависимость площади пика от концентрации кислоты аспарагиновой в нормализованных координатах

Высокое значение коэффициента корреляции для аргинина и кислоты аспарагиновой $r = 0,99987$ и $0,99979$, соответственно (рис. 25 и 26), удовлетворяет требованиям критерия приемлемости ($r = 0,9924$) и подтверждает линейность зависимости между взятыми и найденными количествами веществ в области концентраций от 80 % до 120 % относительно их номинального содержания.

Выполняются требования к параметрам линейной зависимости a (для аргинина по 1 и 2 критерию: $a = 0,63528 \leq 1,895 \times S_a = |1,1444|$ и $a = 0,63528 \leq 1$ и для кислоты аспарагиновой по 1 и 2 критерию: $a = 1,1177 \leq 1,895 \times S_a = |1,4981|$ и $a = 1,1177 \leq 1$) методики определения аргинина и кислоты аспарагиновой во всем диапазоне концентраций от 80 % до 120 % от номинального значения (рис. 9 и 10).

Количественное определение D,L-лизина ацетилсалицилата в препарате АЦЕЛІЗИН проводят с использованием хроматографической колонки Eclipse Xdb-C18 (4,6 x 150) мм; в качестве ПФ применяли смесь растворителей: кислота фосфорная –

ацетонитрил – вода (2:400:600), детектирования проводили при длине волны 275 нм, температура колонки 25 °С.

4.5. ВЭЖХ в качественном и количественном анализе комбинированных препаратов (милдронат+L-аргинин, диклоцин, димецин)

4.5.1. милдронат+L-аргинин, диклоцин, димецин

Разработка новых комбинированных препаратов на основе хорошо изученных БАВ позволяет расширить номенклатуру жизненно необходимых отечественных препаратов для лечения ряда наиболее распространенных заболеваний.

Для метаболической терапии в кардиологии, неврологии, спортивной медицине и репродуктологии создан оригинальный комбинированный препарат в форме концентрата для инфузий, в состав которого в качестве действующих веществ введены милдронат и L-аргинина гидрохлорид. Проведенные исследования позволили разработать методику одновременного количественного определения L-аргинина гидрохлорида и милдроната [137] метода ВЭЖХ с использованием хроматографической колонки Waters Spherisorb CNRP, размером 250×4,6 мм, заполненной сорбентом с размером частиц 5 мкм (температура колонки – 30°С, детектирование при длине волны 205 нм). В качестве ПФ оптимальным является использование следующей смеси растворителей: ацетонитрил-буферный раствор рН 6,5 (1,2 г/л калия фосфата двухзамещенного) (4:96), при скорости 1,0 мл/мин. В данных условиях время удерживания пика аргинина составило около 4,0–4,5 мин, а милдроната – около 6,0–6,5 мин, что позволило достигнуть полного разделения пиков действующих веществ при минимальном времени хроматографирования (рис. 27).

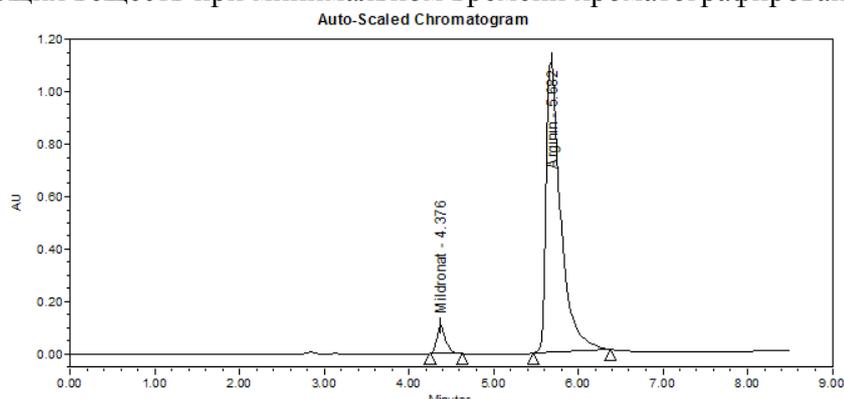


Рис. 27. Типовая хроматограмма раствора сравнения, содержащего СО аргинина гидрохлорида и СО милдроната

Доказательство пригодности условий хроматографического определения в препарате обеспечивается введением в методику теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Для раствора стандартных образцов L-аргинина гидрохлорида и милдроната в методику введены следующие условия пригодности хроматографической системы: коэффициент разделения пиков аргинина и милдроната должен быть не менее 3,0; эффективность хроматографической колонки, рассчитанная для пика аргинина или милдроната должна быть не менее 2000 теоретических тарелок; относительное стандартное отклонение (RSD), рассчитанное для площадей пиков аргинина или милдроната должно соответствовать ГФУ, 2.2.46; коэффициент симметрии пиков аргинина или милдроната должен быть не более 2,0.

Результаты валидационных исследований с использованием критерия приемлемости для допусков содержания действующих веществ $\pm 5\%$ от номинального содержания, подтверждают специфичность, линейность, прецизионность

(сходимость), правильность, диапазон применения и внутрилабораторную прецизионность предложенной методики [138].

Прогнозируемая полная неопределенность результатов анализа для теста «Количественное определение» милдроната и L-аргинина гидрохлорида составляет $\Delta_{AS}, \% = 1,11 \%$, что не более критического значения $\Delta_{A_{\text{теор}}} = 1,6 \%$ для допусков содержания $\pm 5,0 \%$, то есть методика будет давать корректные результаты в других лабораториях.

Создание и стандартизация противовоспалительных и вентонических комбинированных препаратов на гелевой основе проведены с применением ВЭЖХ и ТСХ к.фарм.н. Назаровой Е.С. под руководством чл.-корр. НАН Украины Георгиевского В.П [141].

В результате проведенных аналитических исследований были разработаны и валидированы по таким характеристикам, как селективность, правильность, точность, сходимость, линейность и область применения условия количественного определения действующих веществ, в препарате Диклоцин-КМП методом ВЭЖХ [140, 141]: колонка размером 4.0 x 250 мм, заполненная сорбентом Hypersil ODS с размером частиц 5 мкм; ПФ: ацетонитрил - вода (60:40); скорость ПФ - 1,0 мл/мин; температура колонки - 25 °С; детектирование при длине волны 230 нм.

В препарате Димецин методом ЖХ предложено одновременное определение действующих и вспомогательных веществ в следующих условиях [140, 141]: колонка размером 3.9x300 мм заполненная сорбентом Symmetry C18 с размером частей 5 мкм; ПФ - ацетонитрил - буферный раствор из рН 4.6 (75:25); скорость ПФ - 1,0 мл/мин; температура колонки - 25°С; детектирование при длине волны 230 нм.

Разработаны тест «Проверка пригодности хроматографической системы», который позволяет получить воспроизводимые и достоверные результаты анализа. Относительная неопределенность содержания диклофенака натрия в препаратах методом ВЭЖХ – 0,80-1,0 %, L- лизина эсцината – 0,9-1,2 %, ДМСО – 1,8 %, нипагина – 1,5 %.

Разработаны методики определения сопутствующих примесей [141] в препаратах методом тонкослойной хроматографии с использованием пластинок Кизельгель 60F₂₅₄ (фирма «Merck», Германия). Для диклофенака натрия в системе растворителей хлороформ - ацетон - кислота муравьиная безводная (80:1:3) установлена следующий предел примесей: отдельной примеси 1-(2,6-дихлорфенил)индолин-2-он — не более 0,5 %, суммарное содержание примесей - не более 1,0 %; для L-лизина эсцината в системе растворителей пропанол - этилацетат - вода Р (20:20:10) - не больше 2,0 %.

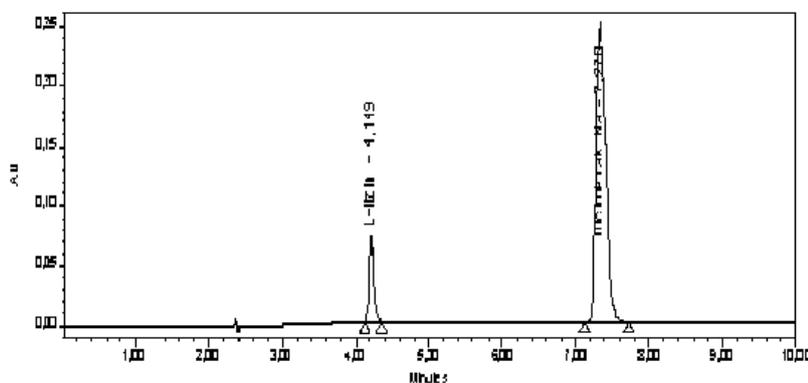


Рис. 28. Хроматограмма исследуемого раствора геля Диклоцин-КМП: 1 - L-лизина эсцинат; 2 - диклофенак натрия

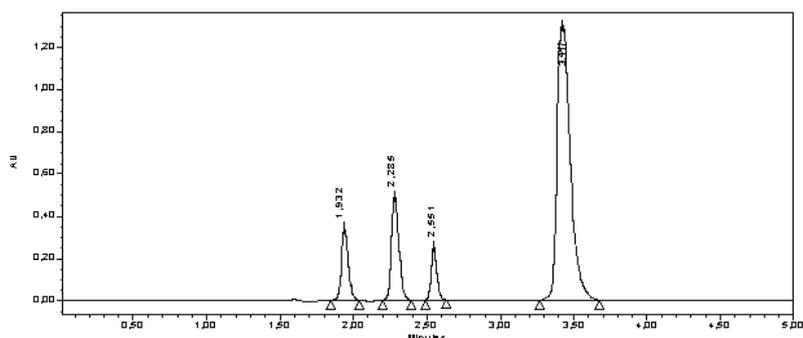


Рис. 29. Хроматограмма исследуемого раствора геля Димецин: 1 - L-лизина эсцинат; 2 – ДМСО; 3 – нипагин, 4 - диклофенак натрия

5. Контроль производства (нестабильных антибиотиках в инъекционных растворах, газовая защита ампульных растворов, получение липосомальных препаратов). Контроль производства инъекционных лекарственных средств

Исследованиями, проведенными в лаборатории фармакопейного анализа ГП «Украинский научно-экспертный фармакопейный центр качества лекарственных средств» под руководством к.фарм.н., ст.н.с. А.А.Зинченко показано применение хроматографических методов анализа в контроле технологических процессов изготовления инъекционных лекарственных форм [142-145]. Наиболее значимые из данных исследований выполнены в последние годы и внедрены в производство, а также предложены для введения в ГФУ приведены в этом разделе статьи [146, 147].

5.1. Определение продуктов разложения в препаратах для инъекций с нестабильными в растворах действующими веществами

Ряд БАВ, в частности антибиотики, нестабильны в растворах, а поэтому находят применение только в виде стерильных рассыпок или лиофилизатов. При этом контроль качества по показателям процентного содержания примесей проводят методом ВЭЖХ, одновременно с количественным определением действующих веществ, методом внутренней нормализации, без использования коэффициентов пересчета. Такой подход для контроля примесей в сухих рассыпках и лиофилизатах приводит к получению недостоверных результатов из-за возрастания примесей за счет увеличения времени хроматографирования растворов.

В Государственной Фармакопее Украины для веществ, неустойчивых в растворах, также не регламентируется процедура проведения определения сопутствующих примесей.

С целью получения объективных результатов по данным нормативной документации, а также, что не менее важно, позволяет оценить количество примесей в момент введения препарата.

Разработан общий подход к решению проблемы определения примесей в препаратах для инъекций с нестабильными в растворах действующими веществами.

На примере препарата «Цефсульпин, порошок для приготовления инъекций» показано, что предложенный кинетический метод позволяет устанавливать концентрацию примесей в препарате на момент получения инъекционного раствора, что реально соответствует качеству препарата при медицинском применении (рис. 30).

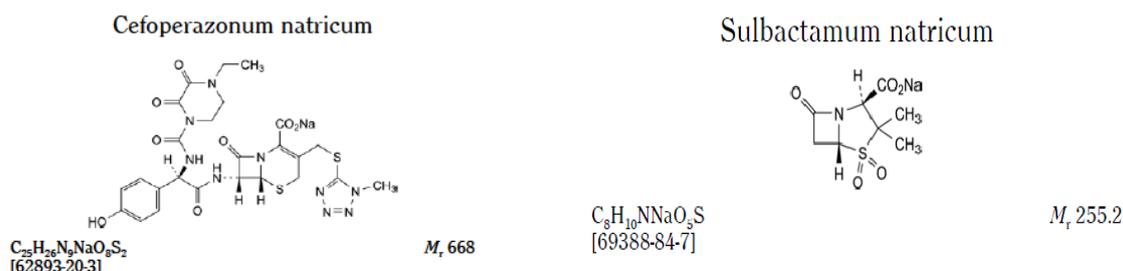


Рис. 30. Структурные формулы натриевых солей цефоперазона и сульбактама

Методика предусматривает получение через определенный временной интервал ряда хроматограмм. По результатам хроматографирования расчетным методом определяют степень и коэффициенты полиномиальной зависимости концентрации примесей от времени хранения раствора. По установленной зависимости проводят расчет концентрации примеси на исходный момент приготовления раствора, т.е. в исходном препарате.

Как правило, для простых по строению веществ, например ацетилсалициловой кислоты, метамизола натрия, продукты распада образуются по реакциям первого порядка [148]. Образование примесей в растворах более сложных соединениях, к которым относятся и антибиотики, протекает через ряд промежуточных соединений и, поскольку сами образующиеся примеси не являются в растворах устойчивыми веществами, зависимость концентрации примесей от времени приготовления раствора может быть как линейной, так и описываться более сложными полиномиальными функциями. Полиномиальный вид функций наиболее часто встречается в практике контроля сопутствующих примесей и наблюдается в случае контроля препарата «Цефсульпин». Степень полиномиальной функции подбирают расчетным путем с учетом фармакопейных требований к коэффициентам корреляции полиномиальной зависимости [149, 150].

Методика определения

Использовали жидкостный хроматограф модели LC-10, производства компании Shimadzu, Япония, в комплекте с насосом высокого давления модели LC-10 AT, спектрофотометрическим детектором модели SPD-10Avp, инжектором Rheodyne модели 7725i с дозирующей петлей объемом 5 мкм и компьютеризированным интегратором модели C-R7a plus.

Приготовление испытуемого раствора. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 50 мг препарата Цефсульпин, прибавляют около 20 мл предварительно профильтрованной и дегазированной подвижной фазы, перемешивают до полного растворения препарата, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают.

По 5 мкл полученного раствора через равные промежутки времени хроматографируют на жидкостном хроматографе со спектрофотометрическим детектором, получая не менее 5 хроматограмм в следующих условиях:

- колонка размером 100 мм × 4.0 мм, заполненная сорбентом «ReproSil Pur Vaisic», размер частиц 3 мкм;
- подвижная фаза – фосфатный буферный раствор pH 3.6 – ацетонитрил (3:1);
- скорость подвижной фазы – 0.9 мл/мин;
- температура колонки - +20 °С;
- длина волны регистрации 220 нм.

Типичная хроматограмма испытуемого раствора представлена на рис. 31.

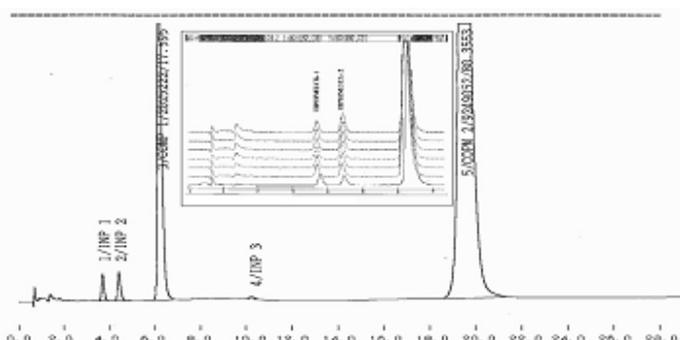


Рис. 31. Хроматограмма испытуемого раствора препарата и фрагменты хроматограмм с пиками примесей 1 и 2, полученные с интервалом около 1 ч

По завершению хроматографирования рассчитывают концентрацию единичной примеси (C_i) в препарате, в процентах, для каждой хроматограммы по формуле:

$$C_i = \frac{S_i \times 100}{\sum S}$$

где: S_i – площадь единичной примеси (i); $\sum S$ – сумма площадей всех пиков.

Результаты расчета концентраций примесей и интервалы времени между приготовлением испытуемого раствора и моментом ввода проб в хроматограф приведены в табл. 9.

Таблица 9. Результаты определения примесей в препарате «Цефсульпин, порошок для приготовления инъекций»

Время от приготовления испытуемого раствора до проведения анализа, (мин)	Концентрация примеси 1, %	Концентрация примеси 2, %	Концентрация примеси 3, %	Концентрация примеси 4, %
4.0	0.8708	0.8359	0.1685	0
62	0.8547	1.0406	0.1543	0
122	0.8525	1.1856	0.1660	0
176	0.8520	1.2869	0.1627	0
232	0.8497	1.3712	0.1685	0
294	0.8528	1.445	0.1699	0
357	0.8557	1.5161	0.1647	0.0853

Для примесей, концентрация которых возрастает от хроматограммы к хроматограмме, методом наименьших квадратов рассчитывают свободный коэффициент a уравнения зависимости концентрации примеси C_i от времени введения пробы (T): $C_i = a + f(T)$

Как видно из представленных данных, только примесь 2 имеет четкую зависимость изменения концентраций от времени, поэтому расчет коэффициентов этой зависимости проводят только для этой примеси. На рис. 32 приведены график и коэффициенты полиномиальной зависимости концентрации примеси от времени между вводами проб испытуемого раствора. Рассчитанное значение свободного члена a соответствует концентрации примеси 2 в сухом препарате, т.е. на момент прибавления первой порции растворителя. В данном случае рассчитанная концентрация примеси 2 в препарате составляет 0.82 %.

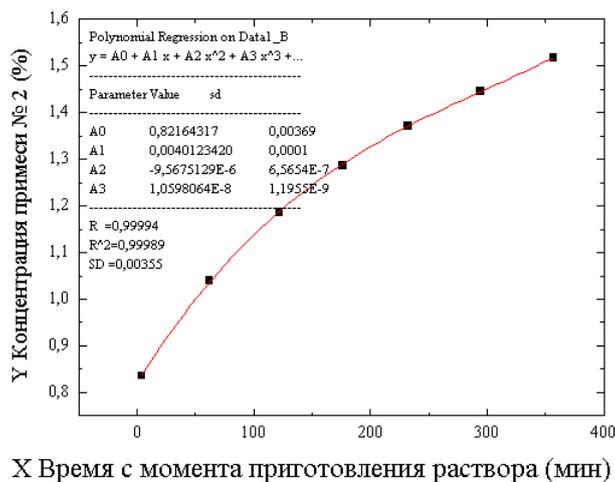


Рис. 32. График и коэффициенты полиномиальной зависимости 3-й степени концентрации примеси 2 от времени введения проб испытуемого раствора

Полученное значение концентрации единичной примеси меньше, чем допускается нормативным документом – 1.0 %. Это означает, что по этому показателю качество препарата соответствует требованиям нормативного документа (НД). Но, если провести расчет по обычной схеме, как указано в НД, рассчитав среднее значение концентрации примеси 2 по результатам всех хроматограмм, получим другой результат – 1.24 %, по которому препарат уже не соответствует требованиям НД. Рассчитанное значение содержания примесей более реально отражает ситуацию, которая складывается при медицинском применении препарата и позволяет оценивать количество примесей именно на момент инъекции препарата.

Не имея свободного от примесей препарата и индивидуальной примеси 2, проверить правильность результатов, полученных расчетным способом, возможно только единственным способом – проведя хроматографирование ряда свежеприготовленных растворов, для которых время введения проб фиксировано от момента прибавления растворителя, и сравнивая полученные данные с расчетным значением.

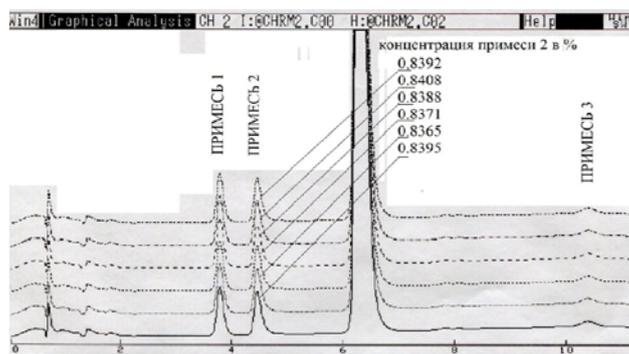


Рис. 33. Хроматограммы шести испытуемых растворов препарата, полученные через 5 мин после приготовления

Хроматограммы и результаты определения концентрации примеси 2, представленные на рис. 3, получены при введении 6 испытуемых растворов, хроматографирование которых проводили через 5.0 мин после прибавления растворителя к навеске препарата. Среднее содержание примеси 2 по результатам хроматографирования равно 0.8389 ± 0.1563 , т.е. доверительный интервал находится в

пределах от 0.683 до 0.995 %. Если подставить это же время (5 мин) в рассчитанную методом наименьших квадратов формулу, получаем значение:

$$Y=0.82164+0.00401 \times 5-9.567 \cdot 10^{-6} \times 25+1.06 \cdot 10^{-8} \times 125 \approx 0.8414.$$

Это значение входит в доверительный диапазон значений концентрации примеси 2, измененной экспериментально. Таким образом, расчетное значение концентрации примеси на момент времени, соответствующий 5 мин с момента приготовления испытуемого раствора, статистически равно экспериментально определенному значению. Соответственно, со значительной степенью вероятности расчетный метод позволит получить достоверный результат определения примеси на момент приготовления раствора для инъекций.

Таким образом экспериментально показано, что предложенный подход измерения содержания примесей в нестабильных растворах может быть использован в случаях, когда зависимость концентрации примеси от времени не является линейной, т.е. применим для антибиотиков и других сложных по строению веществ.

Предложенный подход позволяет оценить качество препарата непосредственно в момент медицинского применения и оценить количество примесей через заданный интервал времени, что позволяет установить максимальное время использования препарата с момента его приготовления.

5.2. *Определение состава газовой фазы в ампулированных лекарственных препаратах*

Производство ампульных растворов для предотвращения реакции взаимодействия БАВ и вспомогательных веществ, способных в растворенном виде реагировать с кислородом с образованием продуктов, ухудшающих качество препарата, требует удаления остаточных количеств кислорода, а также замещения воздуха газовой фазы в ампуле инертным газом: азотом, аргоном и др. непосредственно перед запайкой ампул. Поэтому установление (контроль) состава газовой фазы на всех этапах производства от пуско-наладочных работ, валидационных исследований технологических процессов и, особенно, на стадии выходного контроля готовой продукции.

Зинченко А. А. разработана методика определения состава газовой фазы в ампулированных лекарственных препаратах методом адсорбционной газовой хроматографии.

Пробоподготовка.

Применение этого метода предполагает вскрытие ампулы, отбор газовой пробы и её хроматографирование. Поскольку объём газовой фазы в ампулах вместимостью (1–2) мл незначителен (около 150 мкл), её отбор должен проводиться, по возможности полно, избегая при этом попадания воздуха и жидкой фазы в отбираемую пробу. Для отбора таких малых газовых проб были использованы газоплотные шприцы вместимостью (100-250) мкл и изготовленное автором приспособление (рис. 34).

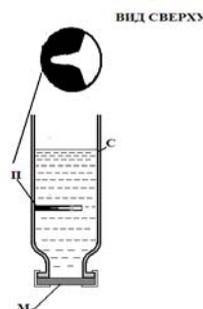


Рис. 34. Приспособление для вскрытия и отбора газовой фазы в ампулах

Это приспособление состоит из прозрачного стеклянного сосуда (С) у которого удалено дно, а горловина закрыта силиконовой мембраной (М), которую используют для герметизации сосудов при проведении анализа равновесной паровой фазы. Внутри сосуда клеем закреплена изготовленная из сплава Т15К6 пластина (П), в которой сделан V образный заточенный пропилен.

При отборе пробы в сосуд помещают около 10 мл свежeproкипяченного насыщенного раствора натрия хлорида, ампула опускается в раствор вверх дном таким образом, чтобы уровень отрезания находился под слоем жидкости (рис. 35), с помощью пропила твердосплавной пластины делается надрез ампулы (А) и отламывается конец ампулы (Б). Поскольку все операции проводят в слое жидкости, контакт газовой фазы ампулы с атмосферой отсутствует. Высокая плотность насыщенного раствора натрия хлорида предотвращает быстрое перемешивание самого препарата с раствором, помещенным в сосуд.

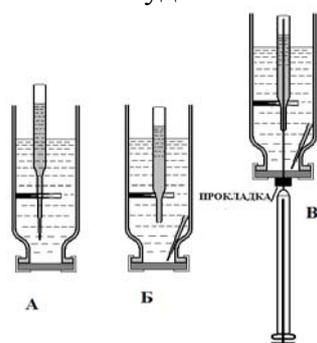


Рис. 35. Последовательность отбора газовой фазы из запаянной ампулы

Отбор газовой фазы ампулы проводится предварительно промытым газом-носителем газоплотным шприцом, на иглу которого надета резиновая прокладка от блоков испарителей газовых хроматографов (В). После отбора пробы шприц вынимают из ампулы и сосуда, а конец иглы шприца герметизируют резиновой прокладкой. Ввод пробы осуществляют обычным способом.

Условия хроматографирования.

Газовую пробу объемом 100 - 250 мкл хроматографируют на газовом хроматографе с термокондуктометрическим детектором в следующих условиях:

- колонка стеклянная, размером 360 см × 3,2 мм, заполненная сорбентом - «Молекулярные сита 5А», размер частиц 80 – 100 меш;
- температура колонки – 0 °С;
- скорость газа носителя (гелий) – 30 мл/мин
- температура детектора – 50 °С;
- ток детектора – 80 % от предельного, указанного в инструкции по эксплуатации прибора (для модели GC-14В – 160 мА).

Содержание каждого компонента (X_i) газовой фазы ампулированного препарата рассчитывают по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \times 100}{\sum S}$$

где: S_i – площадь пика определяемого компонента на хроматограммах испытуемой пробы; $\sum S$ – суммарная площадь всех пиков на хроматограммах испытуемой пробы.

Методика позволяет получить полное разделение пиков кислорода и аргона и количественно определять кислород в концентрациях от 0,05 % (объемных).

Метрологические характеристики методики были оценены путем хроматографирования атмосферного воздуха и газовой смеси азот – кислород – аргон

с концентрациями аргона и кислорода по 1 % [5, 6], поскольку эти концентрации газов реально встречаются при контроле качества препаратов.

Для расчета метрологических характеристик методики при хроматографировании воздуха использовали табличные значения содержания кислорода (20.948 %) и аргона (0.934 %). Смесь с содержанием по 1 % кислорода и аргона готовили в лабораторных условиях. Именно эти концентрации были выбраны как наиболее часто встречающиеся при определении реальных объектов. Результаты расчета представлены в табл. 10 и 11.

Таблица 10. Результаты определения концентрации аргона и кислорода в атмосферном воздухе

Наименование определяемого компонента	Введено (% об/об)	Введено (в нормализованных %)	Найдено	
			%, об/об	В нормализованных координатах (%)
АРГОН	0.934	100	0.9305	99.627
			0.9381	100.443
			0.9310	99.678
			0.9465	101.341
			0.9322	99.810
			0.9312	99.698
			0.9283	99.392
			среднее значение, Z_{cp} , %	99.998
	систематическая ошибка, $\delta\% = Z_{cp} - 100 $	0.002		
	относительное стандартное отклонение, $RSDz$, %	0.675		
доверительный интервал Δz % = $t(7-2) \times RSDz = 2.015 \times 0.675$	1.36			
КИСЛОРОД	20.9486	100	20.967	100,088
			21.113	100,785
			20.982	100,161
			20.967	100,089
			20.988	100,187
			20.937	99,946
			21.035	100,41
			среднее значение, Z_{cp} , %	100.238
	систематическая ошибка, $\delta\% = Z_{cp} - 100 $	0.231		
	относительное стандартное отклонение, $RSDz$, %	0.279		
доверительный интервал Δz % = $t(7-2) \times RSDz = 2.015 \times 0.279$	0.56			

Как видно из приведенных данных, систематическая ошибка определения кислорода в газовой смеси не превышает 0.3 %. Величина стандартного относительного отклонения около 0.7 %. При этом суммарное значение неопределенности результатов методики при использовании стандартизованных калибровочных смесей газов для определения поправочных коэффициентов не превышает 1.5 %. Эти величины метрологических характеристик более чем достаточны для методики определения примесей, каковым в данном случае является кислород.

Приведенная выше разработанная методика была использована для контроля ряда ампулированных препаратов, в том числе и препарата, состав которого близок к составу препарата «Мильгама», а так же при валидации технологических процессов производства инъекционных препаратов. Типичная хроматограмма, полученная при определении состава газовой фазы в запаянной ампуле при валидации технологического процесса запайки в инертном газе, представлена на рис. 36.

Таблица 11. Результаты определения концентрации аргона и кислорода в газовой смеси содержащей по 1 % аргона и кислорода

Наименование определяемого компонента	Введено (% , об/об)	Введено (в нормализованных %)	Найдено	
			% , об/об	в нормализованных координатах (%)
АРГОН	1.00	100	1.008	100.8
			1.010	101.0
			0.994	99.4
			0.998	99.8
			1.016	101.6
			0.995	99.5
			0.998	99.8
			среднее значение, Z_{cp} , %	100.20
			систематическая ошибка, $\delta\% = Z_{cp} - 100 $	0.20
			относительное стандартное отклонение, $RSDz$, %	0.736
доверительный интервал $\Delta z \% = t(7-2) \times RSDz = 2.015 \times 0.736$	1.48			
КИСЛОРОД	1.00	100	1.003	100,3
			1.000	100
			1.008	100,8
			0.997	99,7
			0.998	99,8
			0.999	99,9
			1.014	101,4
			среднее значение, Z_{cp} , %	100.27
			систематическая ошибка, $\delta\% = Z_{cp} - 100 $	0.27
			относительное стандартное отклонение, $RSDz$, %	0.619
доверительный интервал $\Delta z \% = t(7-2) \times RSDz = 2.015 \times 0.619$	1.25			

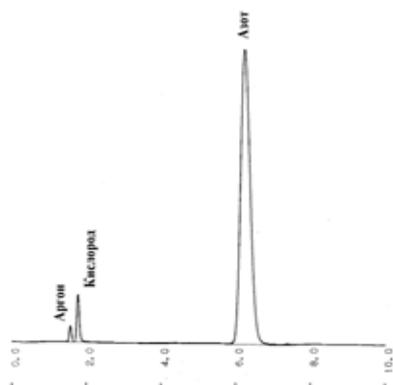


Рис. 36. Хроматограмма газовой фазы ампулы, полученная при валидации технологического процесса запайки в инертном газе

5.3. Метод определения невключённого вещества в липосомальной форме доксорубицина методом ВЭЖХ

Липосомы представляют собой сверхмолекулярные структуры, состоящие из одного или более липидных бислоев сферической формы. Строение липосом предполагает наличие гидрофильных и гидрофобных участков, что обуславливает способность липосом инкапсулировать и удерживать активные ингредиенты.

Важнейшими характеристиками липосом являются: усреднённый размер, общее содержание фосфолипидов и степень инкапсулирования (удерживания) активного вещества внутри липосомы. Степень инкапсулирования - особо важный показатель для водорастворимых активных субстанций.

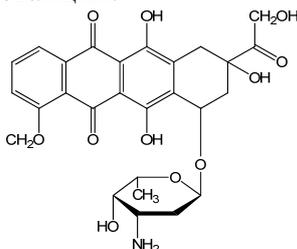


Рис. 37. Структурная формула доксорубицина

Стадниченко А.В. и Краснопольский Ю.М. изучили степень и инкапсуляции антрациклиновых антибиотиков [154, 155, 156] и предложили методику определения степени включения активного вещества – доксорубицина внутри липосомы (рис. 37). Методика основана на применении гель-фильтрации с оборудованием для ВЭЖХ применительно к водорастворимым БАВ [157].

Ими показано, что липосомы, как надмолекулярные соединения, выходят в «мёртвом» объёме, а активное действующее вещество задерживается в порах геля, за счёт чего достигается разделение. В процессе разделения в условиях эксперимента липосомы будут стабильны и явление «утечки» активного вещества не будет иметь место (рис. 38).

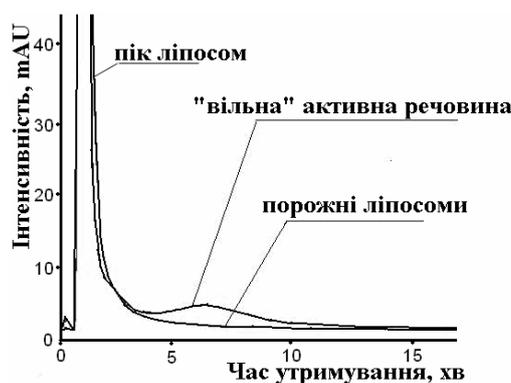


Рис. 38. Хроматограмма липосомальной формы доксорубицина гидрохлорида и хроматограмма пустых липосом (СФ-детектор)

Из рис. 38 видно распределение между пиком липосом, входящих в объем, который не задерживается, и интракапсулированного доксорубицина. Для сравнения приведена хроматограмма «пустых», т.е. незагруженных липосом.

В ходе исследования использовались такие приборы и оборудование: жидкостный хроматограф Agilent 1100 с четырёхканальным насосом, автосамплером, термостатом колонок, диодно-матричным детектором G1315B; флуориметрический детектор Gilson 121; самописец Kipp&Zonen BD 40 40/06; колонка Tricorn High-

Performance Column (фирма Amersham Biosciences), заполнения гелем на основе полидекстрана с диапазоном эксклюзии 500 – 2000 Да.

В качестве подвижной фазы использован фосфатный буферный раствор pH 5.2 ± 0.2. Кислотность среды подобрана таким образом, чтобы липосомы в условиях эксперимента были стабильны, в то же время среда достаточно кислая для предотвращения деструкции доксорубина. Детектирование осуществлялось на двух типах детекторов: диодно-матричном - универсальном детекторе; флуориметрическом - высокочувствительном к антибиотикам антрациклинового ряда. Детектирование на диодной матрице осуществлялось при длине волны 254 нм, результаты фиксировались с помощью интегратора. Для флуориметрического детектора: фильтр возбуждения – 430-470 нм, фильтр испускания – 560-650 нм, результаты фиксировали с помощью самописца. Объем вводимой пробы – 1 мкл.

Пробоподготовка. При работе с липосомальными лекарственными формами необходимо принимать во внимание тип и состав анализируемых липосом. Так, липосомы покрытые слоем полиэтиленгликоля, пролонгированного действия и выпускаемые в виде жидкой лекарственной формы могут иметь очень высокие степени инкапсулирования (до (90–100) %). В свою очередь, липосомы без полимерного покрытия могут иметь степень инкапсулирования (50–60) % [1]. Концентрация доксорубина для липосом, покрытых слоем полиэтиленгликоля, составляет 2 мг/мл, а для липосом, не модифицированных полимером – 1 мг/мл. При этом концентрация свободного доксорубина может составлять около 1 мг/мл в первом случае и (0.4 – 0.5) мг/мл во втором. Область интересующих концентраций невключённого доксорубина при этом составляет (0.1–0.5) мг/мл.

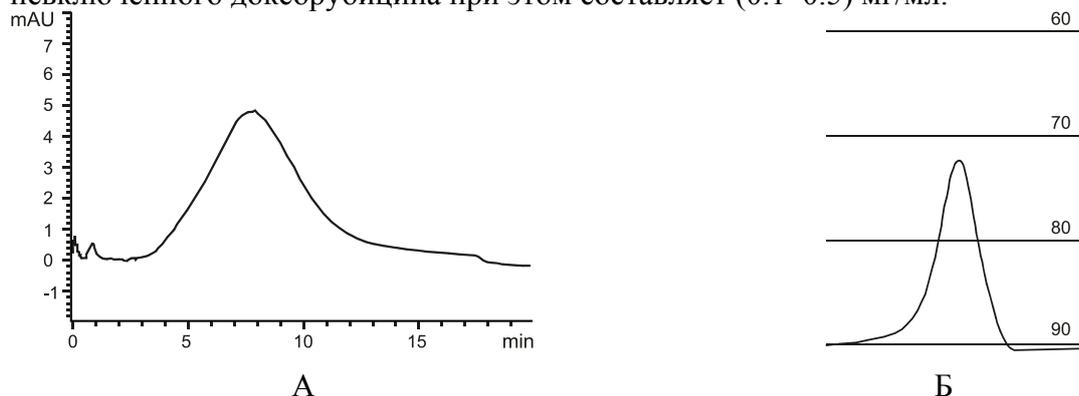


Рис. 39. Калибровочные хроматограммы: А - спектрофотометрический детектор, длина волны 254 нм; Б - флуориметрический детектор; содержание доксорубина 0.4 мг/мл

Приготовлены калибровочные растворы с содержанием доксорубина в подвижной фазе 0.1 мг/мл; 0.2 мг/мл; 0.4 мг/мл; 0.5 мг/мл. Неудерживаемый объем колонки определяли с помощью Blue Dextran 2000 кДа. Каждый из приготовленных растворов хроматографировали по 2 раза с одновременным детектированием на спектрофотометрическом и флуориметрическом детекторах.

Приготовленные калибровочные растворы были измерены, по полученным данным построены калибровочные графики (рис. 40). Хроматограммы представлены на рис. 3. Для построения калибровочных графиков использовали величины высоты пиков. Данные, использованные для построения калибровочных графиков, представлены в табл. 12. Метрологические характеристики приведены в табл. 13.

Измеряемые растворы хроматографировали без разведения, вводимый объем составлял 1 мкл. Детектирование осуществляли на двух типах детекторов при

указанных выше условиях. Концентрацию невключённого доксорубина вычисляли по полученным калибровочным графикам.

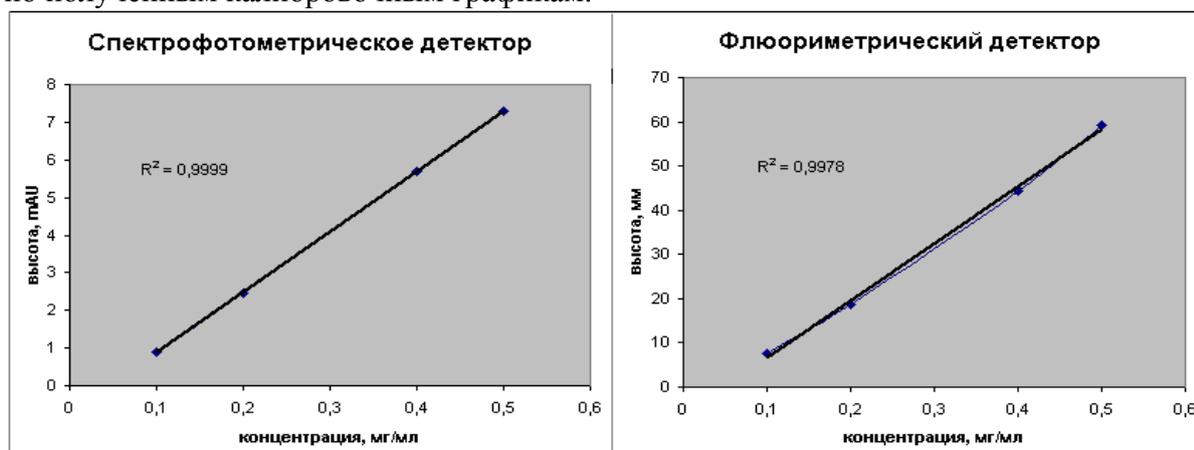


Рис. 40. Калибровочные графики для измерения невключённого вещества (для спектрофотометрического и флуориметрического детектирования)

Таблица 12. Данные, использованные для построения калибровочных графиков

Концентрация доксорубина, мг/мл	Флуориметрическое детектирование		Спектрофотометрическое детектирование	
	h_{1-f}	h_{2-f}	h_{1-s}	h_{2-s}
0.1	7.6	7.7	0.9	0.9
0.2	18.5	18.6	2.4	2.5
0.4	44.4	44.4	5.7	5.7
0.5	59.2	59.1	7.3	7.3

Примечания: h_{k-f} – высота пика в k параллели (флуориметрическое детектирование); h_{k-s} – высота пика в k параллели (спектрофотометрическое детектирование).

Таблица 13. Метрологические характеристики графиков вида $Y=B \cdot X+A$, $R=95$

Спектрофотометрический детектор		
	значение	остаточное стандартное отклонение
A	-0.72	0.0305
B	16.05	0.0901
	коэффициент корреляции	остаточное стандартное отклонение
	0.9999	0.0285
флуориметрический детектор		
	значение	остаточное стандартное отклонение
A	-6.21	1.4604
B	128.85	4.3067
	коэффициент корреляции	остаточное стандартное отклонение
	0.9978	1.36192

Из табл. 13 видно, что калибровочный график по спектрофотометрическому детектору обладает более низким, по сравнению с флуориметрическим детектором, значением стандартного отклонения, что делает спектрофотометрический детектор более приемлемым для определения невключённого доксорубина в определяемом диапазоне. На рис. 40А (спектрофотометрический детектор) при концентрациях 0.1 мг/мл заметен шум детектора (около 0.2 mAU). В то же время, на флуориметрическом детекторе измерения проводились на шкале 75 % чувствительности прибора. Можно предположить, что использование флуориметрического детектора будет предпочтительно при определении концентраций свободного доксорубина ниже 0.1 мг/мл, однако в этом случае потребуется повторное построение калибровочного графика для исследуемого диапазона. Оба калибровочных графика имеют достаточно высокий показатель линейности.

На рис. 41 представлены хроматограммы липосомальной формы доксорубина (рис. 40 Б) (2 мг/мл) и раствора доксорубина (рис. 41 А) (2 мг/мл). Концентрация доксорубина в обоих случаях одинакова, но так как его включение в липосомы составляет 100 %, пик свободного доксорубина на хроматограмме липосомальной формы отсутствует, а весь доксорубин выходит в виде инкапсулированной в липосомы форме.

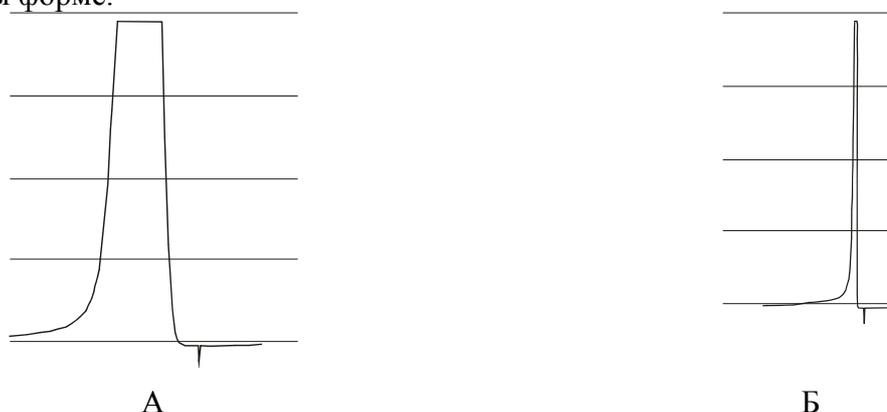


Рис. 41. Хроматограммы раствора доксорубина (А) и липосомальной формы доксорубина (Б) (флуориметрический детектор)

На рис. 42 представлена хроматограмма липосомальной формы доксорубина с концентрацией свободного доксорубина 0.1 мг/мл

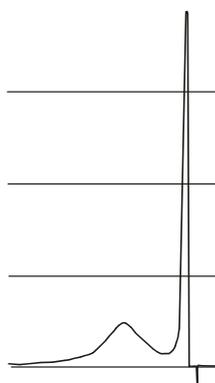


Рис. 42. Хроматограмма раствора липосомальной формы доксорубина с добавкой свободного доксорубина (концентрация 0.1 мг/мл) (флуориметрический детектор)

Для проверки точности методики к раствору липосом (100 % включение) были добавлены различные количества доксорубина. Концентрация свободного доксорубина (введенного), концентрации свободного доксорубина, найденные по калибровочным графикам, а также статистическая обработка ($P=0.95$, $n=6$) приведены в табл. 14.

Таблица 14. Проверка методики методом «введено-найденно»

Концентрация свободного доксорубина а введенного, мг/мл	Флуориметрический детектор				Спектрофотометрический детектор				
	концентрация свободного доксорубина найденного, мг/мл				концентрация свободного доксорубина найденного, мг/мл				
0.1		0.101				0.100			
		0.101				0.099			
		0.101				0.100			
		0.100				0.099			
		0.100				0.099			
		0.099				0.099			
		$X_{cp} \pm \Delta X$	RSD, %	$\epsilon, \%$	$\delta, \%$	$X_{cp} \pm \Delta X$	RSD, %	$\epsilon, \%$	$\delta, \%$
		0.1003±0.000	0.81	0.66	0.30	0.0993±0.000	0.51	0.42	0.70
		67				42			
	0.3		0.294				0.298		
		0.295				0.300			
		0.305				0.294			
		0.303				0.294			
		0.295				0.281			
		0.292				0.280			
		$X_{cp} \pm \Delta X$	RSD, %	$\epsilon, \%$	$\delta, \%$	$X_{cp} \pm \Delta X$	RSD, %	$\epsilon, \%$	$\delta, \%$
		0.2973±0.004	1.78	1.47	0.90	0.2911±0.007	2.95	2.43	2.96
		39				09			
0.5			0.472				0.481		
		0.496				0.479			
		0.506				0.516			
		0.465				0.537			
		0.452				0.510			
		0.479				0.497			
		$X_{cp} \pm \Delta X$	RSD, %	$\epsilon, \%$	$\delta, \%$	$X_{cp} \pm \Delta X$	RSD, %	$\epsilon, \%$	$\delta, \%$
		0.4783±0.016	4.17	3.44	4.34	0.5033±0.018	4.41	3.64	0.66
		47				35			

Примечания: $X_{cp} \pm \Delta X$ – граничное значение доверительного интервала среднего результата; RSD – относительное стандартное отклонение, %; ϵ – относительная неопределённость среднего результата, %; δ – относительная величина систематической ошибки определения свободного доксорубина, %

Как видно из табл. 14, для спектрофотометрического детектора относительная величина систематической ошибки соизмерима со значением относительной неопределённости среднего результата измерений. В то же время для

флуориметрического детектора при концентрациях 0.5 мг/мл значение относительной величины систематической ошибки возрастает, что может быть связано с приближением к верхней области линейного диапазона детектирования.

Методика применима для определения степени инкапсулирования доксорубина в липосомальной форме препаратов в диапазоне (0.1–0.5) мг/мл. Предпочтение можно отдать спектрофотометрическому детектору как более распространенному и показавшему более низкое значение относительной величины систематической ошибки в середине диапазона (не более 3 %, что позволяет статистически достоверно определять степень инкапсулирования при полуширине интервала допуска 10 % согласно требованиям ГФУ). Методику можно использовать при анализе липосомальных форм других водорастворимых препаратов. При этом модификации может подвергнуться состав буферного раствора, тип колонки и способ детектирования.

6. Перспективы применения нового метода - мицеллярной ВЭЖХ в контроле качества синтетических, фитохимических препаратов и ЛРС

Развитие МЖХ связано не только с исследованиями фундаментальных вопросов, относящихся к особенностям подвижной и стационарной фаз, но и с вопросами, касающимися внедрения методик с использованием метода МЖХ в практику рутинного анализа биологически активных веществ, к которым можно отнести лекарственные субстанции (синтетические и те, которые выделены из растительного сырья), готовые лекарственные средства, лекарственное растительное сырье и препараты на его основе [158-167].

На примере анализа действующих компонентов таблеток и раствора для инфузий «Бисептол» продемонстрированы возможности и преимущества метода МЖХ перед методом ОФ ВЭЖХ [168]. Экономичность методики с использованием МЖХ по сравнению с существующей методикой с использованием ОФ ВЭЖХ проявляется в значительном сокращении расхода подвижной фазы за счет уменьшения ее скорости подачи, и, соответственно, за счет уменьшения расхода органического модификатора, а экологичность методики в том, что мицеллярная подвижная фаза не содержит токсичные ацетонитрил и триэтиламин.

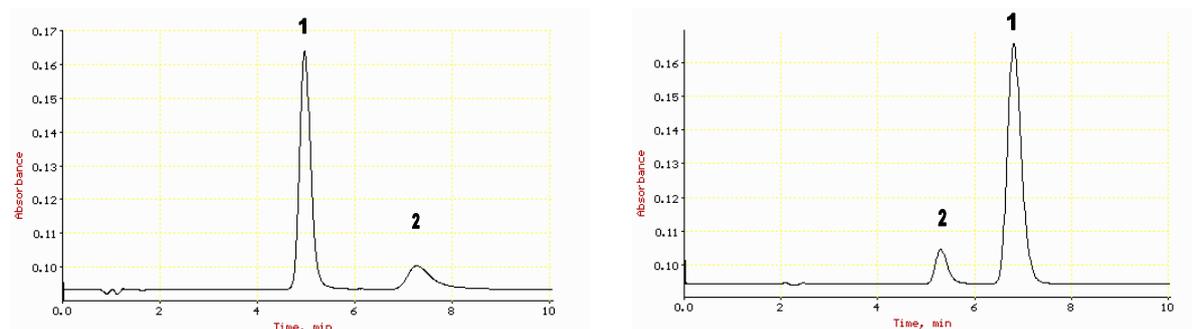


Рис. 43. Хроматограммы разделения сульфаметоксазола (1) та триметоприма (2) методами МЖХ (слева) и ОФ ВЭЖХ (справа)

Если же говорить о метрологических характеристиках методики с использованием МЖХ, то, судя по представленным данным, она практически не уступает аналогичным характеристикам методики ОФ ВЭЖХ (табл. 15). То есть методика с использованием МЖХ может быть альтернативой существующей методике с использованием ОФ ВЭЖХ для анализа препаратов типа «Бисептол».

Для метода МЖХ ранее не рассматривался вопрос об его использовании для анализа лекарственных субстанций. Одним из показателей, которые контролируются в субстанции с использованием хроматографических методов это содержание примесей.

На рис. 44 представлены хроматограммы определения примесей в субстанциях салициловой и ацетилсалициловой кислоты. Результаты контроля содержания примесей по методикам с использованием ОФ ВЭЖХ сильно зависят от марки используемого обращено-фазового сорбента. Как было показано ранее [158], сорбенты, модифицированные компонентами мицеллярной подвижной фазы, практически не проявляют различия в хроматографических свойствах. Следовательно, для данного случая результат определения не будет зависеть от марки используемого сорбента. Кроме того, если обратить внимание на хроматограммы для ацетилсалициловой кислоты (рис. 44), то можно увидеть, что время анализа сокращается более чем вдвое, и методика МЖХ позволяет определить большее количество примесей по сравнению с ОФ ВЭЖХ.

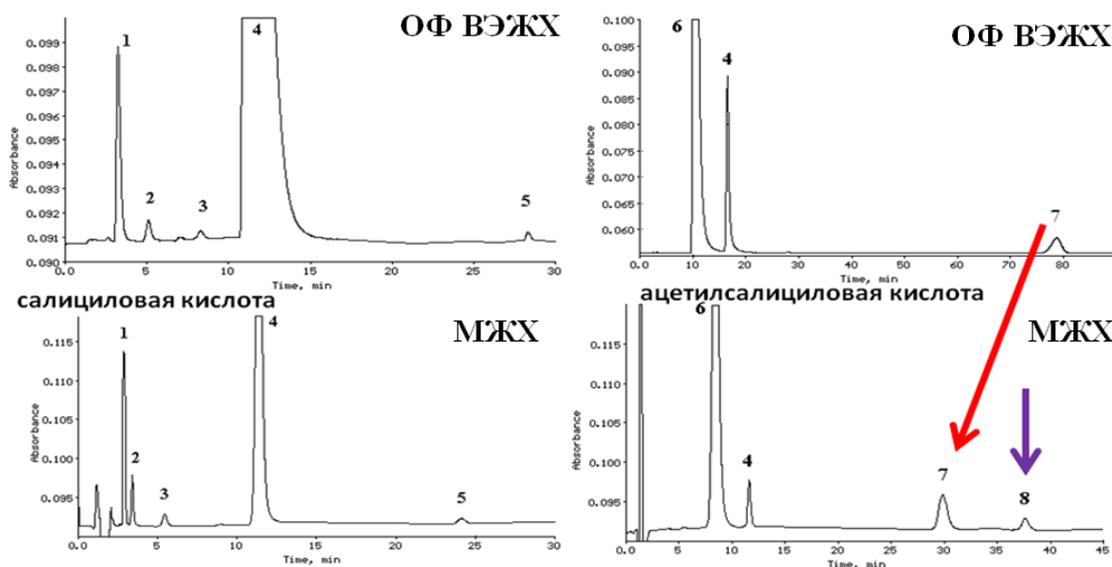
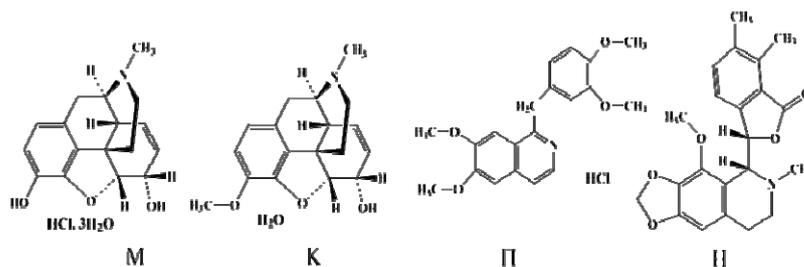


Рис. 44. Хроматограммы определения примесей в субстанциях салициловой кислоты (слева) и ацетилсалициловой кислоты (справа) двумя методами. 1 – 4-гидроксibenзойная кислота; 2– 4-гидроксиизофталева́я кислота; 3 – фенол; 4 – салициловая кислота; 5 – салицилсалициловая кислота; 6 – ацетилсалициловая кислота; 7 – ацетилсалицилсалициловая кислота; 8 – ацетилсалициловый ангидрид

Также на примере определения примесей в субстанции фолиевой кислоты было продемонстрировано, что МЖХ лишена одной из основных проблем ОФ ВЭЖХ – проблемы «аналогичных» сорбентов, и результаты определений не зависят от марки используемого сорбента.

Еще один пример преимущества метода МЖХ – определение алкалоидов в инъекционном растворе «Омнопон» [167]. Ранее в лаборатории фармакопейного комитета Украины была разработана и утверждена методика с использованием градиентной ОФ ВЭЖХ для количественного определения представленных алкалоидов, которую и сейчас используют для контроля качества инъекционного лекарственного средства. Метод МЖХ позволяет в изократическом режиме элюирования разделить те же самые алкалоиды в два раза быстрее (рис. 45).



М – морфина гидрохлорид; К – кодеин; П – папаверина гидрохлорид; Н – носкапин

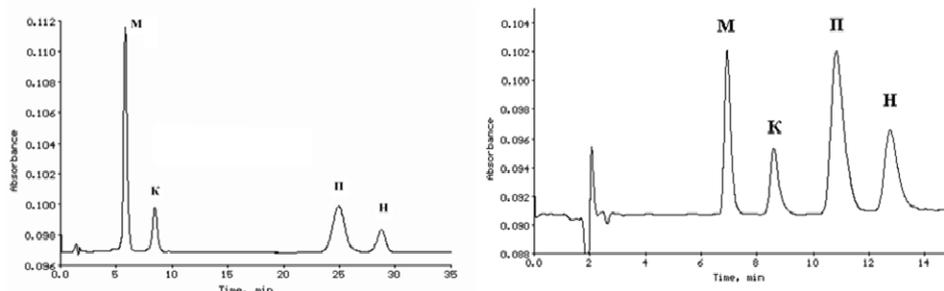


Рис. 45. Хроматограммы раствора препарата «Омнопон», полученные методами ОФ ВЭЖХ (слева) и МЖХ (справа)

Таблица 15. Сравнение метрологических характеристик методик определения сульфаметоксазола и триметоприма, полученных по двум хроматографическим методикам

	Сульфаметоксазол		Триметоприм	
	МЖХ	ОФ ВЭЖХ	МЖХ	ОФ ВЭЖХ
Диапазон линейности, мкг/мл	14-340	17-340	5.6-78	3.9-78
a (S _a)	715.7·10 ² (1.6·10 ²)	633.5·10 ² (1.3·10 ²)	502.1·10 ² (2.1·10 ²)	338.8·10 ² (0.7·10 ²)
b (S _b)	-7·10 ⁴ (4·10 ⁴)	9.3·10 ⁴ (3·10 ⁴)	3·10 ⁴ (1.1·10 ⁴)	1·10 ³ (3·10 ³)
R	0.9999	0.9999	0.9998	0.9999
Предел детектирования, мкг/мл	4.4	3.6	1.8	0.8
Предел количественного определения, мкг/мл	13.2	10.8	5.6	2.5
Прецизионность, %	0.6	0.2	0.7	0.3

6.1. Методики анализа биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье методом МЖХ

Определение действующих веществ лекарственного растительного сырья представляет собой достаточно сложную хроматографическую задачу, так как одновременно приходится определять содержание веществ различной гидрофобности.

МЖХ позволяет одновременно разделять вещества различной гидрофобности в изократическом режиме. В качестве объектов исследования были выбраны

флавоноиды – самый распространенный класс биологически активных веществ, встречающихся в лекарственном растительном сырье, и которые включает в себя гидрофильные гликозиды и гидрофобные агликоны.

Для исследования были выбраны 14 флавоноидов различной гидрофобности и для оптимизации состава мицеллярной подвижной фазы было исследовано их удерживание в 12 подвижных фазах. Оптимизацию разделения проводили с использованием программы, разработанной к.х.н. А.П. Бойченко [166, 168] на основе предложенной модели изменения микроокружения сорбата. На рисунке представлена трехмерная зависимость критерия разделения всех пиков на хроматограмме от состава элюента. В результате оптимизации были выявлены области максимальных значений критерия разделения в том числе и за пределами экспериментально исследованного диапазона (рис. 46), которые позволяли разделить практически все флавоноиды. Смоделированные хроматограммы разделения флавоноидов с использованием выбранных составов мицеллярных подвижных фаз достаточно хорошо согласовывались с хроматограммами, содержащими разделяемые флавоноиды (рис. 47).

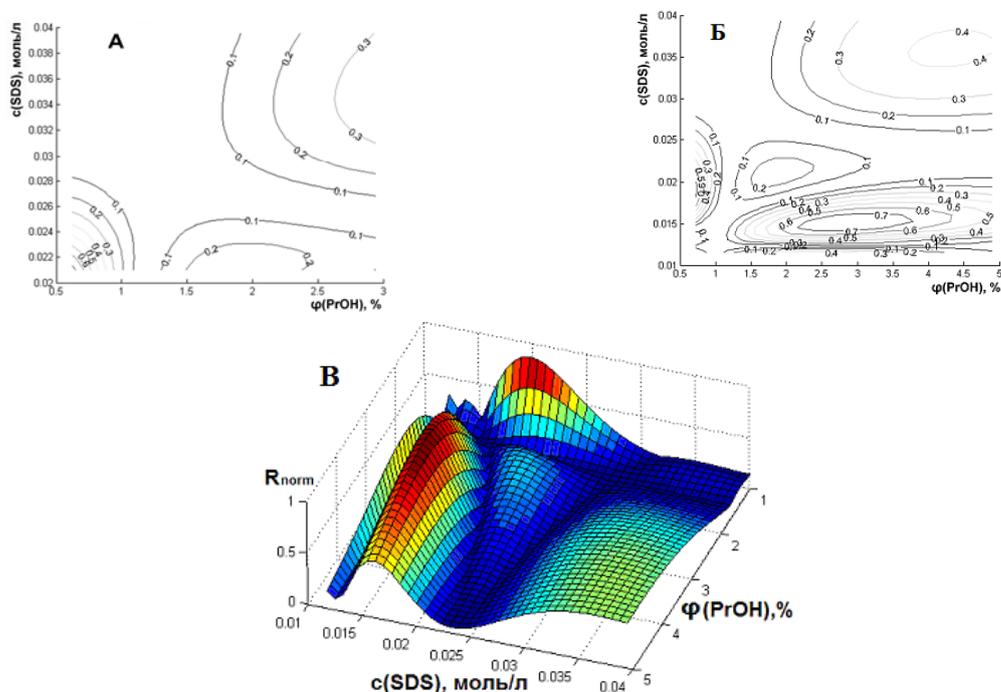


Рис. 46. Контурная карта зависимости нормализованного разделения от концентрации додецилсульфата натрия и содержания 1-пропанола: А – область экспериментальных данных, Б – расширенная область; В – 3D-поверхность

Флавоноиды – не единственный класс биологически активных соединений лекарственного растительного сырья, которые можно определять при помощи МЖХ. Разработана методика определения сесквитерпеновых кислот валерианы лекарственной как альтернатива фармакопейной методики с использованием градиентного ВЭЖХ [168]. Разработанная методика хотя и не дает существенного преимущества во времени анализа, зато значительно сокращает его себестоимость за счет отказа от градиентного элюирования и расхода органических растворителей.

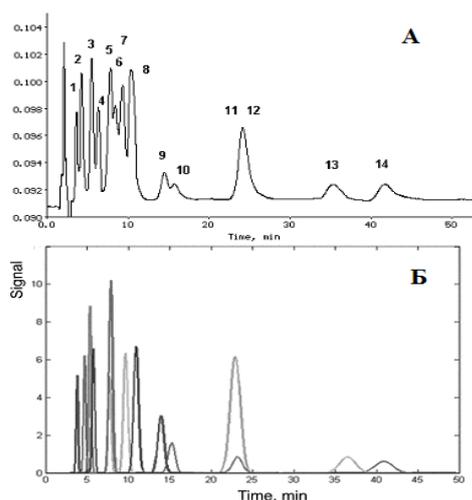


Рис. 47. Экспериментально полученная (А) и предсказанная (Б) хроматограммы 14 флавоноидов. Подвижная фаза: 0.015 моль/л SDS, 3.0 % 1-PrOH, pH 6.9; $\lambda = 355$ нм; T=40 °С. 1 – флаворин; 2 – рутин; 3 – гиперозид; 4 – кверцитрин; 5 – лютеолин-7О-гликозид; 6 – ликурозид; 7 – апигенин-7О-гликозид; 8 – изосалипурпозид; 9 – мирицетин; 10 – физетин; 11 – лютеолин; 12 – апигенин; 13 – кверцетин; 14 – кемпферол

Антрахиноны – еще один класс полифенольных соединений, для определения которых используют ОФ ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования (рис. 48); одно хроматографическое определение, согласно литературным данным, занимает чуть более часа. Разработанная и предложенная методика с использованием МЖХ позволяет работать в изократическом режиме элюирования (рис 49 и 50) значительно сокращает как время анализа (в 2-3 раза), так и его себестоимость, что немаловажно для рутинного анализа растительного сырья, в состав которого входят антрахиноны [167].

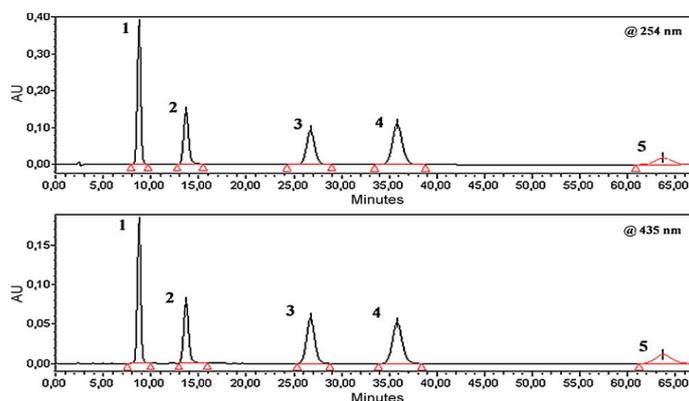


Рис. 48. ВЭЖХ хроматограмма разделения алоэ-эмодина (1), реина (2), эмодина (3), хризофанол (4) и фисиона (5)

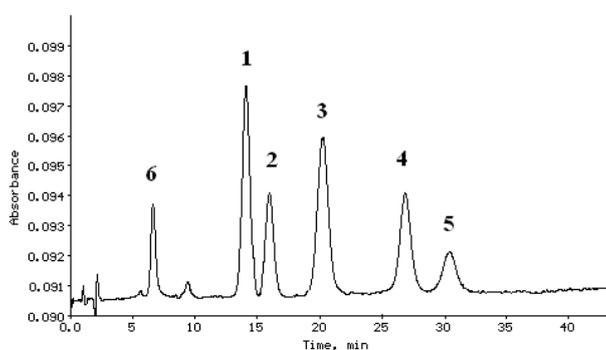


Рис. 49. МЖХ хроматограмма модельной смеси антрахинонов. 1 – реин; 2 – эмодин; 3 – реум-эмодин; 4 – хризофанол; 5 – фисион; 6 – сумма франгулинов и глюкофрангулинов

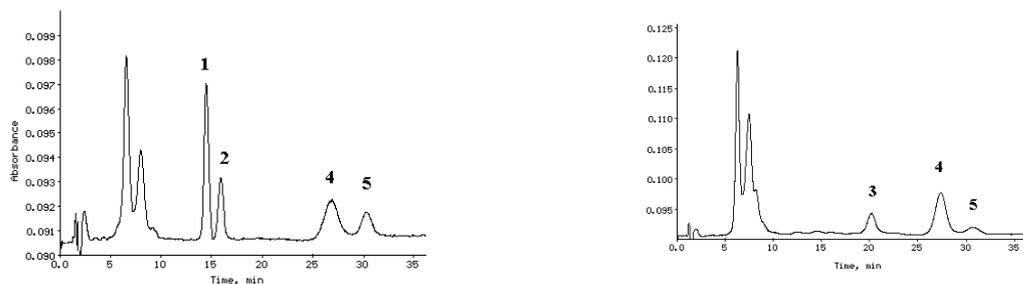


Рис. 50. МЖХ хроматограммы экстрактов растительного лекарственного сырья. Сверху - вниз: экстракт коры крушины, экстракт корней ревеня, экстракт корневищ щавеля. 1 – реин; 2 – эмодин; 3 – реум-эмодин; 4 – хризифанол; 5 – фисцион

7. Хроматографические методы в анализе и стандартизации фитопрепаратов и лекарственного растительного сырья (ЛРС)

7.1. Сквален

Значительный интерес представляют исследования, выполненные к.фарм.н. А. А. Зинченко по применению хроматографических методов в анализе природных масел (масло амаранта, масла оливкового, масла аронии черноплодной) по содержанию сквалена (2,6,10,15,19,23) – гексаметил-трнраноза-2,6,10,14,18,22-гексан), обладающего антиоксидантной активностью. Эти масла широко применяются в различных фармацевтических и косметических препаратах. Наряду со скваленом в состав этих масел входят триглицериды, в количествах, значительно превосходящие сквален. При хроматографировании они накапливаются в начальной части колонки, выполняя функции дополнительной неподвижной фазы, что негативно сказывается на воспроизводимости времени удерживания и формы пиков сквалена, что и было показано автором (рис. 51) и учтено при разработке 3-х методик количественного определения сквалена методом ГХ, 2-х методик методом ВЭЖХ и методики ТСХ.

Прогресс в создании аналитического оборудования для ТСХ позволил проводить количественное определение БАВ в растительном сырье, что и показано автором на примере определения сквалена в лекарственном растительном сырье. Как и в случае разработанных им методик ГХ и ВЭЖХ методика позволяет определить сквален без предварительного выделения неомыляемого остатка масла.

Первоначально методика количественного определения сквалена в маслах была разработана на газовых хроматографах моделей GC-7 и GC-14 В и была рассчитана на использование стеклянной или стальной набивной колонки с размещенной в испарителе кварцевой вставкой. Во вставке, помимо слоя кварцевой ваты, размещали слой сорбента толщиной (2.0–2.5) см, который некоторое время удерживал триглицериды масла. Одна вставка с новым сорбентом позволяет получить до 15 хроматограмм испытуемого раствора масла, что вполне достаточно для контроля 1-3 образцов масла. При проведении валидационных исследований по требованиям ГФУ требуется уже не менее 5 замен вставок, что существенно осложняет процесс исследования. С такими же трудностями встречаются при контроле нескольких серий масел.

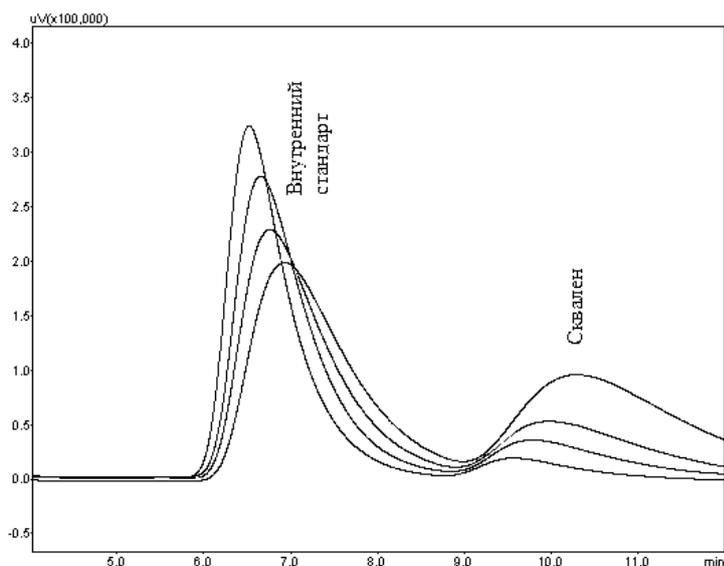


Рис. 51. Хроматограммы испытуемого раствора масла со скваленом полученные при обычной схеме подключения колонки (Показаны последовательно 1-я, 10-я, 20-я и 30-я хроматограммы)

Чтобы устранить мешающее влияние основных по массе мало летучих компонентов пробы была использована представленная на рис. 52 схема подключения колонок. На схеме изображены подключенный к инжектору дополнительный делитель потока и дополнительный подвод вспомогательного газа, которые объединены с предколонкой, заполненной сорбентом. Поток газа-носителя, проходящий через инжектор, и поток вспомогательного газа переключаются посредством 4-х портового крана. Принцип работы такой схемы заключается в том, что перед введением пробы основной поток газа-носителя (35 мл/мин) проходит через испаритель хроматографа. Поток поддувочного газа, подаваемый в колонку после делителя, составляет около 5 мл/мин. После введения анализируемой пробы в испаритель хроматографа основная часть всех компонентов, включая триглицериды жирных кислот, попадает в слой сорбента, расположенный между делителем потока и дополнительным подводом газа. После прохождения хроматографических зон внутреннего стандарта и сквалена места подвода вспомогательного газа, по временной программе хроматографа, переключают положение 4-х портового крана, что приводит к переключению потоков и основное количество газа-носителя подается в колонку уже после делителя. Практически одновременно с переключением 4-х портового крана (через 0.01 мин) происходит срабатывание клапана, который открывает основной канал делителя потока. При этом направление потока газа-носителя в предколонке меняется на противоположное и менее летучие, чем сквален компоненты пробы попадают в поглотитель. Таким образом, в течение времени полного выхода хроматографической зоны сквалена, происходит очищение начальной части сорбента от других компонентов пробы. При разработке методики такую схему подключения колонки использовали как для насадочной, так и для капиллярной колонке. При применении капиллярной колонки в качестве предколонки использовали капиллярную колонку длиной 1.5 м с внутренним диаметром основной колонки.

Преимущество использованной схемы состоит в том, что все переключатели потоков газов, располагаются вне зоны высоких температур. А это позволяет использовать более доступные пневматические элементы. Практически эта схема подключения хроматографических элементов является так называемой «backflush» системой, которые находят в последнее время широкое применение в нефтехимической промышленности и при контроле объектов окружающей среды. Данных об использовании подобных схем при контроле лекарственных средств в

доступных источниках нет. Поэтому все разработанные методики непосредственного определения сквалена в растительных маслах, а именно - методика с использованием насадочной колонки, методика с применением капиллярной колонки в режиме «без деления потока газа-носителя» и методика с использованием капиллярной колонки в режиме деления потока газа-носителя были исследованы по основным критериям валидационных характеристик. С целью минимизации ошибок измерения был выбран метод внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали близкое к сквалену по физическим свойствам и химической структуре вещество – сквалан. Преимуществом данного вещества является то, что на применяемых в методиках сорбентах пик сквалана располагается непосредственно перед пиком сквалена, что не приводит к увеличению времени анализа в сравнении со случаем, когда внутренний стандарт выходит за пиком определяемого компонента.

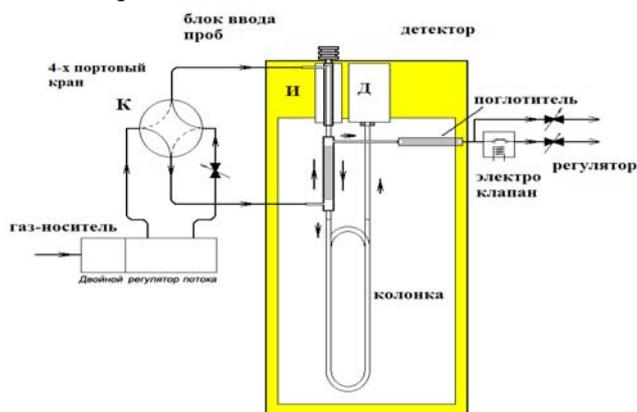


Рис. 52. Схема хроматографической системы, предназначенная для непосредственного определения сквалена в жирных маслах

Разработка методик и исследование их основных валидационных характеристик были выполнены на оборудовании производства фирмы Shimadzu, Япония. При этом применяли газовые хроматографы моделей GC-14B и GC-2014. Хроматограф GC-14B оснащен двойным испарителем насадочных колонок и автоматическим инжектором модели АОС – 14 и интегратором С-R7a Plus. Хроматограф GC-2014 оснащен пламенно-ионизационным детектором, одинарным инжектором насадочных колонок, инжектором для капиллярных колонок SPL-2014 и автоматическим самплером модели АОС-5000. Из насадочных колонок наиболее приемлемыми оказались колонки, заполненные сорбентом «Chromosorb W» с нанесенной в количестве 5 % неподвижной фазой «Lukopren G1000» (метилвинилполисилоксан). Нанесение неподвижной фазы проводили методом фильтрации. Из капиллярных колонок приемлемое разделение было получено на колонках с малополярной неподвижной фазой OV-1 производства «CS-Chromatography Service GmbH», Германия и VS-1, производства АОЗТ «Витохром», Российская Федерация.

Для переключения потоков газа-носителя применен 4-х портовый кран (кат. № 221-26253-96), управляемый пневматическим активатором модели VLA-1 (кат. № 221-25930-91). Для управления потоком газа-носителя, проходящим через поглотитель, использовали управляемый пневматический клапан US-5M-37 (кат. № 040-50271). При работе на хроматографе модели GC-2014 для управления активатором и пневматическим клапаном использовали внешний источник напряжения 100 В.

Навески масел и сквалена взвешивали на весах модели AUW120D с неопределенности взвешивания 0.02 мг.

В качестве стандартного образца применяли сквален, производства «Sigma-Aldrich» США, серии 120M1645V, с заявленным содержанием основного вещества 100 % (GC).

Методики

Приготовление испытуемого раствора и раствора сравнения сквалена, вне зависимости от используемых режимов хроматографирования, проводили следующим образом:

Приготовление испытуемого образца. 500 мг (точная навеска) исследуемого образца масла помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 20.0 мл раствора внутреннего стандарта, перемешивают до полного растворения образца, доводят объём раствора циклогексаном до метки и перемешивают.

Приготовление образца сравнения. 25 мг (точная навеска) стандартного образца сквалена помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 20.0 мл раствора внутреннего стандарта, перемешивают до полного растворения сквалена, доводят объём раствора циклогексаном до метки и перемешивают.

Хроматографирование проводили при каждом условии из приведенных в табл. 1.

Содержание сквалена в масле, в процентах, рассчитывают по формуле:

$$\frac{B \times m_0 \times 100}{B_0 \times m},$$

где: В – среднее значение отношение площадей пиков сквалена к площадям внутреннего стандарта, рассчитанное из хроматограмм испытуемого раствора; В₀ – среднее значение отношение площадей пиков сквалена к площадям внутреннего стандарта, рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения сквалена; m₀ – масса навески СО сквалена, в миллиграммах; m – масса навески препарата, в миллиграммах.

Таблица 16. Режимы хроматографирования модельных образцов сквалена

Условия хроматографирования	Режимы хроматографирования по типу колонок и деления потока		
	насадочная колонка	капиллярная колонка в режиме деления потока	капиллярная колонка без деления потока
колонка	стеклянная размером 110 см × 0.32 см	кварцевая, размером 25 м × 0.25 мм	кварцевая, размером 10 м × 0.55 мм
сорбент	хромосорб АW с нанесенной в количестве 5 % неподвижной фазой “Lukopren G1000”	OV-1 (метилполисилоксан), толщина 0.25 мкм	VS-1 (метилполисилоксан), толщина 0.25 мкм
температура колонки	245 °С	300 °С	250 °С
температура испарителя	375 °С	380 °С	380 °С
температура детектора	280 °С	380 °С	380 °С
скорость газа-носителя (мл/мин)	35	0.9	7.0
деление потока	нет	1:80	нет
объём вводимой пробы (мкл)	1.0	1.0	0.2

Валидация методик

Исследование валидационных характеристик методик проводили на модельных образцах, полученных путем добавок навесок сквалена к навескам масла подсолнечного рафинированного, в котором сквален отсутствовал. Модельные растворы готовили с концентрациями сквалена от 0.5 до 12 % в масле, что перекрывает весь возможный диапазон содержания сквалена в растительных маслах. Приготовленные образцы хроматографировали в каждом из приведенных в табл. 16 условий, получая по 3 параллельных результата. Параллельно с модельными растворами хроматографировали испытуемый образец масла амаранта, полученный методом сверхкритической экстракции диоксидом углерода с модификатором в условиях, обеспечивающих избирательное извлечение скваленовой фракции, и раствор сравнения сквалена, получая по 5 параллельных результатов. Хроматограммы модельных растворов, полученные с использованием насадочной и капиллярной колонок в режимах с делением потока и без деления потока газа-носителя, показаны на рис. 53–55.

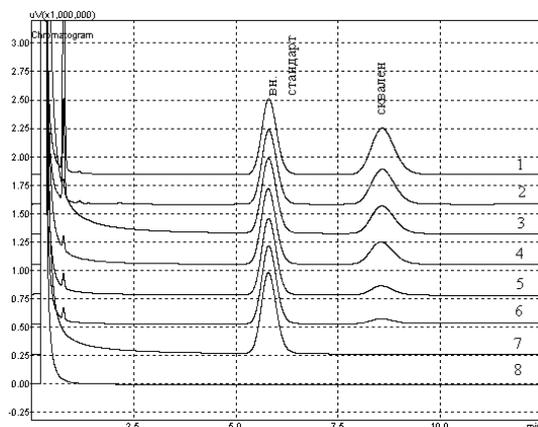


Рис. 53. Хроматограммы модельных растворов жирного масла с добавкой сквалена (1-6), раствора внутреннего стандарта (7) и раствора масла (8), полученные на насадочной колонке

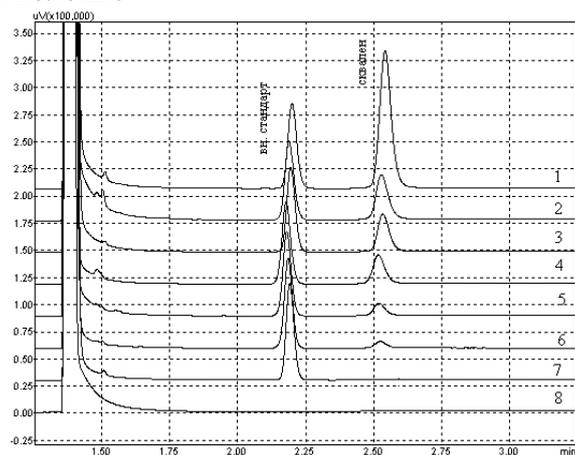


Рис. 54. Хроматограммы модельных растворов жирного масла с добавкой сквалена (1-6), раствора внутреннего стандарта (7) и раствора масла (8), полученные на капиллярной колонке в режиме без деления потока газа-носителя

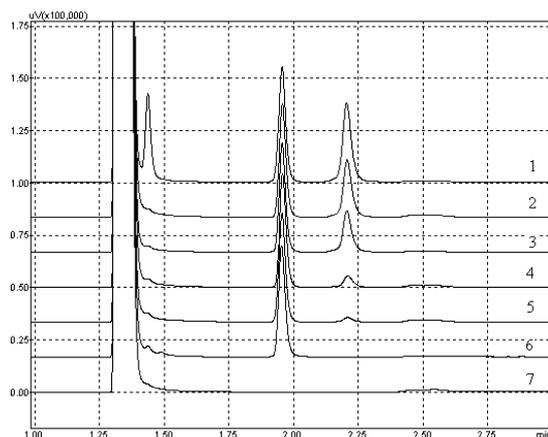


Рис. 55. Хроматограммы модельных растворов жирного масла с добавкой сквалена (1-5), раствора внутреннего стандарта (6) и раствора масла (7), полученные на капиллярной колонке в режиме деления потока газа-носителя

Пригодность аналитической методики количественного определения оценивают, исходя из установленного в ходе фармацевтической разработки допуска содержания определяемого вещества в лекарственном препарате [175]. В данном случае такой подход мало приемлем, поскольку исследуемые объекты являются растительными маслами и критериев допуска содержания в них сквалена не существует. Поэтому по результатам исследования метрологических характеристик конечной аналитической операции (Δ_{FAO}) и неопределенности операций пробоподготовки (Δ_{Sp}) можно рассчитать общую неопределенность методик количественного определения сквалена.

Величина неопределенности пробоподготовки складывается из неопределенности взвешивания навески исследуемого масла 500 мг (0.04 %), навески стандартного образца (СО) сквалена 25 мг (0.8 % на обычных аналитических весах), и взятия двух аликвот раствора внутреннего стандарта по 20 мл одной и той же пипеткой (по 0.1 %). Суммарная величина неопределенности пробоподготовки составляет (Δ_{Sp}) = $(0.04^2 + 0.8^2 + 2 \times 0.1^2)^{1/2} = 0.81$ %.

Величину неопределенности конечной аналитической операции (Δ_{FAO}) определяли по результатам хроматографирования испытуемого раствора реального образца масла амаранта и раствора сравнения сквалена. Поскольку испытуемый образец, кроме внутреннего стандарта и сквалена, содержит и другие компоненты масла, значение величин неопределенности для испытуемого раствора и раствора стандарта могут отличаться друг от друга. Поэтому при расчете величины суммарной неопределенности конечной аналитической операции учитывали каждое из этих значений.

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{\frac{RSD_{isp} \cdot t(95\%, n_{isp} - 1)}{\sqrt{n_{isp}}} + \frac{RSD_{st} \cdot t(95\%, n_{st} - 1)}{\sqrt{n_{st}}}}$$

где: RSD_{isp} и RSD_{st} – относительные стандартные отклонения для отношений площадей пиков сквалена к площадям пиков внутреннего стандарта, рассчитанные из хроматограмм испытуемого раствора и раствора сравнения, соответственно; n_{isp} и n_{st} – количество параллельных измерений, для испытуемого раствора и раствора сравнения, соответственно; $t(95\%, n_{isp} - 1)$ и $t(95\%, n_{st} - 1)$ – односторонний коэффициент Стьюдента для доверительной вероятности 95 % и числа степеней свободы для испытуемого раствора и раствора сравнения, соответственно.

Результаты хроматографирования испытуемого раствора, раствора сравнения сквалена и результаты расчета суммарной неопределенности конечной аналитической

операции и суммарной неопределенности методики (Δ_{As}) для всех режимов хроматографирования представлены в табл. 17.

Как свидетельствуют представленные в табл. 17 данные, суммарная неопределенность методики во всех исследуемых режимах хроматографирования удовлетворяет требования к суммарной неопределенности даже при 5 %-ном допуске содержания определяемого вещества ($\Delta_{As} < 1.6 \%$).

Таблица 17. Результаты расчета суммарной неопределенности конечной аналитической операции

№ измерений	Величины отношения (B_i) площадей пиков сквалена (S_{squ}) к площадям пиков внутреннего стандарта (S_{inst})					
	капиллярная колонка без деления потока газа-носителя		капиллярная колонка с делением потока газа-носителя		насадочная колонка	
	раствор сравнения	испытуемый раствор	раствор сравнения	испытуемый раствор	раствор сравнения	испытуемый раствор
1	0.957948	1.089263	0.905661	1.009198	0.905661	1.1015
2	0.956032	1.090984	0.910264	1.009036	0.910264	1.10224 2
3	0.957683	1.089662	0.901045	1.014183	0.901045	1.10468 6
4	0.957194	1.090897	0.910479	1.011333	0.910479	1.10259 3
5	0.956488	1.090542	0.908834	1.004793	0.908834	1.10582 2
среднее значение B_i	0.957069	1.09027	0.907257	1.009709	0.907257	1.10336 9
RSD %	0.083885	0.070461	0.437593	0.341419	0.437593	0.16414 7
$\Delta_{FAO} \%$	0.384337		0.863449		0.758873	
$\Delta_{AS} = \sqrt{\Delta_{FAO}^2 + \Delta_{SP}^2}$	0.897 %		1.18		1.12 %	

При проведении расчетов метрологических характеристик методики, отбрасывая каждый раз результаты измерений модельных растворов, начиная с минимальной концентрации и учитывая изменения количества измерений, показано, что изменение границ диапазона концентрации сквалена от 0.5 до 12 % на диапазон от 2 до 12 % приводит к существенному сокращению систематической погрешности с 1.116 до 0.7 для капиллярной колонки, работающей в режиме без деления потока, и с 1.186 до 0.36 для насадочной колонки. Эти значения уже не превышают величины суммарной неопределенности методики, приведенные в табл. 17.

Графики линейной зависимости найденной концентрации сквалена от введенного количества для каждого режима хроматографирования представлены на рис. 56-58.

Метрологические характеристики линейных зависимостей приведены в Табл. 3.

Величина свободного члена «а» линейной зависимости величины найденной концентрации сквалена «Y» от введенного количества «x» должна быть менее своего доверительного интервала (Δ_A). Для данного случая $t(0.95; n=39-2)$

$$|a| \leq \Delta_A = t(95\%, n-2) \cdot s_a = 1,688 \cdot s_a$$

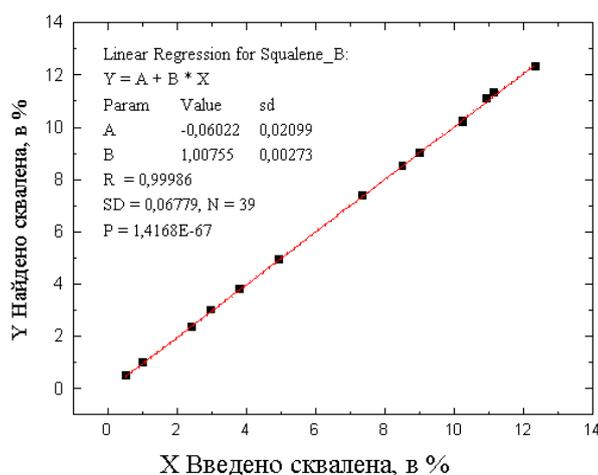


Рис. 56. График линейной зависимости найденной концентрации сквалена от введенного количества при хроматографировании на насадочной колонке

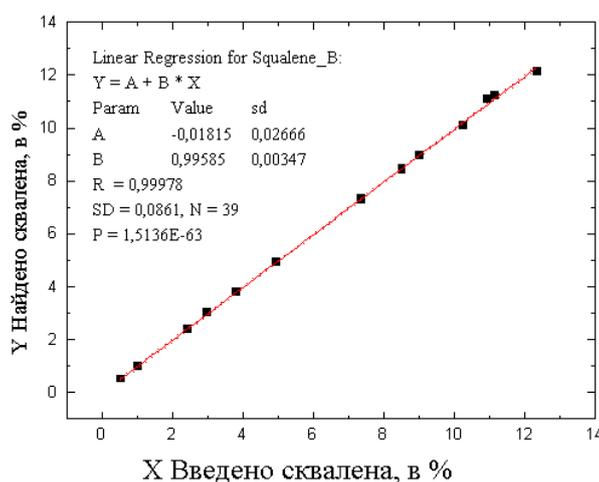


Рис. 57. График линейной зависимости найденной концентрации сквалена от введенного количества при хроматографировании на капиллярной колонке в режиме без деления потока

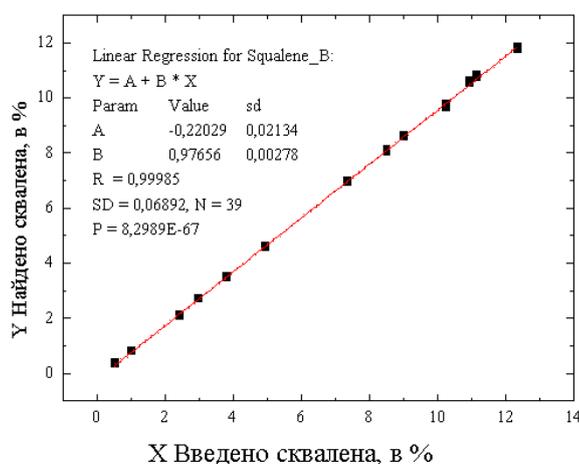


Рис. 58. График линейной зависимости найденной концентрации сквалена от введенного количества при хроматографировании на капиллярной колонке в режиме деления потока

Таблица 18. Метрологические характеристики линейной зависимости для количественного определения сквалена

Параметр	Режимы хроматографирования по типу колонок и деления потока.					
	капиллярная колонка без деления потока газа-носителя		капиллярная колонка с делением потока газа-носителя		насадочная колонка	
	критерии приемлемости		критерии приемлемости		критерии приемлемости	
	ти		ти		ти	
b	0.9958	—	0.9765	—	1.0075	—
	5		6		5	
S_b	0.0034	—	0.0027	—	0.0027	—
	7		8		3	
	-		-		-	
a	0.0181	0.045	0.2202	0.036	0.0602	0.035
	5		9		2	
S_a	0.0266	—	0.0213	—	0.0209	—
	6		4		9	
S_r/b	0.086	0.53	0.07	0.70	0.067	0.66
S_r	0.0861	—	0.0689	—	0.0677	—
			2		9	
r	0.9997		0.9998		0.9998	
	8		5		6	

Как видно из представленных в табл. 18 данных, только для капиллярной колонки, работающей в режиме деления потока, не выполняются требования статистической незначимости к величине свободного члена a .

Требования к коэффициенту корреляции r рассчитывают по формуле:

$$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{RSD_{rest}}{RSD_Y} \right)^2},$$

где: RSD_{rest} – остаточное стандартное отклонение, RSD_Y – стандартное отклонение величин концентраций (C_i) исследуемого диапазона.

Отношение RSD_{rest}/b не должно превышать величины $\Delta_{As}/t(p, n)$, где Δ_{As} – максимально допустимая неопределенность методики. Поскольку допуск содержания в растительном масле сквалена не нормируется, за величину максимально допустимой неопределенности принимаем значения расчетной суммарной неопределенности (Табл. 2). Результаты расчета показывают, что для всех режимов хроматографирования требования к остаточному стандартному отклонению выполняются. Стандартное отклонение величин концентраций исследуемого диапазона RSD_Y рассчитывают по формуле:

$$RSD_Y = \sqrt{\frac{\sum (C_i - C_{cp})^2}{C_{cp}^2 \cdot (g - 1)}} \cdot 100\%,$$

где: g – количество точек измерений.

Для диапазона от 0.5 до 12 % величина RSD_Y равна 61.22, для диапазона от 1.0 до 12 % – 53.2, для диапазона от 2 до 12 % – 45.0, для диапазона от 3 до 12 % – 38.7. Подставляя эти значения в формулу расчета предельного значения коэффициента корреляции и принимая значение величины суммарной неопределенности как методик для случаев с 5 % допуском содержания определяемого вещества ($\Delta_A = 1,6$) получаем

Диапазон измерений, %	критерии приемлемости и коэффициент корреляции	<i>r</i>		
		капиллярная колонка без деления потока газа-носителя	капиллярная колонка с делением потока газа-носителя	насадочная колонка
от 0.5 до 12	0.99988	0.99978	0.99985	0.99986
от 1.0 до 12	0.99984	0.99972	0.99983	0.99983
от 2.0 до 12	0.99977	0.99963	0.99979	0.99978
от 3.0 до 12	0.99970	0.99952	0.99973	0.99972

Сравнивая экспериментально полученные значения коэффициента *r* с рассчитанными критериями, можно сделать вывод, что коэффициент корреляции соответствует предъявляемым требованиям для варианта хроматографирования с использованием насадочной колонки и капиллярной колонки с делением потока в диапазоне концентраций сквалена, начиная с диапазона от 2 до 12 %.

Изучение метрологических характеристик разработанных методик и на основании полученных результатов установлено, что разработанные методики как с использованием насадочной колонки, так и с использованием капиллярной колонки в режиме без деления потока имеют приемлемые метрологические характеристики и позволяют проводить количественное определение сквалена в диапазоне от 2 до 12 % с суммарной неопределенностью менее 1.6 %.

Определение сквалена в растительных маслах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Как и в случае разработки ГХ методики контроля содержания сквалена в маслах Зинченко А.А. и Бобровой М.Е. предложены валидированные методики определения с использованием обычной комплектации хроматографа, так и с дополнительными устройствами – 6-ти портового крана высокого давления.

Методика 1.

Для разработки и изучения метрологических характеристик методики применяли жидкостный хроматограф модели LC-10 в комплекте: насос модели LC-10AT, детектор- RID-10, термостат колонок с ручным инжектором Rheodyne 7725i и компьютеризированный интегратор CR-7a Plus.

В качестве стандартного образца использовали сквален («Sigma-Aldrich» США, серия 120M1645V), с заявленным содержанием основного вещества 100 % (GC). Для приготовления модельных растворов сквалена использовали масло подсолнечное рафинированное торговой марки «Олейна». Навески масел и сквалена взвешивали на весах модели AUW220D с неопределенности взвешивания 0.03 мг.

Приготовление испытуемого раствора растительного масла

Около 200 мг (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 8 мл подвижной фазой, перемешивают до полного растворения масла, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Приготовление раствора сравнения сквалена.

Около 50 мг (точная навеска) стандартного образца сквалена помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 40 мл подвижной фазы, перемешивают до растворения сквалена, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Условия хроматографирования:

По 20 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения сквалена хроматографируют на жидкостном хроматографе с рефрактометрическим детектором в следующих условиях:

- колонка стальная размером 100 мм × 4.0 мм, заполненная сорбентом ReproSil Pur ODS 3, размер частиц 3 мкм;
- подвижная фаза – дихлорметан – ацетонитрил (1:2);
- скорость подвижной фазы – 1 мл/мин;
- температура колонки – 25 °С;
- температура измерительной ячейки детектора – 30 °С;

Содержание сквалена в растительном масле, в процентах, рассчитывают по формуле:

$$\frac{S_{SQ} \times m_o \times 10 \times 100 \times P}{S_{oSQ} \times 50 \times m \times 100} = \frac{S_{SQ} \times m_o \times P}{S_{oSQ} \times 5 \times m}$$

где: S_{sq} – среднее значение площадей пиков сквалена, рассчитанное из хроматограмм испытуемого раствора; S_{oSQ} – среднее значение площадей пиков сквалена, рассчитанное из хроматограмм раствора сравнения сквалена; m_o – масса навески СО сквалена, в миллиграммах; m – масса навески препарата, в мг; P – содержание сквалена в СО, в процентах.

Валидация методики

Исследование основных валидационных характеристик методики проводили на модельных образцах, полученных путем добавок навесок сквалена к навескам масла подсолнечного рафинированного, в котором сквален отсутствовал. Модельные растворы готовили с концентрациями сквалена от 0.5 до 12 % в масле. Этот интервал перекрывает весь возможный диапазон содержания сквалена в растительных маслах. Критерии приемлемости метрологических характеристик методики рассчитывали как для методик, предназначенных для препаратов с 5 % допуском содержания действующих веществ ($B = 5 \%$). Соответственно, суммарная неопределенность методики (Δ_{Ms}) не должна превышать 1.6 %.

Хроматограммы модельных растворов представлены на рис. 59.

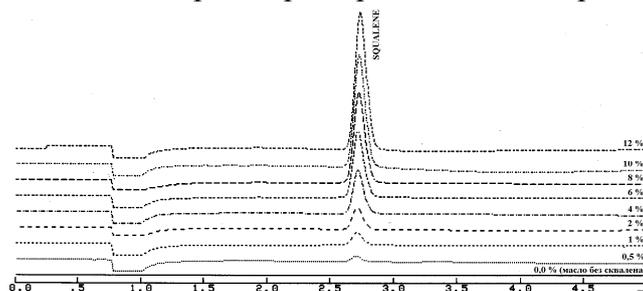


Рис. 59. Фрагменты хроматограмм модельных растворов с концентрациями сквалена от 0.5 до 12 %

Систематическая ошибка результатов определения концентрации сквалена в модельных растворах практически отсутствует. Графики линейной зависимости найденной концентрации сквалена от введенного количества представлены на рис. 60.

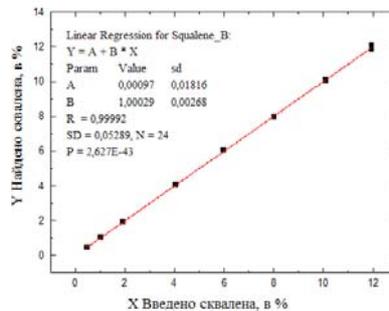


Рис. 60. График линейной зависимости найденной концентрации сквалена от введенного количества при определении методом ВЭЖХ

Величина свободного члена a линейной зависимости найденной концентрации сквалена Y от введенного количества X должна быть менее своего доверительного интервала (Δ_A). Для данного случая $t(0.95; n=24-2)$

$$|a| \leq \Delta_A = t(95\%, n-2) \times s_a = 2.0737 \times 0.01816 = 0.037$$

Требования к коэффициенту корреляции r рассчитывают по формуле:

$$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{RSD_{rest}}{RSD_Y} \right)^2},$$

где: RSD_{rest} – остаточное стандартное отклонение; RSD_Y – стандартное отклонение величин концентраций (C_i) исследуемого диапазона.

Стандартное отклонение величин концентраций исследуемого диапазона (RSD_Y) рассчитывают по формуле:

$$RSD_Y = \sqrt{\frac{\sum (C_i - C_{cp})^2}{C_{cp}^2 \times (g-1)}} \times 100\%,$$

где: g – количество точек измерений; C_i – концентрация сквалена в модельном растворе, в процентах.

Для изучаемого диапазона концентраций сквалена от 0.5 до 12 % в масле и количество точек измерений 24 величина RSD_Y равна 75.6. Подставляя это значения в формулу расчета предельного значения коэффициента корреляции и принимая значение величины суммарной неопределенности как методик для случаев с 5 % допуском содержания определяемого вещества, ($\Delta_A=1.6$) получаем, что значение коэффициента корреляции r должно быть не менее 0.99995, что не соответствует экспериментальным данным. Но если пересчитать значение коэффициента корреляции, отбросив результаты определения самой низкой концентрации 0.5 %, получается, что значение r должно быть не менее 0.99992. Таким образом, в диапазоне от 1 % до 12 % методика по показателю *линейность* полностью соответствует требованиям к значению коэффициента корреляции.

Отношение RSD_{rest}/b не должно превышать величины $\Delta_{As}/t(p, n)$, где Δ_{As} – максимально допустимая неопределенность методики. Для данного случая $RSD_{rest}/b < 1.6/1.711 = 0.935$.

Таблица 19. Метрологические характеристики линейной зависимости для количественного определения сквалена

Параметр	Результат	Критерии приемлемости
<i>b</i>	1.00029	–
<i>S_b</i>	0.00268	–
<i>a</i>	0.00097 _≤	0.037 (выполняется)
<i>S_a</i>	0.01816	–
<i>S_{r/b}</i>	0.450 _≤	0.935 (выполняется)
<i>S_r</i>	0.05289	–
<i>r</i>	0.99992 _≤	0.99992 (выполняется)

Из представленных в табл. 19 данных следует, что по показателю *линейность* методика количественного определения сквалена в растительных маслах соответствует требованиям ГФУ к аналитическим методикам для случая 5 % допуска содержания действующего компонента в диапазоне от 1 до 12 %.

Величина суммарной неопределенности методики (Δ_{AS}) складывается из величин неопределенности всех операций пробоподготовки (Δ_{Sp}) и конечной аналитической операции (Δ_{FAO}).

$$\Delta_{AS} = \sqrt{\Delta_{FAO}^2 + \Delta_{SP}^2} .$$

Величина неопределенности пробоподготовки складывается из неопределенности взятия навески исследуемого масла – 200 мг (0.1 %), стандартного образца сквалена – 50 мг (0.4 %) и неопределенности объемов мерных колб вместимостью 10 мл (0.5 %) и 50 мл (0.17 %).

$$(\Delta_{Sp}) = (0.12+0.42+0.52 \times 0.172)^{1/2} = 0.67 \% .$$

Величину конечной аналитической операции рассчитывали по результатам определения концентрации сквалена в образце масла амаранта, полученного путем экстракции из семян хладоном 134а.

Результаты хроматографирования раствора сравнения сквалена и испытуемого раствора масла амаранта приведены в табл. 20.

Соответственно, суммарное значение неопределенности методики (Δ_{AS}) равно 0.962 %.

Таблица 20. Результаты расчета неопределенности конечной аналитической операции

№ измерения	Величина площади пика сквалена (<i>S_{squ}</i>)	
	Раствор сравнения	испытуемый раствор
1	154044	139831
2	154034	139061
3	154515	139800
4	155061	139786
5	154747	139057
6	154877	139358
7	154063	140519
среднее значение <i>B_i</i>	154477.3	139630.3
<i>RSD</i> .%	0.281	0.371
Δ_{FAO} .%		0.69

Исследование основных метрологических характеристик методики показывает, что методика количественного определения сквалена в растительных маслах методом

ВЭЖХ соответствует требованиям, предъявляемым к методикам количественного определения действующих веществ в лекарственных препаратах в диапазоне концентраций от 1 % до 12 %.

Модификация методики

При наличии в комплекте хроматографа дополнительного устройства – 6-ти портового крана, управляемого по программе хроматографа, и хроматографической колонки, предназначенной для проведения «быстрой» хроматографии, время получения одной хроматограммы можно сократить еще почти в 7 раз. При этом состав и скорость подвижной фазы, объём вводимой пробы, температура колонки и режим работы детектора остаются неизменными. На рис. 61 показана схема подключения колонки, которая обеспечивает удаление из колонки триглицеридов масел промывкой подвижной фазой в реверсивном режиме.

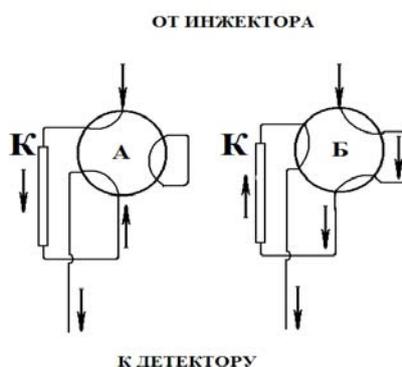


Рис. 61. Схема подключения колонки к 6-ти портовому крану К – колонка

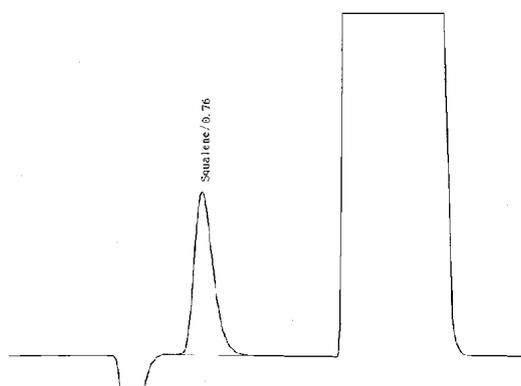


Рис. 62. Хроматограмма испытуемого раствора масла амаранта, полученная в режиме переключение направления подвижной фазы

В момент введения испытуемого образца 6-ти портовый кран находится в положении «А». Анализируемая проба попадает в хроматографическую колонку, где сквален отделяется от суммарной хроматографической зоны триглицеридов. После выхода хроматографической зоны сквалена кран переключается в положение «Б» и обратным потоком подвижной фазы компактная суммарная зона триглицеридов элюируется из колонки. Хроматограмма испытуемого раствора масла амаранта, полученная в условиях с переключением потока подвижной фазы представлена на рис. 62. Переключение крана из положения «А» в положение «Б» проводили после выхода пика сквалена на 60 секунде после ввода пробы.

Для переключения потока подвижной фазы использовали 6-ти портовый кран высокого давления модели FCV-12АН (Shimadzu, Япония). Для разделения хроматографической зоны сквалена от других компонентов масла использовали

хроматографическую колонку размером 33 мм × 4.6 мм, с сорбентом ReproSil ODS-4, размер частиц 1.5 мкм, производство фирмы «Dr. Maisch», Германия.

Таким образом, незначительное дополнение, введенное в хроматографическую систему хроматографа, позволило сократить время получения одной хроматограммы до 2 мин, что может быть полезным при регулярном контроле большого количества образца масел.

Разработка и валидация методики количественного определения сквалена в растительных маслах методом тонкослойной хроматографии.

При разработке методики и проведении валидационных исследований использовали комплект аналитического оборудования производства фирмы Camag, Швейцария, состоящий из аппликатора модели Linomat 5, укомплектованного шприцем вместимостью 100 мкл, хроматографической камеры модели ADC 2, сканера модели TLC Scanner 3 и визуализатора. Управление данным оборудованием осуществляется при помощи программного обеспечения WinCats. Навески масел и сквалена взвешивали на весах модели AUW220D с неопределенностью взвешивания 33 мкг.

Применяли хроматографические пластинки TLC Silica gel 60 производства фирмы Merck, Германия, и «Сорбфил ПТСХ-П-А» производства ЗАО «Сорбполимер», Российская Федерация. В качестве стандартного образца (СО) применяли сквален производства Sigma-Aldrich, США, серии 120M1645V с заявленным содержанием основного вещества 100 % (GC). Для приготовления модельных растворов сквалена использовали масло подсолнечное рафинированное торговой марки «Олейна».

Методика

Приготовление испытуемого раствора. Около 200 мг (точная навеска) исследуемого образца помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворяют в 10 мл циклогексана и доводят объем раствора этим же растворителем до метки.

Приготовление растворов сравнения сквалена. В мерную колбу вместимостью 20 мл помещают 20 мг (точная навеска) стандартного образца сквалена, растворяют в 10 мл циклогексана и доводят объем раствора этим же растворителем до метки.

На линию старта, расположенную на расстоянии 20 мм от края хроматографической пластинки TLC Silica gel 60 производства фирмы Merck размером 20 × 10 см, с помощью автоматического аппликатора в токе азота наносят полосками длиной по 5 мм испытуемый раствор и раствор сравнения сквалена в соответствии с табл. 21.

Затем пластинку помещают в камеру с циклогексаном и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет 7.5 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат в токе воздуха до полного удаления следов растворителя (около 30 мин), помещают в камеру с парами йода и выдерживают в течение 2 ч. Затем пластинку выдерживают в течение 5 мин на воздухе и сканируют каждый трек в следующих условиях:

- размер зоны сканирования – 10 мм × 0.4 мм;
- скорость сканирования – 20 мм/с;
- длина волны регистрации – 540 нм.

По данным сканирования треков раствора сравнения сквалена определяют интегральные значения площадей пиков сквалена, а по полученным данным методом наименьших квадратов рассчитывают коэффициенты линейной зависимости интенсивности пятен (S) от количества сквалена (M_i), нанесенного на пластинку: $S=a+b \times M_i$.

Коэффициенты *a* и *b* рассчитывают по формулам:

$$b = \frac{10 \sum_{i=1}^{i=10} (M_i \times S_i) - \sum_{i=1}^{i=10} M_i \times \sum_{i=1}^{i=10} S_i}{10 \sum_{i=1}^{i=10} M_i^2 - (\sum_{i=1}^{i=10} M_i)^2} \quad \text{и} \quad a = \frac{\sum_{i=1}^{i=10} S_i - b \sum_{i=1}^{i=10} M_i}{10}$$

где: M_i – масса сквалена в растворе сравнения, нанесенном на пластинку, в микрограммах; S_i – площадь пика сквалена, полученная сканированием хроматограммы растворов сравнения сквалена.

Массу сквалена в растворе сравнения, нанесенном на пластинку, в микрограммах, рассчитывают по формуле:

$$M_i = \frac{m_0}{20} \times V_i$$

где: m_0 – масса навески СО сквалена, в миллиграммах; 20 – объём мерной колбы, в миллилитрах; V_i – объём раствора сравнения, наносимого на пластинку, в микролитрах.

По полученным результатам проводят расчет концентрации сквалена (С) в исследуемом образце по формуле:

$$C = \frac{(S - a) \times 20 \times 100}{b \times m},$$

где: S – среднее значение площадей пиков сквалена, полученное сканированием хроматограмм испытуемого раствора; m – масса навески испытуемого образца масла или жира, в миллиграммах.

Типичные хроматограммы испытуемого раствора образца масла с добавками сквалена до концентрации более 10 % и раствора сравнения сквалена с разными количествами нанесенного в пробе сквалена приведены на рис. 63. Хроматограммы, полученные в результате сканирования треков, представлены на рис. 64.

Таблица 21. Порядок и количества наносимых растворов при количественном определении сквалена в растительном масле

№ трека	Объём наносимого раствора (мкл)	Наименование раствора
1	1	Раствор сравнения сквалена 1 мг/мл
2	10	Испытуемый раствор препарата 10 мг/мл
3	2	Раствор сравнения сквалена 1 мг/мл
4	3	Раствор сравнения сквалена 1 мг/мл
5	10	Испытуемый раствор препарата 10 мг/мл
6	4	Раствор сравнения сквалена 1 мг/мл
7	5	Раствор сравнения сквалена 1 мг/мл
8	10	Испытуемый раствор препарата 10 мг/мл
9	6	Раствор сравнения сквалена 1 мг/мл
10	7	Раствор сравнения сквалена 1 мг/мл
11	10	Испытуемый раствор препарата 10 мг/мл
12	8	Раствор сравнения сквалена 1 мг/мл
13	9	Раствор сравнения сквалена 1 мг/мл
14	10	Испытуемый раствор препарата 10 мг/мл
15	10	Раствор сравнения сквалена 1 мг/мл
16	10	Растворитель (циклогексан)

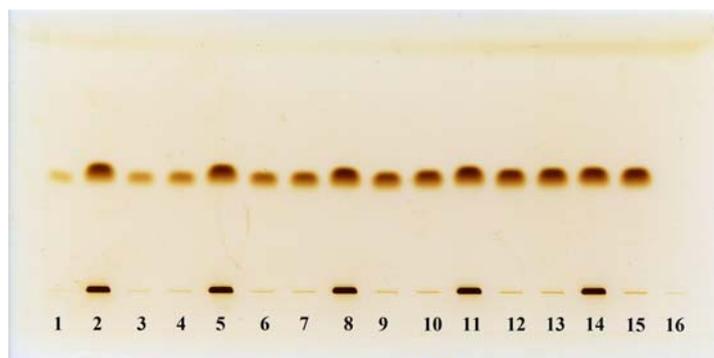


Рис. 63. Изображение пластинки с хроматограммами испытуемого раствора масла с добавкой сквалена (2,5,8,11 и 14), растворов сравнения сквалена (1,3,4,6,7,9,10,12,13,15) и растворителя (16)

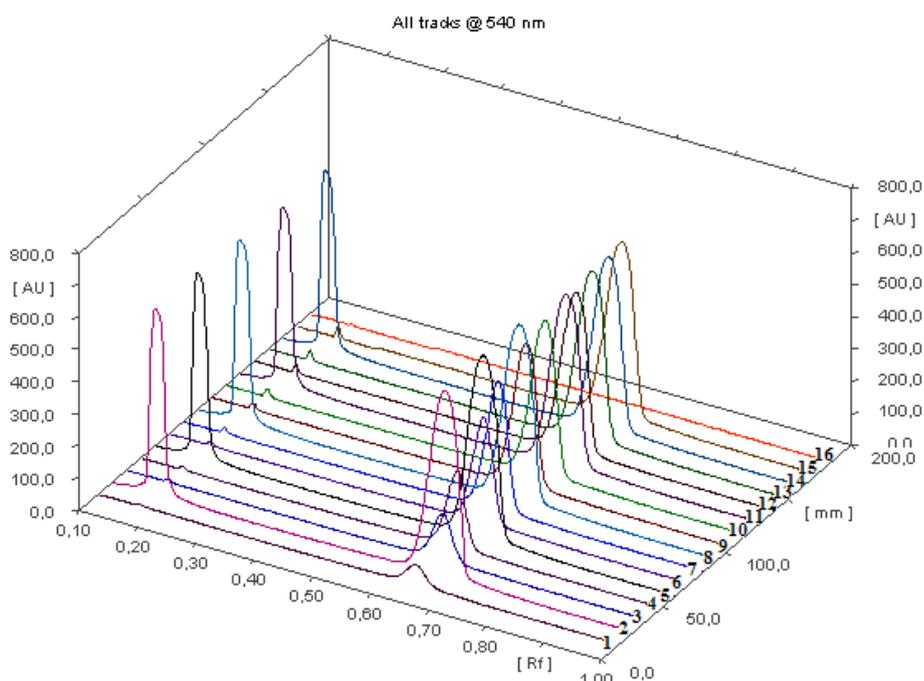


Рис. 64. Хроматограммы, полученные сканированием хроматографической пластинки

Валидация методики

Основные валидационные характеристики разработанной методики были исследованы методом «введено-найдено» в диапазоне концентраций сквалена в масле от 1 до 10 %.

Для проведения всех измерений необходимо получить минимум 11 хроматограмм модельных растворов сквалена и не менее 11 хроматограмм раствора сравнения сквалена. Поскольку на одной хроматографической пластинке размером 20 × 10 см разместить, а затем отсканировать 22 хроматограммы затруднительно, пришлось использовать две одинаковые пластинки, на которые последовательно наносили пробы, а хроматографирование и экспозицию в камере с парами йода проводили параллельно. Сканирование каждой из пластинок проводили ровно через 5 мин после извлечения из камеры.

Изображения пластинок после проявления показаны на рис. 65 и 66, а хроматограммы растворов сравнения сквалена и модельных растворов масла представлены на рис. 67 и 68.

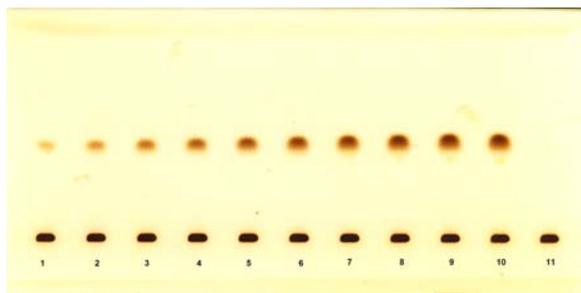


Рис. 65. Хроматограммы модельных растворов с концентрациями сквалена от 1 % до 10 % (1-10) и раствора плацебо (11)

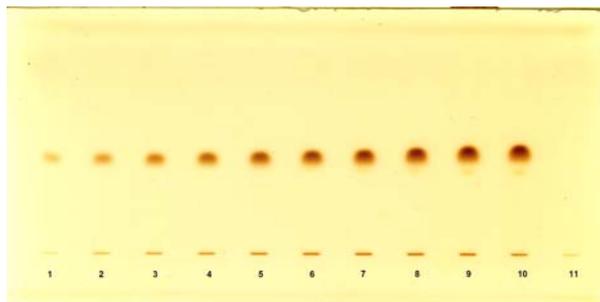


Рис. 66. Хроматограммы растворов сравнения сквалена (1-10) и растворителя (циклогексана) (11)

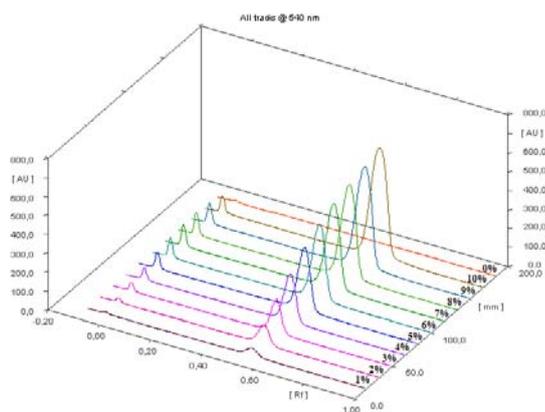


Рис. 67. Хроматограммы растворов сравнения сквалена (1-10 %) и растворителя (0 %)

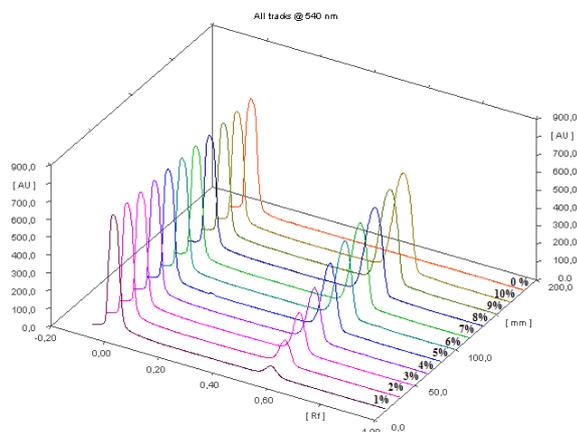


Рис. 68. Хроматограммы модельных растворов

Результаты хроматографирования приведены в табл. 22.

Таблица 22. Результаты сканирования хроматограмм модельных растворов масла и раствора сравнения сквалена

№ трека	Раствор сравнения сквалена		Модельные растворы масла	
	Значения R_f	Интегральная площадь пика	Значения R_f	Интегральная площадь пика
1	0.55	1547.2	0.57	1536.4
2	0.55	3861.1	0.57	3843.2
3	0.55	6268.1	0.58	6589.4
4	0.55	9408.5	0.58	9398.2
5	0.56	10844.6	0.59	12424.6
6	0.57	13663.4	0.59	15187.0
7	0.57	16459.2	0.60	17582.4
8	0.58	18976.6	0.60	19598.7
9	0.59	21782.1	0.60	21900.4
10	0.60	24582.9	0.60	23628.2
11	—	0	—	0

Как видно из представленных в табл. 22 данных, систематическая ошибка результатов определения концентрации сквалена в модельных растворах незначительна, однако величины относительного стандартного отклонения и доверительного интервала уже довольно велики и соответствуют только требованиям к методикам определения примесей [14, 15].

Величина свободного члена a линейной зависимости величины найденной концентрации сквалена Y от введенного количества X должна быть менее своего доверительного интервала (Δ_A), т.е. быть статистически незначимой. Для разработанной методики при $t(0.95; n=10-2)$:

$$|a| \leq \Delta_A = t(95\%, n-2) \times s_a = 2.3060 \times 0.15192 \approx 0.35.$$

Требования к коэффициенту корреляции r рассчитывают по формуле:

$$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{RSD_{rest}}{RSD_Y} \right)^2},$$

где: RSD_{rest} – остаточное стандартное отклонение; RSD_Y – относительное стандартное отклонение величин концентраций (C_i) исследуемого диапазона.

Относительное стандартное отклонение величин концентраций исследуемого диапазона RSD_Y рассчитывают по формуле:

$$RSD_Y = \sqrt{\frac{\sum (C_i - C_{cp})^2}{C_{cp}^2 \cdot (g-1)}} \cdot 100\%,$$

где: g – количество точек измерений; C_i – концентрации сквалена в модельных растворах, в процентах.

Для изучаемого диапазона концентраций сквалена от 1 до 10 % в масле (табл. 23), и количества точек измерений $g = 10$ значение RSD_Y составляет 55.05.

Подставляя это значение в формулу расчета предельного значения коэффициента корреляции (r) для случаев методик с 5, 7.5, 10 и 15 % допуском содержания определяемого вещества, получаем, что значение коэффициента корреляции должно быть не менее 0.99992 для методик с 5 % допуском содержания определяемого

вещества, или 0.9998 – для 7.5 % допуска, или 0.9995 – для 10 % допуска, или 0.9992 – для 15 % допуска.

Экспериментально полученное значение превосходит предельно допустимые рассчитанные значения коэффициента корреляции даже для случая методик с 15 % допуском, но для методик определения примесей с 25 % допуском, полученное экспериментально значение r уже соответствует рассчитанному значению 0.998. Приведенные в табл. 23 данные использовали для расчета показателя «линейность». График и коэффициенты линейной зависимости представлены на рис. 69 и 70.

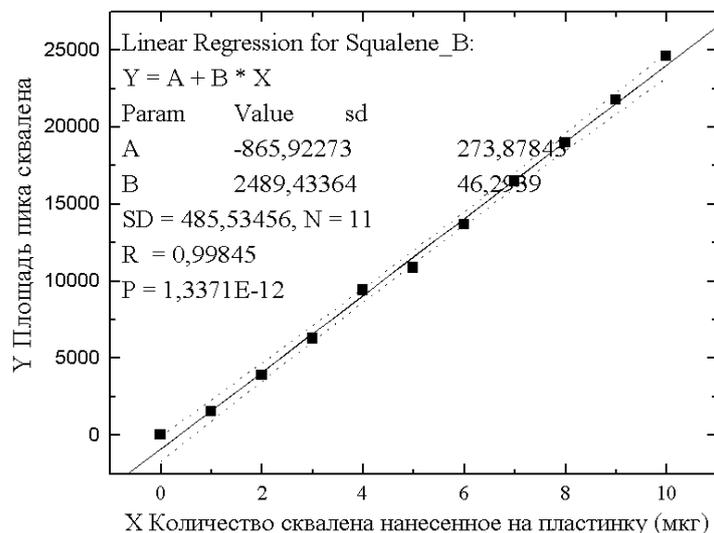


Рис. 69. График и коэффициенты линейной зависимости площадей пиков от количества сквалена, нанесенного на пластинку

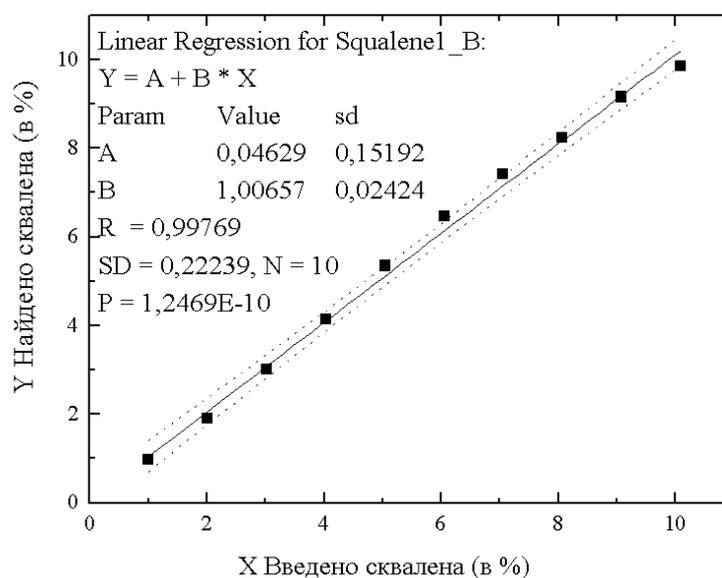


Рис. 70. График и коэффициенты линейной зависимости найденного количества сквалена от введенного

Таблица 23. Результаты анализа модельных смесей и их статистическая обработка для количественного определения сквалена

№ мод. р-ра	Введено сквалена, в %	Найдено сквалена, в %	Найдено, в % по отношению к введенному количеству
1	1.01	0.965	95.54853
2	2.02	1.892	93.64743
3	3.03	2.995	98.83901
4	4.04	4.123	102.0572
5	5.05	5.339	105.7191
6	6.06	6.449	106.4103
7	7.07	7.411	104.8188
8	8.08	8.221	101.7406
9	9.09	9.145	100.6075
10	10.1	9.839	97.41862
Среднее значение, \bar{Z} , %			100.6807
Стандартное отклонение, s_z , %			4.23
Односторонний доверительный интервал $\Delta_z, \% = t(95\%,9) \times s_z = 1.833 \times s_z =$			6.16
Систематическая погрешность $\delta = \bar{Z}-100 $			0.68

Другие метрологические характеристики линейной зависимости методики приведены в Табл. 4.

Таблица 24. Метрологические характеристики линейной зависимости для количественного определения сквалена

Параметры	Результаты	Критерии приемлемости
b	1.00657	—
s_b	0.02424	—
a	0.04629	≤ 0.35 (выполняется)
s_a	0.15192	—
s_r/b	0.221	≤ 0.7 (выполняется)
s_r	0.22239	—

Из представленных в табл. 24 данных следует, что другие критерии показателя «линейность» методики количественного определения сквалена в растительных маслах соответствует требованиям ГФУ к аналитическим методикам для случая 10 % допуска содержания действующего компонента в диапазоне от 1 до 10 %.

Величина суммарной неопределенности методики (Δ_{AS}) складывается из величин неопределенности всех операций пробоподготовки (Δ_{Sp}) и конечной аналитической операции (Δ_{FAO}):

$$\Delta_{AS} = \sqrt{\Delta_{FAO}^2 + \Delta_{SP}^2} .$$

Величина неопределенности пробоподготовки складывается из неопределенности взятия навески исследуемого масла – 200 мг (0.1 %), стандартного образца сквалена – 20 мг (1 %), неопределенности объемов мерных колб вместимостью 20 мл (0.23 %):

$$(\Delta_{Sp}) = (0.1^2 + 1^2 + 2 \times 0.23^2)^{1/2} = 1.03 \% .$$

Неопределенность непосредственно аналитической операции, включая операцию нанесения проб и изменение интенсивности пятен, естественно зависит от интенсивности окраски пятен сквалена на хроматограммах испытуемых растворов.

Поэтому неопределенность конечной аналитической операции оценивали для случаев с концентрацией сквалена в масле менее 1 %, с концентрацией около 5 % и с концентрацией сквалена около 10 % (рис. 63). Хроматограммы испытуемых образцов с концентрацией сквалена в масле менее 1 % представлены на рис. 71 и 72, а с концентрацией около 5 % – на рис. 73 и 74.

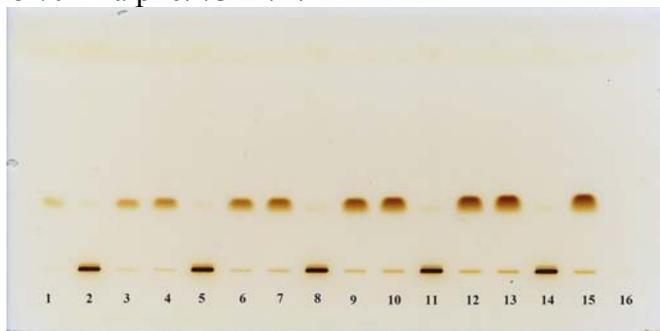


Рис. 71. Изображение пластинки с хроматограммами испытуемого раствора оливкового масла (2, 5, 8, 11 и 14), растворов сравнения сквалена (1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15) и растворителя (16)

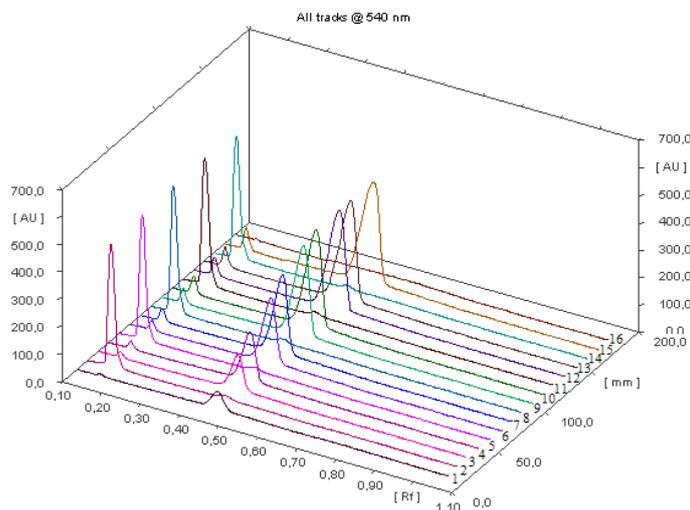


Рис. 72. Хроматограммы испытуемого раствора (2, 5, 8, 11 и 14), растворов сравнения сквалена (1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15) и растворителя (16)

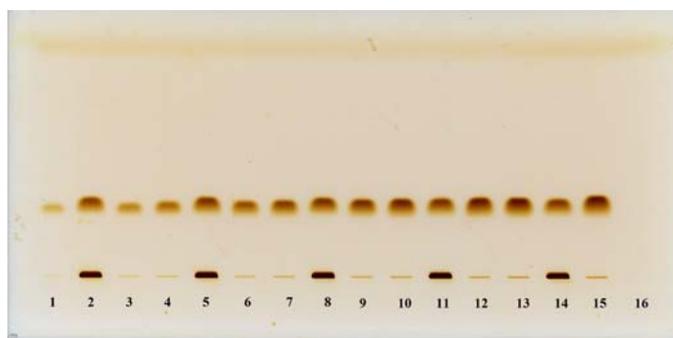


Рис. 73. Изображение пластинки с хроматограммами испытуемого раствора масла амаранта (2, 5, 8, 11 и 14), растворов сравнения сквалена (1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15) и растворителя (16)

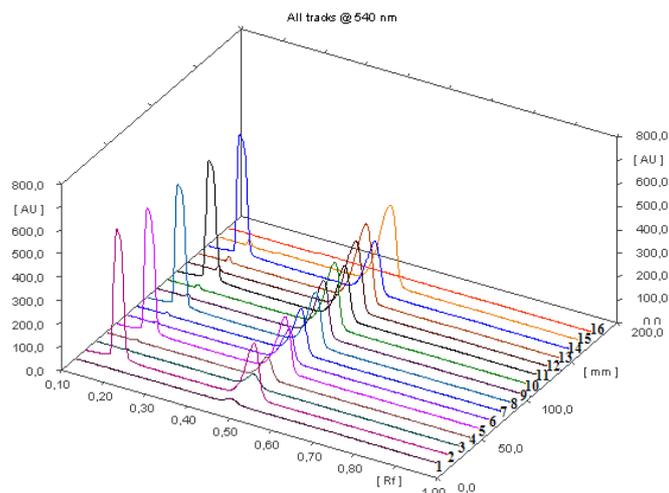


Рис. 74. Хроматограммы испытуемого раствора масла амаранта (2, 5, 8, 11 и 14), растворов сравнения сквалена (1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15) и растворителя (16)

Результаты определения площадей пиков и значения коэффициентов линейной зависимости, рассчитанные для растворов сравнения, приведены в табл. 25.

Таблица 25. Результаты определения площадей пиков и значения коэффициентов линейной зависимости, рассчитанные для растворов сравнения

№ трека на хроматограммах (рис. 63, 71 и 74)	Площади пиков сквалена на хроматограммах испытуемого раствора оливкового масла (образец 1)	Площади пиков сквалена на хроматограммах испытуемого раствора масла амаранта (образец 2)	Площади пиков сквалена на хроматограммах испытуемого раствора масла с добавкой сквалена (образец 3)
2	481.0	6087.3	21641.0
5	594.0	6317.1	21488.9
8	526.3	5918.6	22089.5
11	507.1	6052.9	21343.3
15	531.0	5971.0	20207.8
Среднее значение (\bar{x})	529.88	6069.38	21354.1
Стандартное отклонение (s)	41.87	153.6	699.2
ОСО (%)	7.93	2.53	3.27
Доверительный интервал (Δ_x)	39.9	146.4	666.6
Коэффициенты линейной зависимости a , b и их стандартные отклонения s_a , s_b	$a = -275.62$ $s_a = 212.21$ $b = 1064.69$ $s_b = 39.5$	$a = -135.43$ $s_a = 284.9$ $b = 1125.24$ $s_b = 44.27$	$a = -609.5$ $s_a = 619.6$ $b = 2018.15$ $s_b = 91.8$

По этим значениям рассчитали концентрации и доверительные интервалы содержания сквалена в тестируемых образцах масел:
образец 1 – 0.76 ± 0.45 ; образец 2 – 5.5 ± 0.23 ; образец 3 – 10.3 ± 0.89 .

Полученные значения свидетельствуют, что разработанная методика количественного определения сквалена с маслах и жирах методом ТСХ позволяет проводить количественное определение с минимальной неопределенностью аналитической операции в 4.2 %. Учитывая то, что неопределенность пробоподготовки составляет около 1 %, получаем, что минимальная суммарная определенность методики составляет около 4.4 %. Эти значения соответствуют требованиям ГФУ только к методикам определения примесей, поэтому разработанной методикой вполне можно устанавливать факт фальсификации препарата, но в тех случаях, когда требуются результаты с меньшим значением неопределенности, необходимо использовать другой аналитический метод или при использовании метода ТСХ проводить калибровку в более узком диапазоне концентраций сквалена.

7.2. Хроматографические методы в монографиях ГФУ на ЛРС (ТСХ, ВЭЖХ, ГХ)

Коллективом сотрудников научного направления «Лекарственное растительное сырье» Государственной Фармакопеи Украины под руководством доктора фарм. наук А.Г.Котова на основании обобщения опыта Европейской Фармакопеи, Государственной Фармакопеи СССР, Руководств Европейского Союза 2007 г. [169] и собственных научных исследований качества отечественного лекарственного растительного сырья (ЛРС) разработан научный алгоритм введения требований к оформлению монографий на ЛРС в ГФУ [170-172]. На основании этого алгоритма предложено введение в ГФУ комплекса необходимых общих и частных статей на ЛРС, которые составляют основу стандартизации ЛРС в Украине.

Сотрудниками ГП «УНЭФЦ» при участии специалистов ряда кафедр НФаУ и предприятий-изготовителей ЛРС проведены исследования, позволившие ввести хроматографические методы в 90 монографиях ГФУ на ЛРС (из них -38 –ВЭЖХ, 7-ГХ) по разработанному А.Г.Котовым алгоритму.

Подходы к аттестации растительных экстрактов в качестве ФСО ГФУ для идентификации методом ТСХ [175]

Изучены подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья в ведущих фармакопеях, в частности применение фармакопейных стандартных образцов (ФСО) для идентификации в тестах с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ). Выяснено, что затраты на закупку веществ-свидетелей у европейских фирм, в том числе и у Европейской Фармакопеи (ЕФ), поставят под сомнение реальный фармакопейный контроль качества многих растительных препаратов в Украине.

На примере эхинацеи пурпурной экстракта и эхинацеи бледной экстракта разработаны национальные подходы к аттестации данных экстрактов в качестве ФСО Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) для проведения испытаний «Ідентифікація С і Е» и «Інші види Echinacea та Parthenium integrifolium» методом ТСХ в соответствии с монографией ГФУ «Ехінацеї пурпурової корені».

Проведенные исследования [174, 175] показали, что использование данных ФСО ГФУ позволяет заменить дорогостоящие вещества-свидетели (N-изобутилдодекотетраэнамид, цинарин, эхинакозид), обеспечивая при этом достоверную идентификацию тех же классов соединений в сырье, что и в ЕФ (схемы 1 и 2).

Предложен алгоритм получения и аттестации ФСО ГФУ растительных экстрактов, в рамках которого необходимо изучать такие вопросы: компонентный состав данного ФСО в условиях методик, выбор концентрации растительного экстракта перед использованием в методике, разработка пробоподготовки для обеспечения получения воспроизводимых результатов, однородность, стабильность, фасовка, условия хранения, маркировка ФСО.

Схема 1. Расположение зон на тонкослойной хроматограмме ФСО эхинацеи бледной экстракта в условиях проведения испытания «Інші види Echinacea та Parthenium integrifolium» (Пластинки ТСХ с силикагелем, подвижная фаза – муравьиная кислота Р –циклогексан Р-этилацетат-толуол 0,9:3:6:24)

Верхняя часть пластинки		
кофейная кислота: интенсивная синяя флуоресцирующая зона цимарин: интенсивная зеленоватая флуоресцирующая зона эхинакозид: интенсивная зеленоватая флуоресцирующая зона	слабая сине-зеленая флуоресцирующая зона слабая синяя флуоресцирующая зона интенсивная зеленоватая флуоресцирующая зона (эхинакозид)	интенсивная сине-зеленая флуоресцирующая зона синяя флуоресцирующая зона
Раствор сравнения ЕФ	Раствор ФСО ГФУ эхинацеи бледной экстракта (0,04 г в 5 мл метанола при нанесении 10 мкл)	Испытуемый раствор ЕФ

Схема 2. Расположение зон на тонкослойной хроматограмме ФСО эхинацеи пурпурной экстракта в условиях проведения идентификации Е и С (Пластинки ТСХ с силикагелем, подвижная фаза – муравьиная кислота безводная-вода-метилэтилкетон-этилацетат 3:3:9:15)

Идентификация Е			Идентификация С		
Верхняя часть пластинки			Верхняя часть пластинки		
β - ситостерин: фиолетовая или розовая зона N- изобутилдоде катетраэна- мид: серовато- синяя зона	синева- фиолетовая зона фиолетовая или розовая зона (β - ситостерин) серовато- синяя зона (N- изобутилдоде ка- тетраэнамид)	синева- фиолетовая зона фиолетовая или розовая зона (β - ситостерин) серовато- синяя зона (N- изобутилдоде ка- тетраэнамид)	кофейная кислота: интенсивная синяя флуоресциру ющая зона цимарин: интенсивная зеленоватая флуоресциру ющая зона эхинакозид: интенсивная зеленоватая флуоресциру ющая зона	интенсивная сине-зеленая флуоресциру ющая зона синяя флуорес- цирующая зона	интенсивная сине-зеленая флуоресци- рующая зона синяя флуоресцирую щая зона
Раствор сравнения ЕФ	Раствор ФСО ГФУ эхинацеи пурпурной экс- тракта (0,1г в 5 мл метанола при нанесении 50 мкл)	Испытуемый раствор ЕФ	Раствор сравнения ЕФ	Раствор ФСО ГФУ эхинацеи пурпурной экс- тракта (0,025 г в 5 мл метанола при нанесении 10 мкл)	Испытуемый раствор ЕФ

Разработанные подходы применены в ходе аттестации двенадцати ФСО ГФУ растительных экстрактов, введенных в методики 12 национальных частей и национальных монографий ГФУ.

7.3. Фармакопейные стандартные образцы (ФСО) – подход к аттестации экстрактов в качестве ФСО ГФУ для идентификации методом ТСХ. Программа профессионального тестирования (ППТ)

Развитие хроматографических методов, как и других методов анализа лекарственных средств способствовало созданию в Украине системы фармацевтических стандартных образцов (ФСО) в соответствии с которой фармацевтическим СО является СО, введенный в действие Государственной Фармакопеей Украины (ГФУ) или Европейской Фармакопеей (ЕР), и квалифицируются как СО состава вещества ФСО используется при выполнении анализа по всем показателям качества ЛС. В хроматографических методах анализа для идентификации БАВ, количественного содержания, определении примесей.

Для лекарственного растительного сырья (ЛРС) и фитопрепаратов СО используются для определения компонентов БАВ в ЛРС и готовых лекарственных средств растительного происхождения. Ими могут быть маркеры-вещества, содержащиеся в ЛРС и используемые для идентификации и количественного определения непосредственно БАВ, а также стандартизованные экстракты (в ТСХ и ВЭЖХ для идентификации ЛРС и фитопрепаратов).

Рабочие стандартные образцы (РСО) – стандартные образцы предприятий, аттестованные ГП «Украинский научно-экспертный центр качества лекарственных средств».

Номенклатура ФСО ГФУ в настоящий момент насчитывает свыше 500 наименований.

Все ФСО Государственной Фармакопеи Украины (ГФУ) сопровождаются сертификатом, в котором указывается неопределенность аттестованного значения (если СО предназначен для количественного определения) [169]. При аттестации фармацевтических СО в Украине принято использовать принцип незначимости. Это означает, что неопределенность аттестованного значения как ФСО, так и РСО должна составлять не более 0,32 от максимально допустимой неопределенности результатов анализа [170]. Использование данного принципа позволяет не учитывать в балансе неопределенностей результата анализа неопределенности, связанные со СО (как с ФСО, так и с РСО). Это существенно упрощает процедуру оценки неопределенности для лабораторий, а также обеспечивает взаимозаменяемость ФСО ГФУ с ФСО других фармакопей [170].

Тестовые образцы (ТО) – для проведения программы профессионального тестирования лабораторий, 10 раундов которого проведено ГП «Украинский научно-экспертный центр качества лекарственных средств», в т.ч. и 3 раунда по тестовым образцам для ВЭЖХ и ТСХ. ТО могут быть использованы лабораториями контроля качества для проведения внутрилабораторных процедур тестирования персонала и внутрилабораторной оценки качества.

С целью оценки уровня компетентности как отдельных лабораторий контроля качества лекарственных средств, так и всей системы лабораторий в целом в Украине создана Программа Профессионального Тестирования (ППТ): аттестация тестовых образцов (ТО), критерии оценивания, анализ результатов [172]. Из 10 раундов Программы 6, 7 раунды включают тестирование применения метода ТСХ для определения примесей в тестовых образцах, а в 9 раунд ППТ впервые включено тестирование по показателям «Идентификация» с применением метода ТСХ [173-175].

Целью ППТ является выявление недостатков в деятельности контрольных лабораторий. При проведении 6 и 7 раундов по определению визуальной и числовой оценки содержания примесей в ТО методом ТСХ выявлено, что результаты большинства лабораторий-участниц ставят под сомнение их возможность проведение анализа и разработки методики с применением этого метода. Проведение ППТ дало возможность установить проблемы в проведении исследований методом ТСХ и запланировать для каждой из лабораторий проведение коррекционных действий для обеспечения качества работ, выполняемых лабораториями с выполнением требований Надлежащей производственной практики (GMP).

На основании анализа полученных результатов 9 раунда предложены изменения показателе «Идентификация» в монографии «Ципрофлоксацина таблетки» для включение во 2-е издание ГФУ.

Отметим положительную тенденцию проблемы с выполнением анализа ТСХ в целом по фармацевтической отрасли и необходимость включения тестирования по данному методу в последующие раунды ППТ, как и по другим методам.

Оценивая проведение ППТ следует подчеркнуть ее роль в повышении квалификации сотрудников лабораторий контроля качества, что способствует как внедрению лекарственных средств, так и выявлению некачественной продукции и фальсификатов. Отметим, что если в первых раундах ППТ участвовали только лаборатории территориальных государственных инспекций и уполномоченных лабораторий и лаборатории контроля качества отдельных фармацевтических предприятий, то в дальнейших раундах ППТ приняли участие лаборатории контроля качества лекарственных средств из стран ближнего зарубежья, что оказывает влияние на экспорт-импорт лекарственных препаратов.

В 9 раунд ППТ впервые включено тестирование по показателям «Идентификация» с применением метода ТСХ. Проведена аттестация ТО с учетом разработанных подходов, определены критерии оценивания результатов участников тестирования.

Литература

1. Яшин Я.И. 90-летняя история хроматографии (1903-1993) // Жур. Аналит. Хим. – 1994. – Т. 49, № 10. – С. 1047-1058.
2. Яшин Я.И., Яшин А.Я. Основные достижения хроматографии в XX столетии // Приборы. – 2003. – № 8(38). – С. 6-27.
3. Цвет М.С. О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биологическому анализу // Труды Варшавского общества естествоиспытателей. Отд. биологии. – 1903. – Т. 14. – С. 1.
4. Цвет М.С. Хлорофиллы в растительном и животном мире. – Типография Варшавского учебного округа, Варшава. – 1910. – С. 1-20.
5. Цвет М.С. Хроматографический адсорбционный анализ. Под ред. Рихтера А.А. и Красносельской Т.А. – Изд. АН СССР, 1946, Сер. «Классические науки». – 274 с.
6. Яшин Я.И. В сб. Хроматография в биологии и медицине. Под ред. Тогузова Р.Т. и Савиной Л.Н. – М. Изд. 2-го МОЛГМИ, 1985. – С. 9-14.
7. Измайлов Н.А., Шрайбер М.С. Капельно-хроматографический метод анализа и его применение в фармации // Фармация. – 1938. – № 3. – С. 1-7.
8. Березкин В.Г. Н.А. Измайлов и М.С. Шрайбер: открытие тонкослойной хроматографии. – М. : Геос, 2007. – 128 с.
9. E. Stahl (Ed) Dunnschichtchromatographie. – Berlin: Springer Verlag, 1962. – 506 с.
10. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. – М. : Мир, 1965. – 508 с.

11. Ivo M. Hais, K. Macek. Papirova chromatografie. – Ceskoslovenskt Akademic ved, Praha, 1959. – 807 с.
12. Хайс И.М., Мацек К. Хроматография на бумаге. – М.: Изд. Иностранной литературы, 1962. – 874 с.
13. Armstrong W. D. Thin layer Chromatographic Separation of Pesticides, Decachlorodiphenyl, and Nucleosides with Micellar solutions / Daniel W. Armstrong, Robert Q. Terrill // *Anal. Chem.* — 1979. — Vol. 51. — №. 13. — P. 2160-2163.
14. Armstrong D.W., Henry S.J. Use of an aqueous micellar mobile phase for separation of phenols and polynuclear aromatic hydrocarbons // *J. Liq. Chromatogr.* – 1980. – Vol. 3. – P. 657–662.
15. Armstrong D.W. Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phase in liquid chromatography // *Anal. Chem.* — 1981. – Vol. 53. – P. 1662.
16. Armstrong W. D. Evaluation of Partition Coefficients to Micelles and Cyclodextrins via Planar Chromatography // *J. Am. Chem. Soc.* – 1983. – Vol. 105. – P. 2962-2964.
17. Anastas P.T., Warner J.C. *Green Chemistry: Theory and Practice* // Oxford University Press, New York, 1998. – P. 30.
18. Шостенко Ю.В. Адсорбционная технология в производстве лекарственных средств растительного происхождения // Сб. научных трудов. Технология и стандартизация лекарств. Под ред. Георгиевского В.П., Конева Ф.А. – Харьков, ООО «РИРЕГ», 1996. — Т. 1. — С. 186-219.
19. Макаревич И.Ф. Растительные биологически активные вещества, способы их выделения и фармакотерапевтические свойства // Сб. Научных трудов. Технология и стандартизация лекарств под ред. Георгиевского В.П., Конева Ф.А. – Харьков, ООО «РИРЕГ». — 1996. — Т. 1. — С. 5-27.
20. Георгиевский В.П. От химической субстанции через оптимальную лекарственную форму к эффективному и безопасному лекарственному препарату // Сб. Научных трудов. Технология и стандартизация лекарств под ред. Георгиевского В.П., Конева Ф.А. – Харьков, ООО «РИРЕГ». — 2000. — Т. 2. — С. 4-45.
21. Шостенко Ю.В., Мушинская С.М., Шейн А.Т. и др. Ионообменные материалы в производстве лекарственных веществ из растительного сырья / Обзорная информация. Сер. хим-фармац. Промышленность. – М. : ЦБНТИ Медпром, 1979. — Вып. 9. — С. 9-39.
22. Тюкавкина Н.А., Литвиненко В.И., Шостаковский М.Ф. Хроматография на полиамидных сорбентах в органической химии. — Новосибирск: Изд. «Наука», Сибирское отделение, 1973. — 173 с.
23. Литвиненко В.И., Георгиевский В.П., Аммосов А.С., Попова Т.В., Фурса Н.С. Солодка. Систематика, химия, технология, стандартизация, фармакология, клиника. – Ярославль: Аверс Плюс, 2014. – 466 с.
24. Георгиевский В.П. Создание и контроль качества фитопрепаратов) // Сб. трудов международной научно-практической конференции «Терпеноиды: достижения и перспективы применения в области химии, технологии производства и медицины» (9-11 апреля, 2008, Караганда, Респ. Казахстан). – С. 16-34.
25. Thomas Pfeifer –Liquid partition-chromatography with the apparatus FCPC (Fast Centrifugal Partition Chromatograph) // Сб. трудов международной научно-практической конференции «Терпеноиды: достижения и перспективы применения в области химии, технологии производства и медицины» (9-11 апреля, 2008, Караганда, Респ. Казахстан). – С.79-83
26. Каганов А.А. Направление в развитии жидкостной хроматографии. – Приборы, 2003, №8(38), с.23-27

27. Клящинский Б.А., Мажова И.Б., Старкова и др. Новый хроматографический метод препаративного выделения фосфотиозидов и других анионных фосфолипидов // Антибиотики и химиотерапия. — 1985. — Т. 33, № 6. — С. 429-431.
28. Георгиевский В.П., Казаринов Н.А., Каррыев М.О. Физико-химические методы анализа биологически активных веществ растительного происхождения. — Ашхабад: Ылым, 1976. — 239 с.
29. Георгиевский В.П. Рыбаченко А.И., Казаков А.Л. Физико-химические и аналитические характеристики флавоноидных соединений. — Ростов-на-Дону : Изд-во РГУ, 1988. —143 с.
30. Георгиевский В.П. Исследование физико-химических свойств флавоноидов, кумаринов и антрахинонов с целью разработки методов анализа некоторых фитохимических препаратов. Дисс. доктора фармац. наук. 15.00.02. — Харьков, 1980. — 406 с.
31. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. — Новосибирск: Наука (Сиб. Отд.), 1990. — 332 с.
32. Технология и стандартизация лекарств. Под ред. Георгиевского В.П., Конева Ф.А. — Сб. Научных трудов. — Харьков, ООО «РИРЕГ». — 1996. — Т. 1. — 784 с.
33. Технология и стандартизация лекарств. Под ред. Георгиевского В.П., Конева Ф.А. — Сб. Научных трудов. — Харьков, ООО «РИРЕГ», 2000. — Т 2. — 781 с.
34. Гризодуб А.И., Георгиевский В.П. Устойчивость значений R_f и R_m к колебаниям в составе бинарных подвижных фаз // Журн. физ. химии. —1984. — Т. 58, № 6. — С. 1511-1514.
35. Гризодуб А.И., Георгиевский В.П. Оценка разделения в тонкослойной хроматографии при использовании двухкомпонентных систем растворителей // Ж. аналит. химии. — 1980. — Т.35, № 3. —С.593-595
36. Гризодуб А.И., Георгиевский В.П. Оценка хроматографического разделения в системе растворителей бензол-метанол // Ж. аналит. химии. —1980. — Т. 35, № 3. — С.535-538
37. Гризодуб А.И., Георгиевский В.П. Линейные зависимости в тонкослойной хроматографии с двухкомпонентными системами растворителей // Ж. аналит. химии. -1981. — Т.36, № 5. —С.860-866
38. Soczewinski E., Golkiewich W. Application of the law of mass action to thin-layer chromatography systems of the type electrone donor solvent-silics gel // Chromatographia. — 1971. — Vol. 4, N 11. — С. 501-507.
39. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Метолология. Применение в лекарственной химии. — Рига : Зинатне, 1988. — 390 с.
40. Гризодуб А.И., Георгиевский В.П., Левин М.Г. // Журн. физ. химии. -1984. — Т.58, № 10. —С.2479-2484
41. Levin M., Grizodub A., Asmolova N., Grigorieva V., Georgievsky V. Model of mixed Adsorption centre for description of retention in liquid chromatography with multi-component mobile phases // Chromatographia. November 1993. — Vol. 37, N 9/10, — P. 517-521.
42. Левин М.Г., Гризодуб А.И., Асмолова Н.Н., Григорьева В.Д., Георгиевский В.П. Модель адсорбционного центра для описания удерживания в жидкостной хроматографии с многокомпонентными подвижными фазами. // Журн. физ. химии. —1993. — Т. 67, № 10. — С. 2062-2065

43. Levin M., Grizodub A., Leontiev D., Georgievsky V. Retention in liquid chromatography with multicomponent mobile phases[^] relationship with binary systems // *Chromatographia*. March 1993, Vol. 40, N 5/6. – P. 321-324.
44. Георгиевский В.П., Гризодуб А.И., Шейн А.Т. Вклад Н.А. Измайлова в контроль качества и создание лекарственных средств // В сб. Научное наследие Н.А.Измайлова и актуальные проблемы физической химии. – Изд-во ХГУ им. Каразина, 2007. — С. 201-226.
45. Сур С.В., Чикалова С.О., Зволинская Н.Н., Гризодуб А.И. Оценка воспроизводимости величин R_f в различных лабораториях // *Фармаком*. 2006. – №1-2. – С. 58-67
46. Гризодуб А.И. О проекте Общей фармакопейной статьи «Летучие органические примеси» // *Фармаком*. – 1996. – №3. – С. 3-11.
47. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». - 1-е вид.- Харків : РІРЕГ, 2001. – Доповнення 1. 5.4. Залишкові кількості органічних розчинників.
48. Гризодуб А. И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // в кн. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств / под ред. чл.-корр. НАН Украины В. П. Георгиевского. – Х. : НТМТ, 2012. – Т. 3. – С. 994–1063.
49. Зинченко А.А., Георгиевский В.П. Газовая хроматография // в кн. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств / под ред. чл.-корр. НАН Украины В. П. Георгиевского. – Х. : НТМТ, 2012. – Т. 2. – С.799-860.
50. Loginova L.P., Samokhina L.V., Boichenko A.P., Kulikov A.U. Micellar liquid chromatography retention model based on mass-action concept of micelle formation. *J. Chromatogr. A*. – 2006. – Vol. 1104. – P. 190–197
51. Loginova L.P., Samokhina L.V., Kulikov A.Yu. Micelle formation characteristics as parameters of retention model in micellar liquid chromatography // *Kharkov University Bulletin*. – 2002. – Chemical Series. Issue 9 (32). – № 573. – 2002. – P. 107–114
52. Boichenko A.P., Loginova L.P., Iwashchenko A.L., Kulikov A.U. New approach to modeling in micellar liquid chromatography // *Res. J. Chem. Environ*. – 2006. – Vol. 10. – P. 53–62
53. Loginova L.P., Boichenko A.P., Kulikov A.Yu Modification of the Murakami Retention Model in Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography for Micellar Liquid Chromatographic Separations // *Rus. J. Phys. Chem*. – 2008. – Vol. 82, № 9. – P. 1470–1474
54. Berthod A., Garcia-Alvarez-Coque M.C. *Micellar Liquid Chromatography*. – New York: Marcel Dekker, 2000. – 632 p
55. Kulikov A.U., Galat M.N., Boichenko A.P. Optimization of Micellar Liquid Chromatography Conditions for the Flavonoid Separation // *Chromatographia*. – 2009. – Vol. 70. – P. 371–379
56. Boichenko A.P., Iwashchenko A.L., Loginova L.P., Kulikov A.U. Heteroscedasticity of retention factor and adequate modeling in micellar liquid chromatography // *Anal. Chim. Acta*. – 2006. – Vol. 576. – P. 229–238
57. Куліков А.Ю. Одночасне кількісне визначення гідрофобних та гідрофільних сполук методом міцелярної рідинної хроматографії : автореф. дис. на соискание вченого ступеня доктора хім. наук : спец. 02.00.02 «Аналітична хімія». – Київ, 2014. – 36 с

58. Куликов Артем. Мицеллярная жидкостная хроматография. Особенности мицелло-модифицированных обращено-фазовых сорбентов. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2014. – 232 с.
59. P. Petersson, M.R. Euerby An evaluation of the robustness of the Tanaka characterization protocol for reversed-phase liquid chromatography columns // *J. Sep. Sci.* – 2005. – Vol. 28. – P. 2120–2129
60. Kulikov Artem U., Galat Marina N. Comparison of C18 silica bonded phases selectivity in micellar liquid chromatography // *J. Sep. Sci.* – 2009. – Vol. 32. – P. 1340–1350
61. Alexander P. Boichenko, Artem U. Kulikov, Lidia P. Loginova, Anna L. Iwashchenko Aliphatic carboxylic acids as new modifiers for separation of 2,4-dinitrophenyl amino acids by micellar liquid chromatography // *J. Chromatogr. A* – 2007. – Vol. 1157. – P. 252-259
62. Бойченко О.П. Моделювання утримування та оптимізація розділення в мицеллярній рідинній хроматографії: дис. ... канд. хім. наук : 02.00.02 / Бойченко Олександр Павлович. – Харків, 2008. – 150 с
63. Бобошко Л.Г., Зубрицкий М.Ю., Коваленко В.В., Попов А.Ф., Рыбаков В.Б., Савелова В.А., Михайлов В.А. Взаимодействие арил- и пиридин-2-ил-замещенных ацилтиомочевин с гидроксиламином // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії.* – 2012. – Т. 10, вип. 4 (40). – С. 39-48.
64. Гусаров В.І., Коваленко С.М., Заремба О.В. Синтез та фізико-хімічні властивості амідів холевой кислоти // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії.* – 2012. – Т. 10, вип. 4 (40). – С. 54-59
65. Цизорик Н.М., Васькевич А.І., Вовк М.В. Селективне відновлення та окиснення 1-арил-5-арилсульфаніл-6-фенілпіперидин-2-онів // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії.* – 2014. – Т. 12, вип. 3 (47). – С. 74-80.
66. Баглай Я.В., Мараваль В., Войтенко З.В., Воловенко Ю.М., Шовен Р. Синтез 1-(триетилсиліл)-3-[4-(гетарил)феніл]-5-(триметилсиліл)пента-1,4-діін-3-олів // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії.* – 2013. – Т. 11, вип. 3 (43). – С. 68-71
67. Бондар А.І., Коваленко С.М., Заремба О.В., Василець Г.Ю. Синтез алкіл-цис-(3S, 16 S)-ебурнаменін-14-карбоксилатів та цис-(3S, 16 S)-ебурнаменін-14-карбоксамідів // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії.* – 2013. – Т. 11, вип. 1 (41). – С. 55-60
68. Борисов О.В., Завада О.О., Журавель І.О., Коваленко С.М. Структурна модифікація амінокислот: синтез 2-(α , β , ω - аміноалкіл)імідазолів // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії.* – 2013. – Т. 11, вип. 1 (41). – С. 66-68.
69. Isaev S.G., Sviechnikova O.M., Devyatkina A.O., Kostina T.A., Svyatska T.N. Reactivity of phenylanthranilic acids derivatives. XXIII. Synthesis and acid-base properties of 4,5-dimethoxy-N-(2'-carboxyphenyl)anthranilic acids // *Journ. of organic and pharmaceutical chemistry.* – 2013. – Vol. 11, iss. 3 (43). – P. 28-35.
70. Ukrainets I.V., Gorokhova J.V., Andreeva X.V., Golik N.Yu. «Green» synthesis of ethyl 4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylates // *Journ. of organic and pharmaceutical chemistry.* – 2013. – Vol. 11, iss. 3 (43). – P. 32-35.
71. Колос Н.М., Замігайло Л.Л., Чечина Н.В. Однореакторний синтез заміщених імідазолідин-2-онів за участю тіобарбітурової кислоти, арилглюксалів та сечовин // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії.* – 2013. – Т. 11, вип. 3 (43). – С. 72-77.
72. Kalchenko O.I., Cherenok S.O., Rodik R.V., Mely Y., Klymchenko A.S., Gorbachuk V.V., Kalchenko V.I. Complexation of calix[4]arene hydroxymethyl-phosphonic acid

- with tryptophan and n-acetyl-tryptophan amide // *Journ. of organic and pharmaceutical chemistry*. – 2014. – Vol. 12, iss. 2 (46). – P. 21-26.
73. Капустянський І.Ю., Коваленко С.М., Євсєєва Л.В., Заремба О.В. Цілеспрямований синтез 4-О-арил- і 4-*N*-алкіл/арилхіназолінів для дослідження *JNK*-кіназної активності // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії*. – 2014. – Т. 12, вип. 2 (46). – С. 70-75.
74. Kalchenko O.I., Cherenok S.O., Savonik L.I., Solovyov A.V., Gorbachuk V.V., Kalchenko V.I. Investigation of sorption of calix [4]arene and calix [4]resorcinarene tetraalkyl derivatives with the LiChrosorb RP 18 surface by RP HPLC and molecular modelling methods // *Journ. of organic and pharmaceutical chemistry*. – 2014. – Vol. 12, iss. 3 (47). – P. 17-22.
75. Світлична Н.В., Шишкіна О.О., Бородіна В.В., Яременко Ф.Г., Ліпсон В.В., Мусатов В.І., Бондаренко В.М. Хімічні властивості 3-(5-аміно-1*H*-1,2,4-триазол-1-іл) та 3-(2-аміно-1*H*-бензо[*d*]імідазол-1-іл) 3-фенілпропангідразидів // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії*. – 2014. – Т. 12, вип. 3 (47). – С. 74-78.
76. Voskoboynik O.Yu., Karpenko O.V., Sergeieva T.Yu., Kovalenko S.I., Okovyty S.I. [5+1]-heterocyclisation in the synthesis of as- triazolino[2,3-*c*]quinazoline system // *Journ. of organic and pharmaceutical chemistry*. – 2013. – Vol. 11, iss. 1 (41). – P. 37-43.
77. Щербак М.О., Каплаушенко А.Г., Малецький М.М. Синтез ряду 3-алкілпохідних 3-тіо-5-(2-,3-,4—нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-тріазолів та їх подальше окиснення // *Фармаком*. – 2013. – №4. – С.70-74.
78. Щербак М.О., Каплаушенко А.Г. Синтез, фізико-хімічні властивості та подальше перетворення 5-(3-,4-нітрофеніл)-4-аміно-1,2,4-тріазол-3-тіонів та їх іліденамінопохідних // *Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики*. – Запоріжжя, 2013 (12). – № 2. – С. 129.
79. Сафонов А.А., Панасенко О.І., Книш Є.Г., Ачкасова О.М. Синтез, фізико-хімічні та біологічні властивості *S*-похідних 5-гетерил-4-(*R*-іламіно)-1,2,4-тріазол-3-тіолів // *Український біофармацевтичний журн.* – 2011. – № 4(15). – С. 56-60.
80. Братенко М.К., Панасенко Н.В., Вовк М.В. Синтез нітрилів піразол-4-карбонових кислот термічною дегідратацією оксимів піразол-4-карбальдегідів // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії*. – 2013. – Т. 11, вип. 3 (43). – С. 22-25.
81. Яковенко І.Н., Лукашук О.І., Кондратюк К.М., Головченко О.В., Жирнов В.В., Броварець В.С. Синтез і дослідження вазоактивних властивостей нових фосфорильованих пептидоміметиків // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії*. – 2013. – Т. 11, вип. 3 (43). – С. 43-50.
82. Saidov N.B., Georgiyants V.A., Garna N.V. The search for new biologically active substances among derivatives of 3-mercapto-4-amino-5-cyclohexyl-1,2,4-triazole(4*H*) // *Journ. of organic and pharmaceutical chemistry*. – 2013. – Vol. 11, iss. 4 (44). – P. 33-37.
83. Черноус В.О., Паламар А.О., Грозав А.М., Яремій І.М., Вовк М.В. Синтез і біологічна дія тіосемікарбазонів та (1, 3-тіазол-2-іл)-гідразонів [(1-арил-5-формілімідазол-4-іл)тіо]оцтових кислот // *Журн. органічної та фармацевтичної хімії*. – 2013. – Т. 11, вип. 4 (44). – С. 55-60.
84. Nosulenko I.S., Voskoboynik O. Yu., Berest G.G., Safronyuk S.L., Kovalenko S.I., Katsev A.V., Sinyak R.S., Palchikov V.O. Synthesis and antiviral activity of [(9-*R*¹-10-*R*²-3-*R*-2-oxo-2*H*- [1,2,4]-triazino [2,3-*c*]quinazolin-6-yl)thio]acetamides derivatives with the fragments of carcass amines // *Journ. of organic and pharmaceutical chemistry*. – 2014. – Vol. 12, iss. 1 (45). – P. 17-22.

85. Гуренко А.О., Хутова Б.М., Ключко С.В., Василенко А.Н., Броварец В.С. Взаимодействие 1-фенил-5-хлор-1Н-пиразол-4-карбоксамиды и 1-фенил-N-формил-5-хлор-1Н-пиразол-4-карбоксамиды с гидразингидратом // Журн. органічної та фармацевтичної хімії. – 2014. – Т. 12, вип. 1 (45). – С. 56-60.
86. Кемський С.В., Больбут А.В., Вовк М.В. Синтез 7-карбоксіалкілтіо-5,6,7,8-тетрагідро-1Н-піразоло [3,4-е] [1,4]діазепін-4-онів // Журн. органічної та фармацевтичної хімії. – 2014. – Т. 12, вип. 2 (46). – С. 27-31.
87. Саберов В.Ш., Марічев К.О., Короткіх М.І., Швайка О.П., Родік Р.В., Драпайло А.Б., Пехтерева Т.М., Комаровська-Порохнявець О.З., Лубенець В.І., Новіков В.П. Синтез і антимікробна активність прекарбенових та металокарбенових сполук ряду імідазолу // Журн. органічної та фармацевтичної хімії. – 2014. – Т. 12, вип. 2 (46). – С. 36-43.
88. Глиняна Н.В., Саберов В.Ш., Кнішевицький А.В., Короткіх М.І., Швайка О.П., Папаяніна О.С., Комаровська-Порохнявець О.З., Лубенець В.І., Новіков В.П. Синтез і антимікробна активність металокарбенових сполук ряду триазолів // Журн. органічної та фармацевтичної хімії. – 2014. – Т. 12, вип. 2 (46). – С. 44-51.
89. Черноус В.О., Мельник О.Я., Грозав А.М., Яковичук Н.Д., Вовк М.В. Синтез та антимікробна активність 4-хлоро-5-(2-нітровініл)-1-Н-імідазолів і продуктів їх взаємодії з 3-метил-2-піразолін-5-оном // Журн. органічної та фармацевтичної хімії. – 2014. – Т. 12, вип. 3 (47). – С. 28-32.
90. Бігдан О.А., Каплаушенко А.Г., Панасенко О.І., Книш Є.Г. Отримання ряду потенційних фармакологічно активних сполук на основі 5-(2-, 3-, 4-фторфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіонів // Український біофармацевтичний журн. – 2012. – № 4(21). – С. 56-61.
91. Ісаєв С.Г., Єрьоміна Г.О., Костіна Т.А., Шевельова Н.Ю. Методи синтезу, будова та біологічна активність 5-нітро-9-N-ариламіноакридинів // Журн. органічної та фармацевтичної хімії. – 2014. – Т. 12, вип. 3 (47). – С. 54-58.
92. Kalchenko O.I., Cherenok S.O., Rozhenko O.V., Yushchenko O.A., Kalchenko V.I. The molecular structure and chromatographic parameters of calix[4]arenehydroxymethylphosphonic acids // Journ. of organic and pharmaceutical chemistry. – 2012. – Vol. 10, iss. 4 (40). – P. 59-64.
93. Струменская Е.П., Бойко Н.Н., Ветров П.П., Аммосов А.С. Жирнокислотный состав липофильных комплексов различных органов Эхинацеи пурпурной. Фармаком, Харьков, №4, 2013, с. 22-23.
94. Фуклева Л.А., Смойловська Г.П., Мазулін О.В., Мазулін Г.В. Дослідження сладу полі фенольних сполук трави та ліофільного екстракту *Thymus tauricus* Klok. et Shost. Фармаком, Харьков, №4, 2013, с. 26-29.
95. Шпичак О.С. Ідентифікація трави меліси, шишок хмелю та суцвіть лаванди у сумішах з рослинної сировини методом тонкошарової хроматографії. Вісник фармації, 1(69), 2012, с. 57-58.
96. Хохлова К.О., Вишневіська Л.І., Котов А.Г., Кічимасова Я.С. Стандартизація трави сухоцвіту багрового згідно вимог Державної Фармакопеї України. Фармаком, 2-2014, с. 38-43.
97. Толкачова Н.В., Шашков О.С., Чирва В.Я. Новый стероидный гликозид суплідь *Allium syriacum*. Журнал органической и фармацевтической химии. – 2013. – Том 11, вып. 3 (43). С. 78-82.
98. Литвиненко В.І., Попова Н.В., Павлова І.О. Дослідження бергеніну в рослинах роду *Badan*. Фармаком, 1-2005, с. 62-63.

99. Марчишин С.М., Гарник М.С. Дослідження амінокислот трави розхідника звичайного (*Glechoma hederacea* L.). Український біофармацевтичний журнал, №3(26), 2013, с.40-41.
100. Затильнікова О.О., Ковальов С.В., Осолодченко Т.П., Ахмедов Е.Ю. Дослідження ліпофільної фракції з листя *Iris pseudacorus*. Вісник фармації. 3(71), 2012. с. 57-59.
101. Myshenko V.A., Prokopenko Yu.S., Garna S.V. Determination of chemical compounds of vegetable plants of the solanaceae family. Український біофармацевтичний журнал, №1(27), 2013, с.6-9.
102. Гонтова Т.М., Ільїнська Н.І. Вивчення компонентного складу ефірної олії бульб жоржини німфейної. Український біофармацевтичний журнал, №3(26), 2013, с.49-51.
103. Сидора Н.В., Авідзба Ю.Н. Хромато-мас-спектрометричне дослідження компонентного складу ефірних олій квіток глоду секції *Coccineae* Loud. Вісник фармації. 1 (73), 2013, с. 40-43.
104. Shpychac O.S. Tikhonov O.I., Khanin V.A. Elaboration of the method of the terpenoid composition determination for essential oils of active pharmaceutical ingredients of «arised» capsules by gas chromatography. Вісник фармації, 4 (76), 2013, с. 23-27.
105. Хортецька Т.В., Мазулін О.В., Буряк В.П., Єренко О.К., Мазулін Г.В. Накопичення аукубіну в листі видів роду *Plantago* L. флори України. Фармаком, 2-2014, с. 34-35.
106. Андронати С.А. Воронина Т.А., Головенко Н.Я. Гидазепам. – К. : Изд-во «Наукова думка», 1992. – 200 с.
107. Амельчик Г.В., Егорова Е.В., Гіхер З.О. та ін. Аналітичний контроль якості субстанції «Левана» та її таблетованих форм// Вісник психіатрії та психофармакології, 2010, № 2(18), с. 78-85.
108. Маслова Л.И. Синтез и превращения производных флуорена, обладающих биологической активностью – Автореферат дисс...доктора фарм. наук- 15.00.02-ВНИИХТЛС, Харьков, 1990, 39 с.
109. Петрух Л.І. Флуорени як туберкуло стативи. Флуронезід: мікробіологічні, фармакологічні та клінічні аспекти. – Львів, 2008, 56 с.
110. Георгиевский В. П., Куликов А. Ю., Георгиевский Г. В. Тонкослойная хроматография // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств / под ред. чл.-кор. НАН Украины Георгиевского В. П. – Харків : НТМТ, 2012. – Т. 2. – С. 487–611.
111. Георгиевский Г. В. Стабильность и установление сроков годности лекарственных средств // Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств / под ред. чл.-кор. НАН Украины Георгиевского В. П. – Харків : НТМТ, 2012. – Т. 3. – С. 1220–1262.
112. Кучеренко Л.І., Вронська Л.В., Георгієвський Г.В., Лебединець Л.О. Газохроматографічне визначення тіотриазоліну в таблетках тіотриазоліну // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики : зб. наук. ст. – 2000. – Вип. VI. – С. 17–23.
113. Кучеренко Л.І., Георгієвський Г.В., Шаповалова Л.І. Розробка методів стандартизації нового лікарського препарату - кардіотрил // Фармаком. – 2008. – № 3. – С. 55–60.
114. Георгиевский Г. В., Куликов А. Ю. Определение примесей в отечественных субстанциях - производных 1,2,4-триазола методом обращено - фазовой ВЭЖХ // Фармаком. – 2009. – № 2. – С. 67–98.
115. Георгиевский Г. В. Разработка комплекса физико-химических методик, обеспечивающих создание и контроль качества оригинальных отечественных

- препаратов – производных 1,2,4-триазола // Запорожский мед. журн. – 2011. – Т. 13, № 1. – С. 58–70.
116. Георгієвський Г. В., Мазур І. А. Будова та критичні показники якості субстанції лізинію // Фармаком. – 2011. – № 4. – С. 40–48.
 117. Беленічев І. Ф., Кучеренко Л. І., Мазур І. А., Георгієвський Г. В., Бухтіярова Н. В., Стеблюк В. С., Павлюк І. В. Вплив нового метаболітотропного кардіопротектора «лізиній» на стан лімітуючих ланок енергетичного обміну і компенсаторних метаболічних шунтів в умовах гострого інфаркту міокарда // Клінічна фармація. – 2012. – Т. 16, № 2. – С. 36–39.
 118. Георгієвський Г. В. Методики оцінювання критичних показників якості у фармацевтичній розробці субстанції лізиній-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-гіоацетату та 2,5 % розчину лізинію для ін'єкцій // Фармацевтичний журнал. – 2012. – № 2. – С. 27–42.
 119. Мазур І.А., Беленичев И.Ф., Кучеренко Л.И., Георгиевский Г.В., Бухтиярова Н.В., Павлюк И.В., Стеблюк В.С. Подходы к разработке и созданию метаболитотропных препаратов – производных 1,2,4-триазола // Фармаком. – 2012. – № 3. – С. 40–48.
 120. Ярош О.К., Мазур І.А., Бобков В.М., Кучеренко Л.І., Барчина О.І., Крисько А.Г., Георгієвський Г.В., Волуй А.В. Профіль фармакокінетики сполуки «Лізиній» у крові після парентерального введення // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 5(30). – С. 93–98.
 121. Георгієвський Г.В., Мазур І.А. Обґрунтування напряму синтезу та доказ хімічної будови 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду // Фармаком. – 2012. – № 4. – С. 41–47.
 122. Георгієвський Г.В., Зінченко О.А. Визначення вмісту технологічних домішок в субстанції 1-(β-фенілетил)-4-аміно-1,2,4-триазолію броміду // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 6(31). – С. 29–36.
 123. Suresh Babu S.V., Shareef M.M., Pavan Kumar Shetty A. [et al.] HPLC method for amino acids profile in biological fluids and inborn metabolic disorders of aminoacidopathies // Indian Journal of Clinical Biochemistry.- 2002.- Vol. 17 (2).- P. 7-26
 124. Chen O., Barska M., Sybirna N. [et al.] Development and evaluation of hplc method for arginine assay in biological samples // Вісник Львівського університету. Серія біологічна.- 2012. – Випуск 60.- С. 73–82
 125. Руденко А.О., Карцова Л.А. Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращено-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидантоинов аминокислот // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т. 10. – Вып. 2.- С. 223-230
 126. Jajić I., Krstović S., Glamović D. [et al.] Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed // Journal of the Serbian Chemical Society. – 2013. – Vol. 78(6). – P. 839-850.
 127. Харченко О.В., Алмакаева Л.Г., Назарова О.С. ті інш. Розробка методів кількісного визначення амінокислот в лікарських препаратах методом високоефективної рідинної хроматографії // Фармацевтичний журнал.- 2007.- № 1. – С. 88-92.
 128. Шовковий А.В. Розробка методів аналізу нових біологічно активних сполук у ряду похідних амінокислот для стандартизації лікарських засобів на їх основі: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фармац. наук: спец. 15.00.03

- «Стандартизація та організація виробництва лікарських засобів». - Харків, 1999. - 20 с.
129. Шейн А.Т., Назарова О.С., Черниш Л.Я. та інші. Використання високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) в аналізі лікарських препаратів, які містять амінокислоти // Міжнародна конференція „Хроматографічні методи аналізу органічних сполук”: матеріали наук. конф., м. Київ. – 2007 р. – С. 28-29.
 130. Леонтьев Д.А. Фармацевтические стандартные образцы. - в кн. «Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств» в 3-х томах под ред. чл.-корр. НАН Украины Георгиевского В. П. – Харків : НТМТ, 2012 – том 3, Глава 2, с. 1064-1117
 131. Леонтьев Д.А. Система фармацевтических СО в Украине // «Фармацевтическая отрасль», декабрь № 6 (41) 2013, с. 58-63
 132. Леонтьев Д.А., Гризодуб О.І. Уніфікована процедура атестації фармацевтичних стандартних зразків // Інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я. – К.: Укрмедпатентоінформ МОЗ України. – № 21. – 2014. – с. 7
 133. Сур С.В., Зволинская Н.М. Программы профессионального тестирования как средство стандартизации работы лабораторий по контролю качества лекарственных средств. - в кн. «Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств» в 3-х томах под ред. чл.-корр. НАН Украины Георгиевского В. П. – Харків : НТМТ, 2012 – том 3, Глава 5, с. 1177-1219
 134. Сур С.В., Гризодуб О.І., Губарь С.М., Леонтьев Д.А., Зволинська Н.М., Денисенко Н.В., Чикалова С.О. Результаты визначення домішок у тестовому зразку малеїнової кислоти методом тонкошарової хроматографії учасниками 7-го раунду програми професійного тестування лабораторій з контролю якості лікарських засобів // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2012. — №3 (23), — с. 21.
 135. Сур С.В., Гризодуб О.І., Губарь С.М., Леонтьев Д.А., Зволинська Н.М., Денисенко Н.В., Чикалова С.О. Результаты визначення супровідної домішки в тестовому зразку декспантенолу методом тонкошарової хроматографії в рамках програм професійного тестування лабораторій із контролю якості лікарських засобів // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. — 2010. — №6 (14). — С. 4.
 136. Дмитриева М.В., Лукьянова И.С., Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И. Идентификация действующего вещества в таблетках методом ТСХ в рамках 10 раунда Программы профессионального тестирования лабораторий: аттестация тестовых образцов , критерии оценивания, анализ результатов // Фармаком. — 2013. — №4. — С. 61-69
 137. Назарова О.С., Алмакаева Л.Г., Вербова Ю.М. та інші. Разработка и стандартизация методик контроля качества комбинированного препарата на основе субстанций милдроната и L-аргинина гидрохлорида // Науково-практична конференція «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения»: матеріали наук. конф., м. Новий Світ, Україна.- Київ: Видавець В.С. Мартинюк.- 2011 р. – С. 131-132.
 138. Алмакаева Л.Г., Назарова О.С., Вербова Ю.М. Валідація методики кількісного визначення милдронату та L-аргініну гідрохлориду в комбінованому препараті в формі концентрату для інфузій // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. - 2011.- № 4 (18). – С. 60-65.
 139. Назарова О.С., Шитеєва Т. О., Вербова Ю. М. и др. Розробка оригінального комбінованого гелю венотонічної та протизапальної дії // III Міжнар. науково-

- практич. конф. “Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія”: Тез. доп.- Харків: Видавництво НфаУ, 2003. – Ч. II.- С. 219.
140. Назарова О.С. Розробка методів аналізу деяких протизапальних лікарських препаратів на гелевій основі // Фармаком. - 2002. - №4.- С. 69-74.
 141. Назарова О.С. Обґрунтування і стандартизація складу та технології комбінованих препаратів на гелевій основі протизапальної та венотонічної дії: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фармацевт. наук: спец. 15.00.03 «Стандартизація та організація виробництва лікарських засобів» / О.С. Назарова. - Харків, 2005. - 20 с.
 142. Зінченко О.А. Застосування газової хроматографії в контролі якості лікарських засобів: автореферат дис. на здобуття наук. ступеня канд. фарм. наук, спец. 15.00.03 «Стандартизація та організація виробництва лікарських засобів» / Зінченко О.А. – Харків, 2006. – 20 с.
 143. Зинченко А.А., Гризодуб А.И., Жиликова Е.Т., Георгиевский В.П. Фармакопейные аспекты контроля соединений серы в пробках препаратов для парентерального применения// Фармаком. – 2006. - № 4. – С. 59-65.
 144. Зинченко А.А., Котова Э.Э., Боброва М.Е. – Определение малых количеств селена в лекарственных препаратах методом газовой хроматографии// Актуальні проблеми аналітичної хімії. Матеріали сесії наукової ради НАН України з проблеми «Аналітична хімія» -Дніпропетровськ, 2004, с.68-69
 145. Зинченко А.А., Георгиевский В.П. Газовая хроматография. - в кн. «Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств» в 3-х томах под ред. чл.-корр. НАН Украины Георгиевского В. П. – Харків : НТМТ, 2012 – том 2, Глава 6, с. 799-924
 146. Зинченко А.А. Определение продуктов разложения в препаратах для инъекций с нестабильными в растворах действующими веществами // Фармаком. – 2013. - № 3. – С. 39-44.
 147. Зинченко А.А. Определение состава газовой фазы в ампулированных лекарственных препаратах// Фармаком. – 2011. - № 4. – С. 30-36.
 148. Голубовский Г.Б., Будко Е.В., Басова Е.М. [и др.] Кинетико-хроматографическое определение 4-метиламиноантипирина в таблетках «Пенталгин Н» и «Пенталгин ФС» // Журн. аналит. химии. – 2007. – Т. 62, №7. - С. 733-739.
 149. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – [1-е вид.]. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
 150. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств: под ред. Н.В. Юргеля, А.Л. Младенцева, А.В.Бурдейна и др. – М.: Фармацевтическая промышленность, 2007. – 58 с.
 151. Зинченко А.А. Определение состава газовой фазы в ампулированных лекарственных препаратах// Фармаком. – 2011. - № 4. – С. 30-36.
 152. Количественный анализ хроматографическими методами: Пер. с англ. / Под ред. Э. Кэц. – М.: Мир, 1990. – 320 с
 153. Другов Ю.С., Конопелько Л.А. Газохроматографический анализ газов. – М.: МОИМПЕКС, 1995. – 464 с.
 154. Стадніченко О.В., Краснопольський Ю.М., Коваленко С.М. Визначення ступеня інкапсуляції у ліпосомах зантрацикліновими антибіотиками, отриманими за допомогою методу «хімічного градієнта» // Фармац. журн. – 2008. – № 5. – С. 98-103
 155. Краснопольський Ю.М., Стадніченко А.В. Валидация технологического процесса производства лекарственных препаратов в липосомальной форме с помощью

- оборудования для ВЭЖХ / // Управління якістю в фармацевції: Мат. 2 науково-практичної конференції. 25 травня 2007 р. –Харків, 2007. – С. 87
156. Стадніченко О.В., Краснопольский Ю.М. Розробка методики визначення невиключеної речовини ліпосомальні форми доксорубіцину методом ВЕРХ // Фармаком. – 2007. – № 1. – С. 64-69
 157. Стадніченко О.В., Краснопольський Ю.М., Коваленко С.Н. Визначення Стандартизація виробництва и методів контролю ліпосомальних форм антрациклінових антибіотиків // Нанотехнології в онкології 2008: Тез. докл. Всероссийської наукової конференції з міжнародним участям. 6 грудня 2008 г.– Москва, 2008. – С. 53-54
 158. Kulikov Artem U. Micellar LC separation of sesquiterpenic acids and their determination in *Valeriana officinalis* L. root and extracts // *Chromatography Research International*. – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 564243. – doi: 10.1155/2012/564243;
 159. Kulikov Artem U., Boichenko Alexander P., Verushkin Aleksey G. Optimization of micellar LC conditions for separation of opium alkaloids and their determination in pharmaceutical preparations // *Anal. Meth.* – 2011. – № 3. – P.2749-2757;
 160. Boichenko A.P., Chernyshova O.S., Kulikov A.Yu., Loginova L.P. Properties of 2,4-dinitrophenyl derivatives of amino acids as analytical forms for HPLC // *Russ. J. Appl. Chem.* – 2011. – Vol. 84, № 6. – P. 957-963;
 161. Kulikov Artem U., Galat Marina N., Boichenko Alexander P. Optimization of Micellar LC Conditions for the Flavonoid Separation // *Chromatographia*. –2009. –Vol. 70, N3/4. –P. 371–379;
 162. Lidia P. Loginova, Artem U. Kulikov, Elena Y. Yakovleva, Alexander P. Boichenko MLC determination of preservatives in cranberry foodstuffs / // *Chromatographia* – 2008. – Vol. 67, N 7/8. – P. 615-620;
 163. Kulikov Artem U., Aleksey G. Verushkin. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, guifenesin and preservatives in syrups by micellar LC // *Chromatographia*. – 2008. – Vol. 67, № 5/6. – P. 347-355;
 164. Kulikov Artem U. Determination of pyrethroid insecticide deltamethrin by micellar liquid chromatography with spectrophotometric detection // *Chromatographia*. – 2007. – Vol. 66, № 5/6. – P. 303-309
 165. Kulikov A.U., Verushkin A.G., Loginova L.P. Comparison of Micellar and Reversed-Phase Liquid Chromatography for Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim // *Chromatographia*. – 2005. – Vol. 61. – P. 455–463
 166. Куликов А.Ю., Галат М.Н., Бойченко А.П. Оптимизация разделения флавоноидов с использованием метода мицеллярной жидкостной хроматографии // *Фармаком*. – 2009. – № 1. – С. 20–29
 167. Куликов А.Ю. Одновременное количественное определение гидрофобных и гидрофильных веществ методом мицеллярной жидкостной хроматографии.: дис. ... докт. хим. наук : 02.00.02 / Куликов Артем Юрьевич. – Харьков, 2014. – 514 с
 168. Locatelli M., Tammaro F., Menfhini L. et al. Anthraquinone profile and chemical fingerprint of *Rhamnus saxatilis* L. from Italy // *Phytochem. Letters*. – 2009. – Vol. 2. – P. 223–226
 169. Catalogue «Pharmaceutical reference standarts / European Directorate for Quality of medicines and health care. – Strasbourg. – № 55. – 2011 p.
 170. Котов А.Г. Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослину сировину до Державної Фармакопеї України // *Фармаком*, №1 2009, с. 5-10

171. Котов А.Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослинну сировину // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації №1-2 (21-22) 2012, с.4-10
172. Котов А.Г. Фармакопейні аспекти стандартизації лікарської рослинної сировини і препаратів на її основі –Автореферат дис. доктора фарм. наук, Харків, 2013
173. Котов А.Г., Котова Э.Э. Результаты введения монографий на лекарственное растительное сырье и препаратов на его основе (Часть 1,2) – Разработка и регистрация лекарственных средств – 2014 №1(6), с.150-171, – 2014 №2(7), с.172
174. Котов А.Г., Котова Э.Э. Разработка и аттестация растительных экстрактов в системе фармакопейных стандартных образцов Государственной Фармакопеи Украины // Фармаком. – 2013. – № 4. – С. 25-27.
175. Котов А.Г., Котова Э.Э., Леонтьев Д.А., Гризодуб А.И. Подходы к аттестации растительных экстрактов в качестве ФСО ГФУ для идентификации методом ТСХ // Фармаком. – 2014. – № 3. – С. 5-13.

ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ У СТВОРЕННІ ТА КОНТРОЛІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ В УКРАЇНІ

В.П. Георгієвський

*ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»
61085, Харків, вул. Астрономічна, 33, bekas1937@mail.ru*

Представлений короткий огляд історії створення хроматографічних методів у хімічному аналізі.

Розглянуто теоретичні основи стандартизації хроматографічних методів (ТШХ, ВЕРХ, ГХ, МРХ).

На конкретних прикладах показано застосування кожного з хроматографічних методів при контролі якості лікарських засобів і лікарської рослинної сировини.

Відзначена вирішальна роль хроматографічних методів при аналітичному забезпеченні фармацевтичної розробки.

CHROMATOGRAPHIC METHODS IN THE CREATION AND CONTROL DRUGS IN UKRAINE

V.P. Georgievski

*State Enterprise "Ukrainian Research Center Pharmacopoeial quality of drugs"
61085, Kharkov, st. Astronomical, 33, bekas1937@mail.ru*

A brief overview of the history of chromatographic methods in chemical analysis is presented.

The theoretical bases of standartization chromatographic methods (TLC, HPLC, GC, MLC) are shown.

The specific examples are illustrate the using of chromatographic methods for quality control of medicines and medicinal plants.

Awarded the crucial role of chromatographic methods for analytical support pharmaceutical development.