

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Чепило Дмитрий Андреевич

**Разработка стандартных образцов для контроля качества антигипертензивных
лекарственных средств – ингибиторов АПФ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент, профессор
Белова Мария Владимировна

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Описание становления систем стандартных образцов на территории РФ и за рубежом	12
1.2. Регулирование процесса создания и контроля качества стандартных образцов.....	13
1.3. Характеристика объектов исследования – антигипертензивных лекарственных средств группы иАПФ	17
1.4. Фармакологические свойства объектов исследования – антигипертензивных лекарственных средств группы иАПФ	19
1.5. Синтез субстанций Каптоприла и Эналаприла малеата.....	20
1.5.1. Синтез субстанции Каптоприла.....	20
1.5.2. Синтез субстанции Эналаприла малеата.....	24
1.6. Методы анализа соединений структуры пролина.....	25
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	28
2.1. Объекты исследования.....	28
2.2. Оборудование.....	28
2.3. Реактивы и стандартные образцы.....	30
2.4. Используемые методики.....	32
ГЛАВА 3. АТТЕСТАЦИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ КАПТОПРИЛА.....	34
3.1. Проведение общепармакопейных испытаний исследуемых образцов Каптоприла.....	34
3.1.1. Внешний вид.....	34
3.1.2. Растворимость.....	34
3.1.3. Прозрачность и цветность.....	35
3.1.4. Температура плавления.....	35
3.1.5. Удельное вращение.....	36
3.1.6. Содержание воды.....	36
3.1.7. Сульфатная зола.....	37
3.1.8. Потеря в массе при высушивании.....	37
3.1.9. Тяжелые металлы	38

3.2. Комплексный подход к оценке спектральных характеристик для проведения идентификации исследуемых образцов Каптоприла.....	38
3.2.1. ИК-спектроскопия.....	39
3.2.2. ЯМР-спектроскопия.....	40
3.2.3. Масс-спектрометрии.....	43
3.3. Применение хроматографических методов в анализе исследуемых образцов Каптоприла.....	49
3.3.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе исследуемых образцов Каптоприла.....	49
3.3.1.1. Разработка хроматографической методики определения посторонних примесей.....	49
3.3.1.2. Валидация хроматографической методики определения посторонних примесей.....	54
3.3.1.3. Количественное определение посторонних примесей.....	63
3.3.2. Газовая хроматография в анализе исследуемых образцов Каптоприла.....	66
3.3.2.1. Определение примеси F	66
3.3.2.2. Разработка хроматографической методики определения остаточных органических растворителей	70
3.3.2.3. Валидация хроматографической методики определения остаточных органических растворителей	74
3.3.2.4. Количественное определение остаточных органических растворителей	82
3.4. Количественное определение Каптоприла методом материального баланса.....	83
3.5. Нормы и показатели качества стандартного образца Каптоприла.....	84
ГЛАВА 4. АТТЕСТАЦИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	
ЭНАЛАПРИЛА МАЛЕАТА.....	87
4.1. Проведение общефармакопейных испытаний исследуемых образцов Эналаприла малеата.....	87
4.1.1. Внешний вид.....	87
4.1.2. Растворимость.....	87
4.1.3. Прозрачность и цветность	88
4.1.4. Температура плавления.....	88
4.1.5. Удельное вращение.....	89
4.1.6. Содержание воды.....	89
4.1.7. Сульфатная зола	90

4.1.8. Потеря в массе при высушивании.....	90
4.1.9. Тяжелые металлы	91
4.2. Комплексный подход к оценке спектральных характеристик для проведения идентификации исследуемых образцов Эналаприла малеата.....	91
4.2.1. ИК-спектроскопия.....	92
4.2.2. ЯМР-спектроскопия.....	93
4.2.3. Масс-спектрометрия.....	97
4.3. Применение хроматографических методов в анализе исследуемых образцов Эналаприла малеата.....	102
4.3.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе исследуемых образцов Эналаприла малеата.....	103
4.3.1.1. Разработка хроматографической методики определения посторонних примесей.....	103
4.3.1.2. Валидация хроматографической методики определения посторонних примесей.....	108
4.3.1.3. Количественное определение посторонних примесей.....	114
4.3.2. Газовая хроматография в анализе исследуемых образцов Эналаприла малеата.....	116
4.3.2.1. Разработка и валидация хроматографической методики определения остаточных органических растворителей	117
4.3.2.2. Количественное определение остаточных органических растворителей.....	117
4.4. Количественное определение Эналаприла малеата методом материального баланса.....	118
4.5. Нормы и показатели качества стандартного образца Эналаприла малеата.....	119
ВЫВОДЫ.....	122
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	123
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	124
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	127
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	137
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	138
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	139
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	140
ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....	141

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Артериальная гипертензия (АГ) является одной из самых распространенных патологий сердечно-сосудистой системы среди населения земного шара [3]. Ранее характерная в большей степени для лиц старших возрастных групп, в современном мире она все чаще встречается у людей среднего возраста, подростков и даже детей в связи с разнообразными факторами, такими как: питание, экологические факторы, образ жизни, наследственность [19, 38]. В связи с этим прогнозируется прирост количества пациентов с АГ до 20 % к 2025 году, что составит около 1,5 миллиарда человек [80].

На сегодняшний день отсутствуют методы терапии и лекарственные препараты, которые позволяют полностью вылечить пациентов, страдающих АГ, но при этом существует ряд лекарственных средств (ЛС), минимизирующих воздействие АГ на организм [3]. Наиболее распространенной группой рациональной фармакотерапии, применяемой в лечении АГ, является группа ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ) [59, 96].

Известными представителями данной фармакологической группы являются ЛС Каптоприл и Эналаприл (Эналаприла малеат). Доказанная эффективность и профиль безопасности, определяющие наибольшую частоту назначения данных ЛС врачами, а также широко представленный ассортимент на российском фармацевтическом рынке зарубежных и отечественных препаратов Каптоприла и Эналаприла (Эналаприла малеата), как в монокомпонентном виде, так и в виде комбинаций с другими активными веществами способствовали выбору именно Каптоприла и Эналаприла (Эналаприла малеат) в качестве объектов настоящего исследования в виде активных фармацевтических субстанций (АФС) [12-13, 31].

Текущая тенденция развития фармацевтической отрасли определяет расширение номенклатуры ЛС, в том числе группы иАПФ, что, в свою очередь, также предопределяет обновление существующих и создание новых современных требований к контролю качества препаратов. Применение высокочувствительных, селективных физико-химических и физических методов анализа является неотъемлемой частью проведения контроля качества ЛС. В ходе анализа ведущих зарубежных фармакопей можно сделать заключение, что определение таких ключевых показателей ЛС, как «Количественное определение», «Подлинность» и «Определение чистоты» выполняется аналитическими методами, где в большинстве случаев используются стандартные образцы (СО) [8, 49, 66, 110-111]. Использование СО в ходе разработки или контроля качества медицинских препаратов, а также АФС, помогает получить достоверные и однозначные результаты испытаний по показателям «Подлинность», «Определение чистоты» и

«Количественное определение» исследуемых объектов, что делает фармацевтический анализ более объективным. По этой причине, создание обширной номенклатуры и свободного доступа СО соответствующих АФС в фармацевтической отрасли любой страны, обеспечивающих надлежащее качество лекарственной продукции, являются актуальными и обязательными задачами [20].

В настоящее время на территории Российской Федерации (РФ) в фармацевтическом анализе преимущественно используются СО зарубежных производителей и практически не применяются отечественные стандарты.

Таким образом, актуальными задачами являются аттестация СО Каптоприла и Эналаприла малеата, создание соответствующей нормативной документации на аттестуемые СО. Выполнение данных задач позволит насытить отечественный фармацевтический рынок качественным и конкурентным продуктом с постоянной ценой, а также повысит доступность СО на территории РФ.

Степень разработанности темы исследования

Тематике аттестации СО в разные периоды времени были посвящены научные исследования академика Российской академии медицинских наук (РАМН), профессора Арзамасцева А.П., профессора Садчиковой Н.П., доцента Щепочкиной О.Ю. и других ученых. Актуальные требования, положения и принципы создания и применения СО рассматриваются Государственной Фармакопеей Российской Федерации (ГФ РФ) XIV издания ОФС.1.1.0007.18 «Стандартные образцы», а также Федеральным законом от 26.06.2008 № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений». На сегодняшний день также существует проект ОФС «Стандартные образцы» Фармакопеи Евразийского экономического союза.

Использование СО Каптоприла и Эналаприла в контроле качества ЛС обеспечивает выпуск и обращение качественных, безопасных и эффективных ЛС на отечественном фармацевтическом рынке.

Цель исследования

Цель исследования – разработать стандартные образцы, предназначенные для стандартизации и контроля качества антигипертензивных лекарственных средств иАПФ – Каптоприла и Эналаприла малеата.

Задачи исследования

Для достижения цели исследования определены следующие задачи:

1. Изучить современное состояние и перспективы совершенствования системы обеспечения качества ЛС и определить основные тенденции развития стандартизации антигипертензивных лекарственных средств – иАПФ в РФ и за рубежом;
2. Провести исследования по изучению физико-химических свойств и разработке методик анализа СО антигипертензивных лекарственных средств – иАПФ с помощью методов комплексной оценки для подтверждения их подлинности;
3. Охарактеризовать качество разрабатываемых СО Каптоприла и Эналаприла малеата по общим показателям фармакопейного анализа и установить нормы для их дальнейшего контроля качества;
4. Разработать и валидировать методики для анализа чистоты СО Каптоприла и Эналаприла малеата по показателю «Посторонние примеси» с помощью метода ВЭЖХ, провести исследование аттестуемых образцов и установить нормы по данному разделу;
5. Разработать и валидировать методику оценки СО Каптоприла и Эналаприла малеата по показателю «Остаточные органические растворители» с помощью метода ГХ, провести исследование аттестуемых образцов и установить нормы по данному разделу;
6. Предложить метод количественного определения СО Каптоприла и Эналаприла малеата, а также оценить приемлемость выбранного метода в контроле качества;
7. Создать проекты регламентирующих документов на СО Каптоприла и Эналаприла малеата.

Научная новизна

Предложен комплексный подход аттестации Эналаприла (Эналаприла малеата) и Каптоприла в качестве СО, включающий применение общих фармакопейных испытаний, проведение исследований с использованием сложных, точных и высокочувствительных физико-химических методов для определения показателей «Подлинность», «Посторонние примеси», «Остаточные органические растворители».

Предложен комплексный подход определения показателя «Подлинность» с помощью нескольких методов: ИК-спектроскопии, Масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопия (^1H , ^{13}C). Представленный подход позволил провести надежную идентификацию Каптоприла и Эналаприла малеата.

Разработаны и валидированы методики определения показателей «Посторонние примеси» и «Остаточные органические растворители» с помощью методов ВЭЖХ и ГХ соответственно.

Предложены нормы аттестуемых показателей для включения в спецификации на СО Эналаприла и Каптоприла с целью последующего контроля их качества.

Теоретическая и практическая значимость работы

Подходы, используемые для аттестации СО Эналаприла и Каптоприла, могут применяться при решении подобного рода задач в отношении других веществ группы иАПФ различного химического строения. Установлены соответствующие нормы качества для СО Эналаприла и Каптоприла согласно разработанным методикам аналитического контроля. Оформлены проекты нормативной документации (спецификации) для СО Эналаприла и Каптоприла.

Разработанные методики и комплекс проведенных исследований были учтены при процедуре аттестации СО утвержденного типа состава Каптоприла (НЦСО-Каптоприл) ГСО 11697-2021 (Приложение Г) и СО утвержденного типа состава Эналаприла малеата (НЦСО-Эналаприл) ГСО 11691-2021 (Приложение Д), которые находят свое применение в контроле качества ЛС Каптоприла и Эналаприла.

Внедрение результатов в практику

Основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации внедрены:

1. В рабочий процесс Управления по инспектированию производства лекарственных средств и экспертизе в части разработки, аттестации и производства стандартных образцов в Федеральное бюджетное учреждение «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» Министерства промышленности и торговли Российской Федерации (ФБУ «ГИЛС и НП») (Акт № б/н от 15.06.2022 г.) (Приложение А);

2. В учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины «специальная фармацевтическая химия» по направлениям подготовок (специальностей) 33.05.01 Фармация (Акт № 113 от 08.07.2022) (Приложение Б);

3. В части разработки, аттестации и производства стандартных образцов в деятельность Общества с ограниченной ответственностью «Национальный центр стандартных образцов» (ООО «НЦСО») (Акт № б/н от 05.09.2022 г.) (Приложение В).

Методология и методы исследования

Настоящая работа выполнена с учетом требований к СО – ОФС.1.1.0007.18 «Стандартные образцы» Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания и Федерального закона от 26.06.2008 № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».

В ходе настоящего исследования были применены методы ИК-спектроскопии, Масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии. Содержание воды определяли методом Карла Фишера. Хроматографический анализ осуществляли методом ВЭЖХ с УФ-детектированием, а также методом ГХ с пламенно-ионизационным детектором. Количественное определение СО проводили методом материального баланса с учетом таких параметров как содержание воды, сульфатной золы, остаточных органических растворителей и посторонних примесей. Обработку результатов, полученных в ходе проведения исследования, осуществляли при помощи программного обеспечения: TopSpin, LabSolutions, Microsoft Office Excel.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Обоснование и результаты применения комплекса спектральных методов анализа (ИК-спектроскопии, Масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопия (^1H , ^{13}C)) для достоверной идентификации СО Эналаприла и Каптоприла.

2. Обоснование проведения ряда общих фармакопейных испытаний для контроля качества СО Эналаприла и Каптоприла (внешний вид, растворимость в различных растворителях, прозрачность и цветность, температура плавления, удельное вращение, содержание воды, потеря в массе при высушивании, содержание тяжелых металлов, сульфатная зола) и определение соответствующих норм по данным показателям.

3. Определение норм показателя «Посторонние примеси» путем обработки результатов анализа СО Эналаприла и Каптоприла, полученных с помощью метода ВЭЖХ.

4. Определение норм показателя «Остаточные органические растворители» путем обработки результатов анализа СО Эналаприла и Каптоприла, полученных с помощью метода ГХ.

5. Экспериментальные данные количественного определения СО Эналаприла и Каптоприла.

6. Обоснование норм и показателей качества полученных СО Эналаприла и Каптоприла для создания нормативной документации.

Степень достоверности и апробация результатов

Полученные экспериментальные данные являются достоверными и точными, что основывается на достаточном объеме выполненных исследований, применении современных физико-химических методов анализа: ВЭЖХ, ГХ, ИК-, ЯМР-спектроскопия, Масс-спектрометрия. Валидированы разработанные методики определения посторонних примесей с помощью метода ВЭЖХ и остаточных органических растворителей с помощью метода ГХ по основным параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная прецизионность), аналитическая область, ПКО, ПО. Проведена статистическая обработка полученных результатов исследований в шести

повторностях с помощью Microsoft Office Excel. Все применяемое в ходе исследований оборудование прошло регистрацию и поверку.

Обсуждение результатов работы проведено на 3-м ежегодном конгрессе «IPharmS» (Тегеран, февраль 2021); на научном вебинаре «Pharmtech&Ingredients» (Москва, май 2021); на 23-й Международной выставке оборудования, сырья и технологий для фармацевтического производства «Pharmtech&Ingredients» (Москва, ноябрь 2021); на конференции молодых ученых Сеченовского университета и ВГМУ «Фармация. Вызовы времени» (Москва, ноябрь 2021).

Апробация диссертации проведена «07» сентября 2022 г. на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора

В рамках проведения научно-квалифицированной работы автор определил цель и задачи исследования, составил план исследования. Комплексный анализ аттестуемых СО Каптоприла и Эналаприла малеата различными способами был выполнен лично автором. Автором проведен ряд общих фармакопейных исследований: описание, растворимость в различных растворителях, прозрачность и цветность, температура плавления, удельное вращение, содержание воды, потеря в массе при высушивании, содержание тяжелых металлов, сульфатная зола. Получены и расшифрованы ИК-, ЯМР- и Масс-спектры, разработаны и валидированы методики определения остаточных органических растворителей с помощью метода ГХ и посторонних примесей с помощью метода ВЭЖХ для СО Каптоприла и Эналаприла малеата. Автором подготовлены проекты нормативной документации (спецификации) с целью последующего контроля качества разработанных СО.

Публикации и доклады о результатах исследований, а также написание диссертации и автореферата осуществлялись непосредственно автором.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационные научные положения соответствуют формуле специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Полученные в ходе исследования результаты согласуются с областью исследования специальности, а именно пунктам 2 и 3 специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена согласно тематике и научному плану исследований кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института

Фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (№ государственной регистрации: 01.2.011.68237).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 8 работ, в том числе 1 научная статья в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 научная статья в журнале, индексируемом в Международной системе цитирования Chemical Abstracts; 2 научные статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Scopus; 4 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежной конференции).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 141 странице, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, общих выводов, списка сокращений (списка сокращений и условных обозначений), списка литературы и приложений (А, Б, В, Г, Д). Список литературы включает 118 источников (79 из которых – зарубежные). Работа содержит 46 рисунков и 68 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Описание становления систем стандартных образцов на территории РФ и за рубежом

Первым шагом применения СО на практике можно считать этап создания в 1931 г. Фармакопейной комиссии США в сфере СО, так как был утвержден стандарт биологического типа для количественного определения наперстянки. Постоянное развитие научно-технического потенциала обуславливали создание новых СО и к 1950 г. Фармакопея США XIV издания содержала 40 СО, а к 1970 г. Фармакопея США XVIII издания содержала уже 240 СО, которые находили свое применение как в отдельных химических опытах, так и в количественном определении веществ. Подобная тенденция происходила и при формировании Национального формуляра США программы СО (издание 1960 г. – 5 СО; издание 1960 г. – 42 СО; издание 1965 г. – 91 СО; издание 1970 г. – 238 СО). На сегодняшний день Американская фармакопея насчитывает более 5500 наименований СО разных категорий [1, 17, 39].

В 1952 году комитетом ВОЗ принимается решение о создании перечня подлинных химических веществ, использовавшихся ранее в качестве международных биологических стандартов для количественного определения препаратов и проведения научных исследований [1]. Вышеописанное решение, а также заключение соглашения Шведского аптечного общества и ВОЗ, послужило образованию международного справочного центра ВОЗ в области химических СО на базе стокгольмской аптечной контрольно-аналитической лаборатории (1956 г.) [39].

Первые упоминания о химических стандартах в Британской фармакопее датируются 1963 годом. В этот период были введены подлинные вещества, предназначенные для идентификации лекарств методом ИК-спектроскопии и количественного определения фотометрическими методами. На сегодняшний день стандарты Британской фармакопеи имеет более широкую область применения, а их ассортимент представлен более чем 900 наименованиями [1, 16, 39].

На территории современной Европы производство и дальнейшая реализация СО происходит на базе Европейского директората по качеству лекарственных средств и здравоохранению (EDQM). Одной из основных целей подразделения EDQM – Европейской фармакопеи – является обеспечение доступности разного рода СО, которые применяются при производстве ЛС. В настоящий момент в каталоге EDQM числится более 3100 стандартов. Обновление информации в каталоге стандартов происходит несколько раз в год после каждого заседания Европейской фармакопейной комиссии. [4, 14-15, 22, 39].

Истоки развития системы СО на территории современной России берут свое начало во времена СССР.

Первые упоминания о стандартах встречаются в ГФ VIII издания. Речь шла о стандартах гормонов (кристаллический инсулин, пролин и т.д.), а также о веществах, которые использовались для стандартизации лекарственного растительного сырья (травы горичвета, семян строфанта и т.д.).

Впервые статья на химические стандартные образцы появилась в ГФ IX издания в разделе «реактивы», а первая ОФС «Стандартные образцы» и фармакопейные статьи на 50 стандартов вошли уже в ГФ X издания. Ввиду постепенного развития фармацевтической промышленности, возникал острый вопрос создания соответствующих СО, что в конечном итоге привело к ежегодному пополнению наименований СО [22]. Актуальные требования, положения и принципы создания и применения СО рассматриваются ГФ РФ XIV издания ОФС.1.1.0007.18 «Стандартные образцы», а также Федеральным законом от 26.06.2008 № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений» [8, 23].

1.2. Регулирование процесса создания и контроля качества стандартных образцов

В рамках достижения таких важных целей, как установление правовых основ обеспечения единства измерений на территории РФ; защита прав и законных интересов граждан, общества и государства от отрицательных последствий недостоверных результатов измерений; обеспечение потребности граждан, общества и государства в получении объективных, достоверных и сопоставимых результатов измерений, используемых в целях защиты жизни и здоровья граждан, охраны окружающей среды, животного и растительного мира, обеспечения обороны и безопасности государства, в том числе экономической безопасности, а также содействие развитию экономики и научно-техническому прогрессу, на территории РФ был утвержден Федеральный закон от 26.06.2008 № 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений» (далее ФЗ). Действие данного закона распространяется на широкую область сфер, в том числе и на деятельность в области здравоохранения, охрану окружающей среды, производственный контроль производственных объектов. Сфера государственного регулирования обеспечения единства измерений распространяется также на единицы величин, эталоны единиц величин, стандартные образцы и средства измерений, к которым установлены обязательные требования [23].

Настоящий ФЗ определяет СО как образец вещества (материала) с установленными по результатам испытаний значениями одной и более величин, характеризующих состав или свойство этого вещества (материала). Согласно статье 8 «Требования к стандартным образцам» настоящего ФЗ предназначение СО определяется воспроизведением, хранением и передачей характеристик состава или свойств веществ (материалов), выраженных в значениях единиц

величин, допущенных к применению в РФ. В сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений применяются СО только утвержденных типов [23].

Тип СО представляет собой совокупность СО одного и того же назначения, изготавливаемых из одного и того же вещества (материала) по одной и той же технической документации. Утверждение типа СО достигается получением документально оформленного в установленном порядке решения о признании соответствия типа СО или типа средств измерений метрологическим и техническим требованиям (характеристикам) на основании результатов испытаний СО или средств измерений в целях утверждения типа. Испытания СО в целях утверждения типа подразумевают работы по определению метрологических и технических характеристик однотипных СО. Испытания СО в целях утверждения типа могут проводиться юридическими лицами, аккредитованными в соответствии с законодательством РФ об аккредитации в национальной системе аккредитации на выполнение испытаний в целях утверждения типа [23].

Сертификация (аттестация) химического СО является поступательным процессом и требует заблаговременной и тщательной проработки плана. На начальном этапе по согласованному и установленному плану проведения аттестации кандидата в СО происходит определение значений параметров, приписываемых величине, представляющих химическое, физическое, а в некоторых случаях и биологическое свойство исследуемого вещества, которое определяется за счет каких-либо физических, физико-химических или биологических методов анализа. Типичными параметрами, которые подвергаются первичному определению являются структурное описание вещества, молекулярная масса, эмпирическая формула [8, 23].

Провести аттестацию вещества в рамках определения и подтверждения его структуры удается за счет применения таких современных методов, как ЯМР-спектроскопия, Масс-спектрометрия, ИК-спектроскопия и возможные варианты элементного анализа. Для контроля чистоты кандидатов в СО определяют такие параметры, как содержание воды, остаточные органические растворители, потерю в массе при высушивании, органические и неорганические (сульфатная зола, тяжелые металлы и т.д.) примеси. В зависимости от особенностей исследуемых веществ могут определяться дополнительные параметры (температура плавления, показатель преломления и т.д.). Содержание основного компонента СО обычно определяют методом баланса масс, но также допускается использование других пригодных методов (ВЭЖХ, титриметрические методы анализа и т.д.). На основании полученных результатов испытаний устанавливаются соответствующие значения величин и формируется нормативная документация (спецификация).

Неотъемлемой частью сертификация (аттестация) СО является определение стабильности, однородности, разного рода погрешностей и неопределенностей СО. В рамках исследований

стабильности проводят изучение материала СО для целей установления срока годности, условий хранения и применения СО, при которых оцениваются возможные изменения значений аттестованной характеристики СО под влиянием факторов нестабильности. Под факторами нестабильности понимают совокупность внешних условий, а также физических и химических процессов, протекающих в материале СО и вызывающих изменение аттестованной характеристики СО. Однородность СО выражается в постоянстве значения аттестуемой характеристики или нескольких характеристик разных СО (межэкземплярная однородность) или одного и того же СО (внутриэкземплярная однородность). Погрешность аттестованного значения СО представляет собой отклонение аттестованного значения от истинного значения аттестуемой характеристики экземпляра СО, а также любой его части, которая используется для проведения измерений. Оценку неопределенность аттестованного значения СО проводят по стандартному отклонению аттестованного значения с определенным коэффициентом охвата или границы интервала аттестованного значения при определении коэффициента охвата [8, 23].

Согласно статье 14 «Метрологическая экспертиза» ФЗ нормативные требования к СО подлежат обязательной метрологической экспертизе. Метрологическая экспертиза проводится государственными научными метрологическими институтами [23].

Для осуществления сертификации (аттестация) СО в соответствующий регуляторный орган для экспертизы также предоставляется информация об упаковке, маркировке, условиях хранения и транспортировке СО.

На основании положительных результатов испытаний СО в целях утверждения типа принимается положительное решение об утверждении типа СО соответствующим регулирующим органом и включением утвержденной информации в Федеральный информационный фонд по обеспечению единства измерений. На основании положительного решения об утверждении типа СО формируются сопроводительные документы на СО (паспорт и проект этикетки СО) по форме соответствующего стандарта [8, 23].

В Таблице 1 приведен список документов, регулирующих процесс создания СО и контроль качества СО.

Таблица 1 – Сводная таблица нормативных документов, регулирующих процесс создания и контроля качества СО

Данные о нормативном документе	Аннотация нормативного документа
ФЗ № 102 «Об обеспечении единства измерений»	В настоящем законе рассмотрены основные принципы и положения обеспечения единства

Продолжение Таблицы 1

	измерений. Представлены требования к измерениям, единицам величин, эталонам единиц величин, СО, средствам измерений
ГОСТ ISO Guide 35-2015 «Стандартные образцы. Общие и статистические принципы сертификации (аттестации)»	В настоящем стандарте рассмотрены статистические принципы, способствующие пониманию и разработке надежных методов приписывания значений параметров СО, включая оценку связанной с ними неопределенности и установления их метрологической прослеживаемости. СО, проходящие все этапы сертификации (аттестации), описанные в настоящем стандарте, обычно сопровождаются сертификатом (паспортом) и называются сертифицированными (аттестованными) стандартными образцами (ССО (АСО)). Настоящий стандарт будет полезен для установления возможности применения ССО (АСО) как средств обеспечения сравнимости, точности и сопоставимости результатов измерений с национальными и международными шкалами
ГОСТ 8.532-2002 «Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава веществ и материалов. Межлабораторная метрологическая аттестация. Содержание и порядок проведения работ»	Настоящий стандарт распространяется на СО состава веществ и материалов и устанавливает порядок проведения и содержание работ по определению их метрологических характеристик способом межлабораторной аттестации
ГОСТ 8.531-2002 «Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава монокристаллических и дисперсных материалов. Способы оценивания однородности»	Настоящий стандарт распространяется на СО состава монокристаллических материалов для спектрального анализа и на СО состава дисперсных материалов и устанавливает порядок проведения экспериментов и алгоритм обработки результатов при оценивании характеристик однородности в процессе аттестации СО
Р 50.2.031-2003 «Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Методика оценивания характеристики стабильности»	Настоящие рекомендации распространяются на СО состава и свойств веществ и материалов и устанавливают последовательность экспериментальных операций при исследовании стабильности СО, алгоритм обработки результатов для оценивания срока годности экземпляров СО, устанавливаемого в документации на тип СО
РМГ 93-2015 «Государственная система обеспечения единства измерений. Оценивание метрологических характеристик стандартных образцов»	Настоящие рекомендации распространяются на СО состава и свойств веществ и материалов и устанавливают алгоритмы оценивания их метрологических характеристик

Продолжение Таблицы 1

ГОСТ Р 8.691-2010 «Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы материалов (веществ). Содержание паспортов и этикеток»	Настоящий стандарт устанавливает общие требования к содержанию паспортов и этикеток к СО, применяемым в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений
ГОСТ 8.315-2019 «Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения»	Настоящий стандарт распространяется на СО состава и свойств веществ и материалов и устанавливает общие положения по их разработке, утверждению (признанию), регистрации, выпуску и применению
Государственная фармакопея РФ XIV изд. ОФС.1.1.0007.18 «Стандартные образцы»	Настоящая ОФС определяет основные требования и положения, предъявляемые к СО. Отдельно вынесена информация о ФСО

1.3. Характеристика объектов исследования – антигипертензивных лекарственных средств группы иАПФ

Объектами исследования являются две стандартизованные АФС структуры пролина (пирролидин- α -карбоновая кислота) – гетероциклической аминокислоты (Рисунок 1) [27, 69].

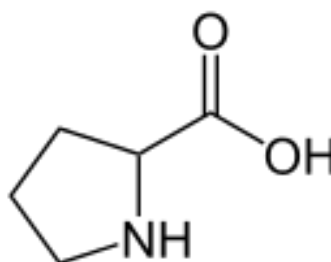


Рисунок 1 – Аминокислота пролин

Каптоприл ((2*S*)-1-[(2*S*)-2-Метил-3-сульфанилпропаноил]пирролидин-2-карбоновая кислота) является представителем антигипертензивных препаратов группы иАПФ. (Рисунок 2) [11, 25, 29].

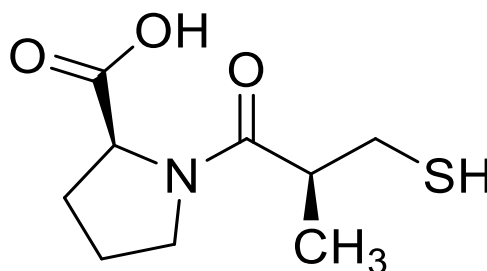


Рисунок 2 – Структурная формула Каптоприла

Каптоприл представляет собой белый или почти белый кристаллический порошок, растворимый в воде, легко растворимый в МХ и метаноле.

Эмпирическая формула: $C_9H_{15}NO_3S$

Молекулярная масса: 217,29

Температура плавления: 104-108 °С [11, 21, 29, 114].

Эналаприл в форме соли малеиновой кислоты (Эналаприла малеат) ((2*S*)-1-[(2*S*)-2-[(1*S*)-3-фенил-1-(этоксикарбонил)пропил]амино}пропаноил]пирролидин-2-карбоновой кислоты (2*Z*)-бут-2-ендиоат (1:1)) также является представителем группы препаратов понижающих давление путем ингибирования ангиотензинпревращающего фермента (Рисунок 3) [10, 25, 29].

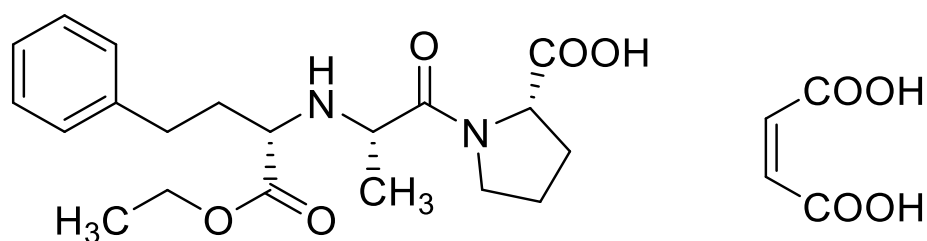


Рисунок 3 – Структурная формула Эналаприла малеата

Эналаприла малеат представляет собой белый или почти белый кристаллический порошок, умеренно растворимый в воде, растворимый в спирте 96%, легко растворимый в диметилформамиде и метаноле и практически нерастворимый в хлороформе.

Эмпирическая формула: $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_4O_4$

Молекулярная масса: 492,5

Температура плавления: 142-147 °С [10, 21].

Предположить преобладание основных или кислотных свойств у анализируемого вещества можно при помощи такого показателя как отрицательный десятичный логарифм для константы диссоциации кислоты (pK_a). Чем меньше значение pK_a , тем вещество является более кислотным и наоборот. Большинство веществ группы иАПФ содержат как центры-акцепторы протонов, так и центры-доноры протонов, которые могут быть протонированы или ионизированы соответственно. Каптоприл имеет приблизительное значение $pK_{a1}=3,38$ при диссоциации по карбоксильной группе, а при дополнительной диссоциации по тиоловой группе приблизительное значение $pK_{a2}=9,79$. Таким образом, при полной диссоциации Каптоприл ведет себя как слабое основание, проявляя еле заметные кислотные свойства. В свою очередь у Эналаприла, приблизительное значение $pK_{a1}=3,09$ при диссоциации по карбоксильной группе, а при дополнительной диссоциации по вторичной амино-группе приблизительное значение $pK_{a2}=5,38$.

Таким образом, при полной диссоциации Эналаприл объединяет в себе как слабые основанные, так и слабые кислотные свойства [81, 105, 114].

Из-за наличия в строении Каптоприла тиоловой группы, вещество проявляет восстановительные свойства, поэтому один из путей контроля качества ЛС Каптоприла основывается на использовании его восстановительных свойств [33]. Для Эналаприла окислительно-восстановительных способностей не отмечено.

Как Каптоприл, так и Эналаприл имеет в своем строении третичный атом азота, что позволяет использовать определение с применением общих алкалоидных осадительных реактивов (раствор йода в калия йодиде (KI_3) – реактив Бушарда, Вагнера, Люголя; раствор йодида висмута в калия йодиде $K[BiI_4]$ – реактив Драгендорфа и т.д.). Гидроксамовая проба позволяет обнаружить сложноэфирные связи в молекулах. Тиоловая группа Каптоприла за счет своих восстановительных свойств обеспечивает раствор йода. После осуществления щелочного гидролиза от молекулы Эналаприла отделяется этанол, который можно идентифицировать по йодоформной пробе. Наличие двойной связи малеиновой кислоты в молекуле Эналаприла малеата можно обнаружить по обесцвечиванию раствора калия перманганата (кислая среда) или раствора бромной воды [32-33].

1.4. Фармакологические свойства объектов исследования – антигипертензивных лекарственных средств группы иАПФ

Каптоприл и Эналаприла малеат относятся к ЛС группы иАПФ. Данная группа является одной из наиболее часто назначаемых при терапии АГ. Каптоприл и Эналаприла малеат находят применение в рамках медикаментозной терапии пациентов с АГ как при острых состояниях повышения АД, так и в рамках длительного лечения [28, 30-31, 79].

Своевременный индивидуальный подход и эффективная терапия пациента с АГ позволяют достигнуть ключевой цели, а именно минимизировать риски развития характерных осложнений и заболеваний систем организма [34, 68, 115]. Достижение необходимого уровня АД у пациентов с АГ может осуществляться как за счет монотерапии ЛС группы иАПФ, так и комбинацией классов антигипертензивных препаратов. Задача врача состоит в подборе терапии, которая будет стабилизировать и поддерживать АД в пределах целевых показателей на протяжении всей жизни пациента [55, 60, 89].

Стоит отметить, что одновременно с медикаментозным способом лечения специалисты используют подход немедикаментозной терапии. В ходе немедикаментозной терапии соизмеримо уменьшается необходимость применения антигипертензивных ЛС и одновременно

повышается эффективность лекарственной терапии [34, 44, 57, 67, 70, 73, 76, 84-85, 86, 92, 101, 107, 109, 115, 117].

Механизм действия иАПФ непосредственно связан с РААС. Основным ферментом РААС является ренин, синтезирующийся в эндотелии кровеносных сосудов разных тканей и юкстагломерулярном аппарате почек.

Ренин инициирует преобразование альфа-глобулина плазмы крови – ангиотензиногена (вырабатывается и секретируется печенью) в малоактивный АТ I. Далее в сосудах легких, почек и других тканей АПФ активирует АТ I и превращает его в сосудосуживающий АТ II, который, взаимодействуя с двумя подтипами рецепторов: АТ₁ и АТ₂. АТ II преимущественно связывается с подтипом рецепторов АТ₁, что, в зависимости от расположения рецепторов, приводит к вазоконстрикторному, провоспалительному, пролиферативному эффектам. Также АТ II стимулирует секрецию альдостерона и вазопрессина, которые, в конечном итоге, повышают АД [26, 58, 82, 112].

Исходя из описания механизма действия РААС, можно определить, что антигипертензивный эффект иАПФ связан с конкурентным ингибированием активности АПФ, что приводит к снижению скорости превращения АТ I в АТ II, и, как следствие, уменьшению концентрации и эффектов последнего.

Таким образом, терапия иАПФ, например, Каптоприлом или Эналаприлом, приводит к уменьшению содержания АТ II и ослаблению его многогранных вазоконстрикторных эффектов, что в конечном итоге существенно улучшает качество жизни пациентов с АГ [26-27].

1.5. Синтез субстанций Каптоприла и Эналаприла малеата

1.5.1. Синтез субстанции Каптоприла

Впервые Каптоприл был синтезирован сочетанием 3-ацетилтио- или 3-бензоилтио-2-R-метилпропановой кислоты или соответствующих ацилхлоридов любого соединения с L-пролином с последующим деацилированием продукта (Рисунок 4) [77].

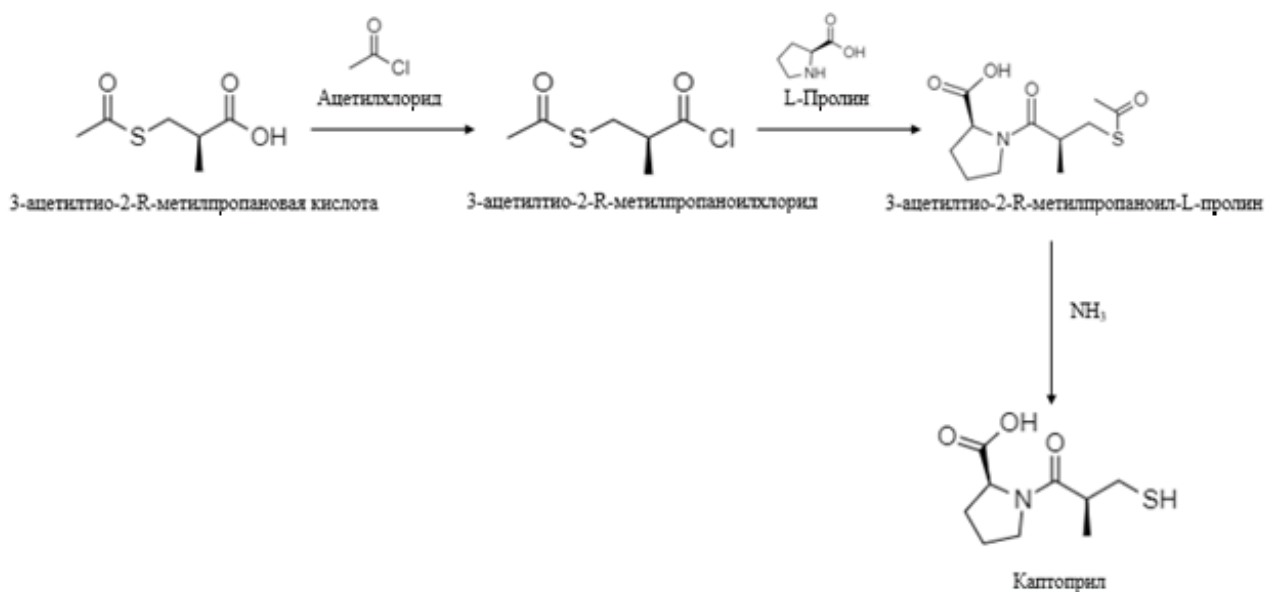


Рисунок 4 – Схема синтеза Каптоприла из 3-ацетилтио-2-*R*-метилпропановой кислоты

Были также предприняты попытки синтезировать каптоприл с использованием оптически активной 3-гидрокси-2-*R*-метилпропановой кислоты в качестве структурной молекулы боковой цепи, поскольку она имела такую же абсолютную конфигурацию и четырехуглеродное звено, что и меркаптоалканоильная боковая цепь каптоприла [106]. Это была первая попытка упрощенного синтеза каптоприла без оптического разделения или защиты тиоловой группы, исходя из микробиологически синтезированной оптически активной 3-гидрокси-2-*R*-метилпропановой кислоты. Весь процесс был выполнен в три этапа (Рисунок 5).

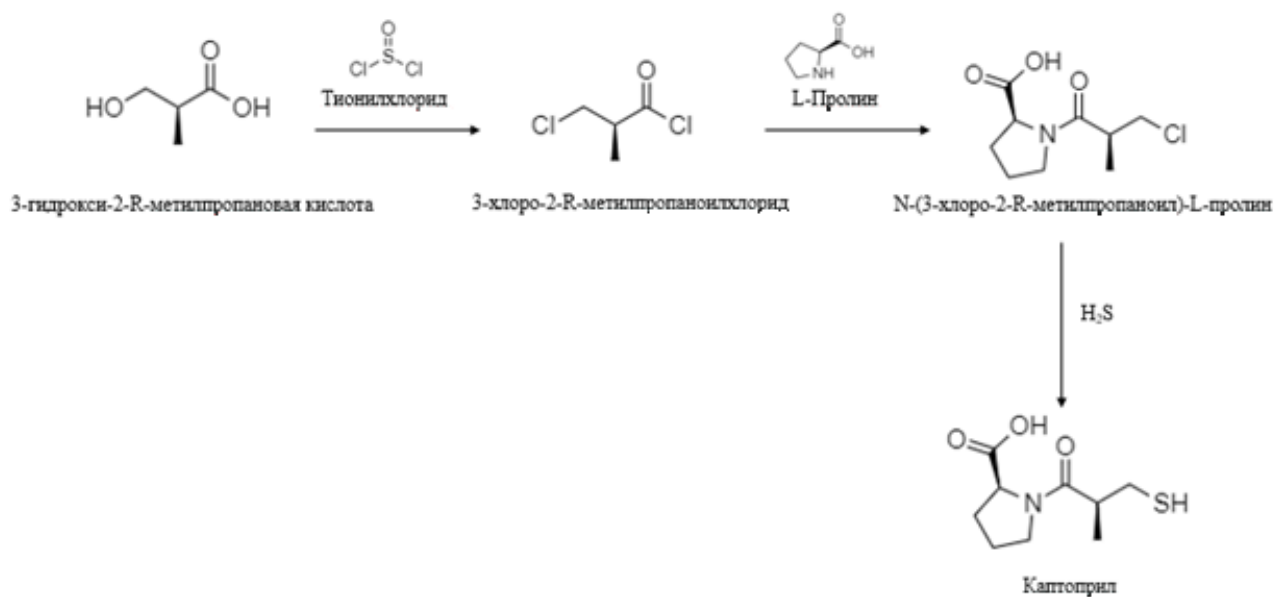


Рисунок 5 – Схема синтеза Каптоприла из 3-гидрокси-2-*R*-метилпропановой кислоты

Оптически активная 3-гидрокси-2-*R*-метилпропановая кислота превращалась в 3-хлоро-2-*R*-метилпропаноилхлорид путем взаимодействия с тионилхлоридом с растворителем или без

него в присутствии каталитического количества имидазола. Наивысший выход продукта, определенный с помощью ГХ, составил 88% с имидазолом (10,5 моль%) в качестве катализатора и CH_2Cl_2 в качестве растворителя. Хотя реакция могла происходить в отсутствие растворителя, использование инертных органических растворителей, таких как дихлорметан сделали реакцию управляемой.

Второй этап включал связывание 3-хлор-2-R-метилпропаноилхлорид с L-пролином с образованием N-(3-хлор-2-R-метилпропаноил)-L-пролина. Заключительный этап включал прямое замещение атома хлора в N-(3-хлор-2-R-метилпропаноил)-L-пролине тиоловой группой с получением Каптоприла. Это было достигнуто за счет сохранения стереохимии в N,N-диметилформамиде, ДМСО и, что примечательно, в воде с использованием сероводорода или тритиокарбонат-иона в качестве нуклеофильного реагента. Было обнаружено, что диапазон температур от 80 °C до 100 °C является подходящим для оптимального выхода конечного продукта реакций [88, 106].

В качестве альтернативы вышеописанному методу также можно использовать гидролиз 3-хлор-2-R-метилпропаноилхлорида с образованием 3-хлор-2-R-метилпропановой кислоты и последующей обработкой последней ионом гидросульфида, тиосульфата или тритиокарбоната, что дает возможность получить оптически активную 3-меркапто-2-R-метилпропановую кислоту. 3-меркапто-2-R-метилпропановую кислоту подвергают ацилированию обычными методами с получением 3-ацетилтио-2-R-метилпропановой кислоты или соответствующего тиобензоата. Затем получают Каптоприл реакцией любого из вышеперечисленных способов с L-пролином с последующим деацилированием (Рисунок 6) [77, 106].

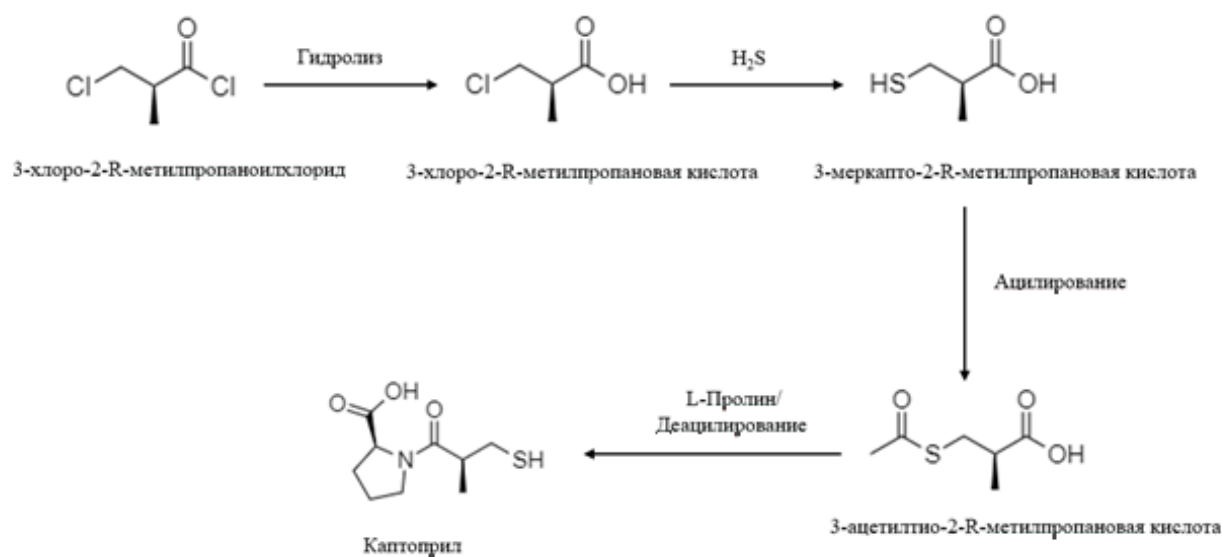


Рисунок 6 – Схема синтеза Каптоприла из 3-хлор-2-R-метилпропаноилхлорида

Синтез Каптоприла также можно инициировать путем стереоселективного гидролиза 3-ацетилтио-2-R-метилпропановой кислоты с помощью катализа внеклеточными липазами микробного происхождения. Среди различных оцениваемых липаз была липаза из клеток *Rhizopus oryzae* ATCC 24563 (высушенные нагреванием) и липаза PS-30 в системе органических растворителей (1,1,2-трихлор-1,2,2-трифторэтан или толуол), катализирующая протекающий гидролиз. Одним из продуктов на выходе реакции является желаемый оптически активный S - (-) энантиомер, который при взаимодействии с L-пролином и дальнейшим деацилированием образует Каптоприл (Рисунок 7) [54, 74, 98].

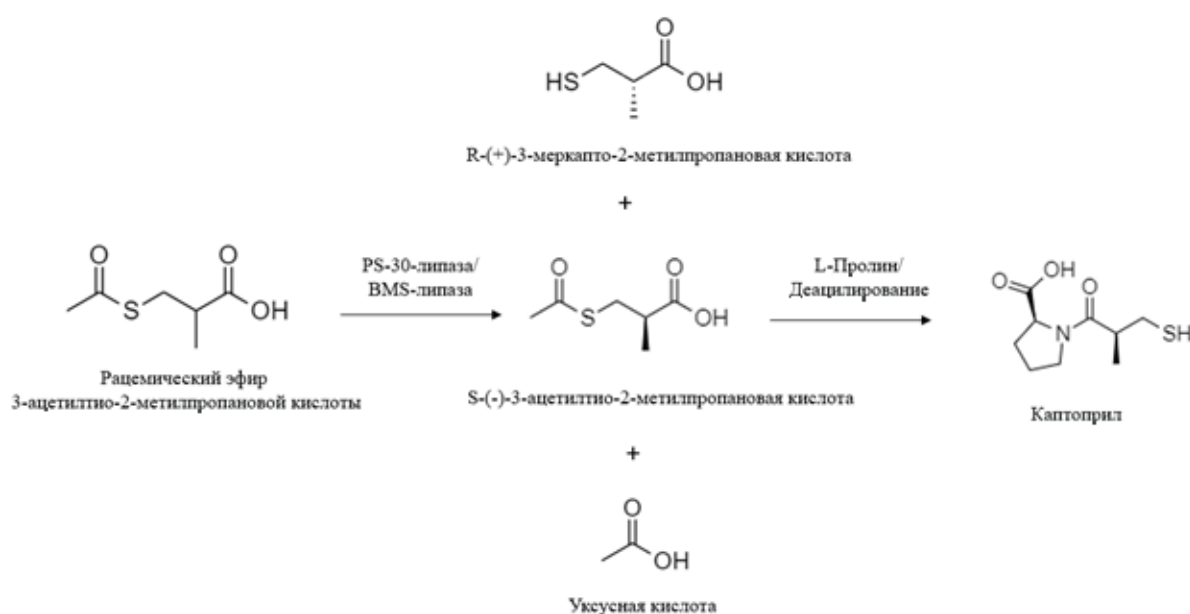


Рисунок 7 – Схема стереоселективного синтеза Каптоприла с использованием микробных липаз

Важной сырьевой базой для синтеза Каптоприла является S-β-ацетилтио-2-метилпропионовая кислота, была синтезирована из рацемического ацетилтио-2-метилпропионата ферментативным гидролизом с использованием клеток микроорганизмов (Рисунок 8).

В качестве продуцентов S-β-ацетилтио-2-метилпропионовой кислоты были выбраны микроорганизмы, обладающие асимметричной гидролитической активностью в отношении эфира S-формы рацемата и не имеющие активности в отношении сложного тиоэфира. После получения S-β-ацетилтио-2-метилпропионовой кислоты дальнейший синтез Каптоприла происходит путем взаимодействия с L-пролином и реакцией деацилирования тиоловой группы [102].

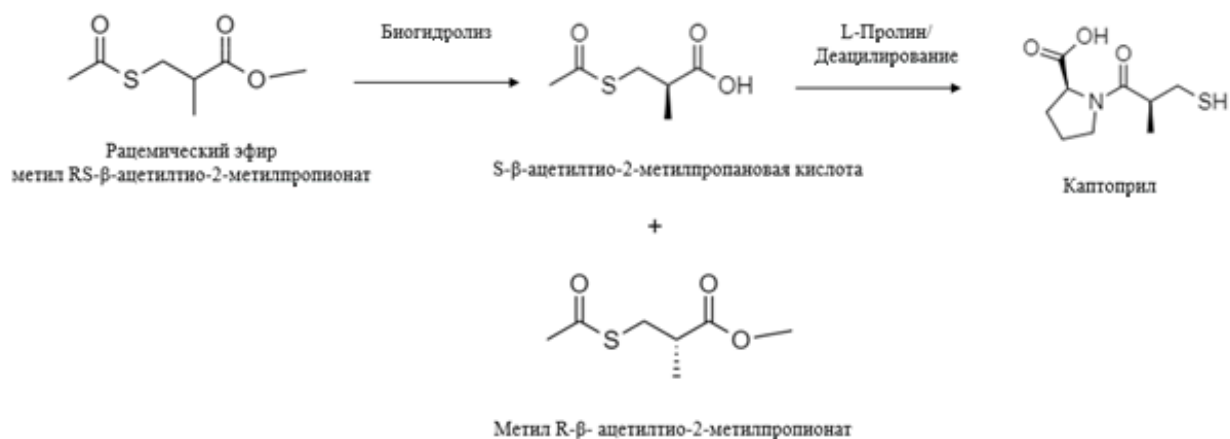


Рисунок 8 – Схема синтеза Каптоприла методом ферментативного разделения рацемического эфира на R- и S-энантиомеры

1.5.2. Синтез субстанции Эналаприла малеата

Синтез Эналаприла в форме соли малеиновой кислоты (Эналаприла малеата) осуществляется конденсированием этил-2-оксо-4-фенилбутаноата с L-аланил-L-пролином, дальнейшим восстановлением промежуточного продукта реакции и взаимодействием с малеиновой кислотой (Рисунок 9).

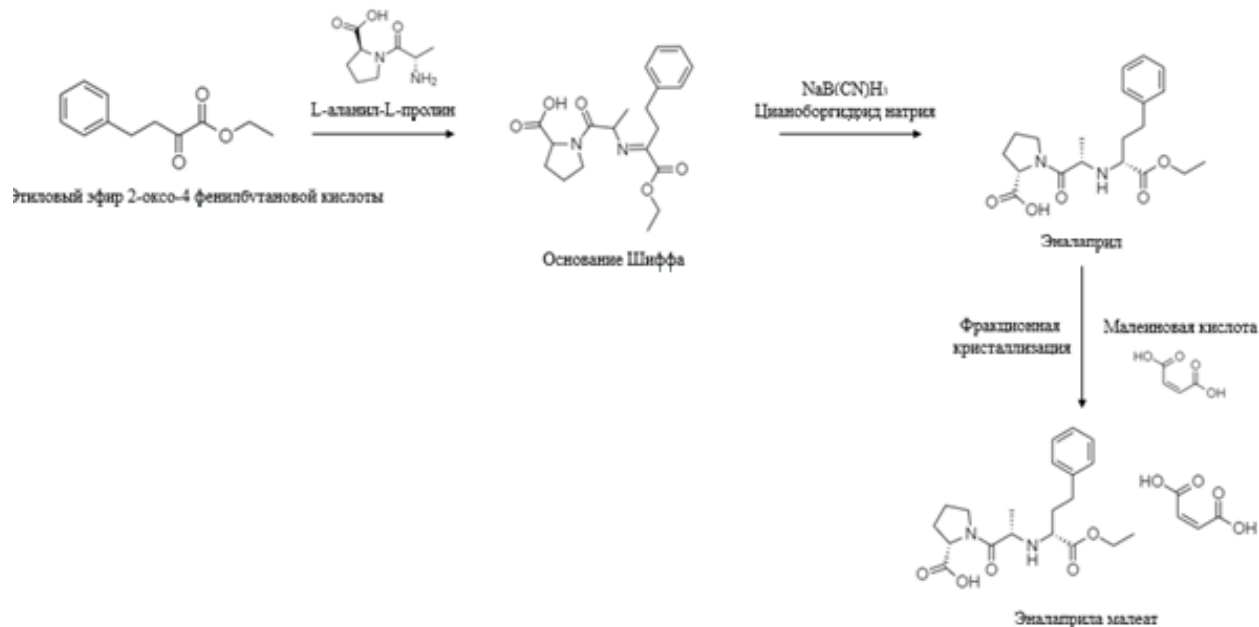


Рисунок 9 – Схема синтеза Эналаприла малеата конденсацией этил-2-оксо-4-фенилбутаноата с L-аланил-L-пролином

На первой стадии синтеза при взаимодействии этил-2-оксо-4-фенилбутаноата с L-аланил-L-пролином образовывалось основание Шиффа ((E)-(2-(1-этокси-1-оксо-4-фенилбутан-2-илиден) амино) пропаноил)-пролин), предположительно в виде смеси син- и антиизомеров. Восстановление имминой связи основания Шиффа с помощью цианоборгидрида натрия приводило к образованию смеси диастереомеров (SSS и RSS), в которой диастереомер SSS преобладал с небольшим отрывом. После добавления к смеси малеиновой кислоты более биологически активный диастереомер (SSS) выделяли фракционной кристаллизацией малеатных солей с получением Эналаприла малеата [48, 116].

Альтернативным методом получения Эналаприла малеата является восстановительное алкилирование этил-2-оксо-4-фенилбутаноата с L-аланином (Рисунок 10).

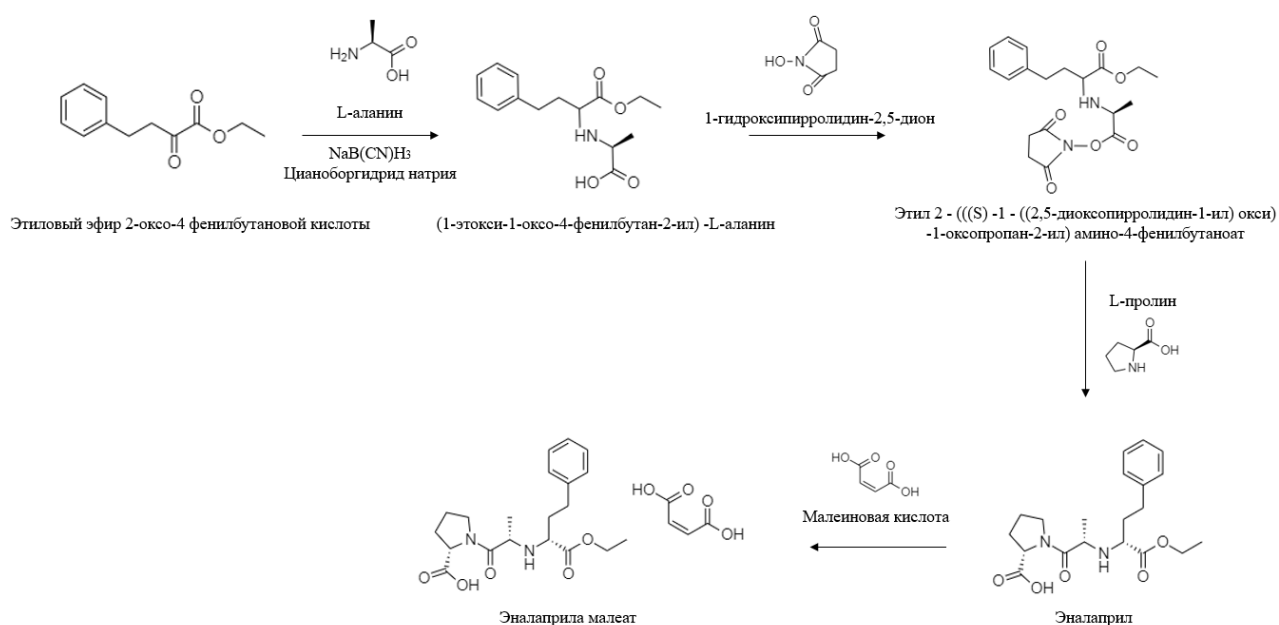


Рисунок 10 – Схема синтеза Эналаприла малеата восстановительным алкилированием этил-2-оксо-4-фенилбутаноата с L-аланином

В ходе первого этапа образуется смесь диастереомеров с относительно небольшим преобладанием SSS-стереомера перед RSS-стереомером. Последующие последовательные сочетания смеси с 1-гидрокси-2,5-диоксопирролидином и L-пролином образовывали диастереомерную смесь эналаприла, которую обрабатывали малеиновой кислотой с последующим выделением биологически активной формы эналаприла малеата [42].

1.6. Методы анализа соединений структуры пролина

По химической структуре Каптоприл и Эналаприл представляют собой соединения структуры пролина – гетероциклической аминокислоты [27, 69].

Используются разного рода методы для проведения количественного и качественного анализа соединений структуры пролина или соединений, содержащих родственную пролину остаток.

Использование ИК-спектроскопии рекомендуется специалистами для доказательства подлинности, в свою очередь, спектрофотометрическое определение в УФ области можно использовать как для количественного, так и для качественного анализа. Для некоторых производных пролина проводят предварительную дериватизацию соединений с целью применения оптических методов определения. ЯМР- и ПМР-спектроскопию, а также масс-спектрометрию используют при осуществлении исследований, доказывающих подлинность соединений. Для определения чистоты исследуемых веществ могут применяться такие способы элементного анализа, как ААС и АЭС [2, 5-8, 33, 40-41, 46-47, 49, 51, 61, 63-66, 71-72, 75, 78, 91, 99-100, 103, 108, 110-111].

Различные виды титрования подходят для количественного определения, качественные реакции помогают провести идентификацию исследуемого вещества [2, 8, 21, 43, 46, 49, 52, 62, 66, 75, 95, 110-111].

Флуорометрия находит место в количественном определении производных пролина. Ввиду способности некоторых соединений пролина вращать плоскость поляризации при прохождении через вещества поляризованного света, поляриметрический метод анализа находит свое применение в идентификации соединений и может использоваться в качестве метода количественного определения [8, 21, 49, 63, 66, 75, 97, 111, 113].

Еще одним возможным методом определения подлинности соединений структуры пролина является определение температуры плавления [8, 21, 49, 66, 110-111].

Различные хроматографические методы, такие как ВЭЖХ, ГХ, ТСХ или ВЭТСХ, могут применяться для оценки чистоты, качественной идентификации и количественного определения веществ. При этом в большинстве случаев необходимо использование СО соответствующих соединений. Наиболее частое применение среди вышеперечисленных анализов находит ВЭЖХ, комбинированная с МС [2, 5-6, 8, 18, 21, 24, 46-47, 49-50, 53, 56, 66, 75, 90, 94, 104, 110-111, 118].

Стоит отметить, что вышеперечисленные методы используются не только для установления параметров соединений структуры пролина в чистых субстанциях, но и непосредственно в лекарственных формах, где они находятся в виде монопроизводных или в комбинации нескольких активных компонентов, а также в биологических объектах (сыворотка, плазма, моча).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. В отечественной и международной фармацевтической практике основной тенденцией развития национальных фондов СО является расширение номенклатуры, а также повышение надежности методов контроля качества СО.

2. Определена актуальность использования ЛС группы иАПФ в лечении АГ. На основании изученных данных о наиболее частом врачебном назначении, эффективности и доступности ЛС, оказывающих гипотензивное действие, для проведения исследования с целью разработки СО были выбраны Каптоприл и Эналаприла малеат.

3. Изучение данных о физико-химических свойствах ЛС группы иАПФ (Каптоприл и Эналаприла малеат) позволило выработать единый подход к методам фармацевтического анализа, используемым для осуществления аттестации СО Каптоприла и Эналаприла малеата.

4. Проанализированы варианты синтеза исследуемых веществ. На основе приведенных данных можно предположить пути образования посторонних примесей и наличие остаточных органических растворителей в веществах.

5. На основании ранее опубликованных методик, описывающих анализ Каптоприла и Эналаприла малеата в различных объектах: АФС, ЛФ, биологических пробах – сделано заключение об эффективности применения ВЭЖХ с УФ-детектированием при определении посторонних примесей. В рамках определения остаточных органических растворителей сделано заключение об эффективности применения ГХ с пламенно-ионизационным детектированием.

6. Определен и изучен перечень документов, регламентирующих процессы создания, сертификации (аттестации) и контроля качества СО.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

Исходными объектами исследований настоящей диссертационной работы являлись три серии субстанции Каптоприла и три серии субстанции Эналаприла малеата, произведенные в Китайской Народной Республике, Индии и РФ (Таблица 2).

Таблица 2 – Сводная информация об исследуемых сериях субстанций лекарственных веществ

Каптоприл		
Страна производитель	Номер серии	Условное кодирование серии при осуществлении исследований
Китайская Народная Республика	1012020060047	1К
Индия	807112032	2К
РФ	1141021	3К
Эналаприла малеат		
Страна производитель	Номер серии	Условное кодирование серии при осуществлении исследований
Китайская Народная Республика	541220163	1Э
Индия	AE020448	2Э
РФ	103756	3Э

2.2. Оборудование

Характеристику физико-химических свойств исследуемых веществ Каптоприла и Эналаприла малеата, осуществление разработки методик с их последующей валидацией и воспроизведением, а также оценку научно-обоснованных норм качества СО осуществляли в лаборатории аналитических методов исследования ФБУ «ГИЛС и НП» и в научно-исследовательской лаборатории кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института Фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

При изучении спектральных характеристик веществ применяли ИК-Фурье спектрометр IRAffinity-1S (Shimadzu Corporation, Япония), ЯМР-спектрометр Bruker AVANCE III 400 MHz Ultra Shield Plus (Bruker, Германия).

При определении содержания воды методом Карла Фишера использовали титратор автоматический Mettler Toledo T5 (Mettler-Toledo GmbH, Швейцария).

При определении значений угла вращения использовали автоматическом поляриметре MCP 150 (Anton Paar Opto Tec GmbH, Германия).

При определении значений температуры плавления использовали прибор MP55 (Mettler-Toledo GmbH, Швейцария)

При установлении значений водородного показателя (pH) исследуемых растворов использовали pH-метр Mettler-Toledo Seven Compact S220 (Mettler-Toledo GmbH, Швейцария).

При проведении сушки и прокаливания использовали сушильный шкаф ED115 E2 Binder (Binder GmbH, Германия), вакуум-сушильный шкаф Binder VD115 (Binder GmbH, Германия), муфельную печь МИМП-3П (ЗАО МИУС, Россия).

Взвешивание веществ проводили на аналитических весах Mettler-Toledo XSR205DU/A (Mettler-Toledo GmbH, Швейцария).

Водоподготовка осуществлялась с помощью прибора Sartorius arium mini (Sartorius, Германия).

Растворение исследуемых веществ в соответствующих растворителях, а также проведение дегазации полученных растворов ультразвуком и их нагревание проводили с помощью ультразвуковой ванны Bandelin RK 102 H, Sonorex Super (Bandelin Electronic GmbH, Германия).

Центрифугирование растворов осуществляли с использованием медицинской лабораторной центрифуги ОПн-8 (ОАО ТНК Дастан, Киргизия).

Исследования методом ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США) с использованием хроматографических колонок XBridge BEH C18 (100мм×2,1мм×2,5мкм), НФ: органосиликатный аморфный октадецилсилильный эндкепированный полимер (Waters, США); μBondapak C18 (300мм×3,9мм×10мкм), НФ: органосиликатный аморфный октадецилсилильный эндкепированный полимер (Waters, США); Hamilton PRP-1 C18 (150мм×4,1мм×5мкм), НФ: стирол-дивинилбензолом октаде-цилсилильный сополимер (Phenomenex, США).

Анализ испытуемых веществ методом масс-спектрометрии осуществляли на жидкостном хроматографе Shimadzu Nexera LC 40 (Shimadzu Corporation, Япония) с использованием масс-спектрометрического детектора с обогреваемым электроспреем и квадрупольным масс-анализатором Shimadzu LCMS-8050 (Shimadzu Corporation, Япония) с программным обеспечением LabSolutions.

Определение посторонних примесей осуществляли на жидкостном хроматографе Shimadzu Nexera LC 40 (Shimadzu Corporation, Япония) с использованием детектора UV/VIS SPD-40 (Shimadzu Corporation, Япония) с программным обеспечением LabSolutions.

Исследования методом ГХ проводили на хроматографе Shimadzu GC-2010 Plus, который был оснащен пламенно-ионизационным детектором FID-2010 Plus (Shimadzu, Япония) и автоматическим устройством для анализа равновесной паровой фазы со шприцевым дозированием пробы Shimadzu Headspace, AOC-5000 Plus (Shimadzu, Япония), с программным обеспечением LabSolutions. Использовали хроматографические капиллярные колонки DB-624 (60м×0,32мм×1,80 мкм), НФ: 94 % диметилполисилоксан/6 % цианопропилфенил; DB-5 (25м×0,32мм×1,05мкм), НФ: (5%-фенил)-95% метилполисилоксан (Agilent Technologies, США),.

Для вакуумного фильтрования использовали вакуумный насос Rocker 300DC (Rocker Scientific Co., Ltd., Тайвань).

В ходе определений применялись также мембранные фильтры: Sartorius RC (0,45 мкм); Waters Supor PES (0,45 мкм); Labfil RC (0,45 мкм); Pall PTFE (0,45 мкм); Chromafil Xtra PTFE-45/25 (0,45 мкм).

Определение всех показателей и дальнейшую статистическую обработку полученных результатов проводили согласно ГФ РФ XIV издания [8].

2.3. Реактивы и стандартные образцы

При оценке растворимости исследуемых веществ применяли следующие растворители: метанол ($\geq 99,8$ %, Ultra gradient HPLC grade, J.T. Baker, Нидерланды), вода (III тип), метилхлорид ($\geq 99,70$ %, чистое вещество для хроматографии (СТХ), Экросхим, Россия), диметилформамид (химически чистый (хч), Экос-1, Россия), спирт этиловый 96% (Merck, Германия), этанол ($\geq 99,8$ %, чистое вещество для хроматографии (СТХ), Экросхим, Россия), хлороформ ($\geq 99,50$ %, чистое вещество для хроматографии (СТХ), Экросхим, Россия).

Для подготовки проб к анализу методом ИК-спектроскопии использовался калия бромид (≥ 99 %, IR grade, Acros Organics, Бельгия).

При определении параметров анализируемых веществ методом ЯМР-спектроскопии применяли дейтерированный хлороформ ($\geq 99,75$ %, NMR grade, Acros Organics, Бельгия) и дейтерированный диметилсульфоксид ($\geq 99,9$ %, Solvex-D, Россия)

В рамках хроматографического анализа методом ВЭЖХ использовали следующие химические вещества: вода очищенная, ацетонитрил ($\geq 99,9$ %, UV-IR-HPLC-ACS grade, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия), муравьиная кислота (98,0 %, for analysis, ACS, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия), раствор йода 0,05М (ГФ РФ XIV издания, ОФС.1.3.0001.15 «Реактивы. Индикаторы»), раствор натрия тиосульфата 0,1 М (ГФ РФ XIV издания, ОФС.1.3.0001.15 «Реактивы. Индикаторы»), ортофосфорная кислота (85%, for analysis, ACS, ISO, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия).

В процессе анализа методом ГХ использовали следующие химические вещества: ацетилхлорид ($\geq 99,0$ %, puriss. p.a., Sigma-Aldrich, США), этилацетат ($\geq 99,8$ %, HPLC grade, VWR, США), н-гексан ($\geq 97,0$ %, HPLC grade, VWR, США), ацетон ($\geq 99,9$ %, HPLC Plus, Sigma-Aldrich, США), этанол ($\geq 99,8$ %, чистое вещество для хроматографии (СТХ), Экросхим, Россия), диметилацетамид ($\geq 99,90$ %, HPLC grade, Biochem, Франция), метанол ($\geq 99,8$ %, Ultra gradient HPLC grade, J.T. Baker, Нидерланды), дихлорметан ($\geq 99,70$ %, чистое вещество для хроматографии (СТХ), Экросхим, Россия), бутилацетат (хч, АО «ЭКОС-1», Россия), пентафторпропионовый ангидрид ($\geq 99,0$ %, Sigma-Aldrich, США), натрия дигидрофосфат моногидрат (99,0 – 102,0 %, for analysis, ACS, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия), ортофосфорная кислота ($\geq 85,0$ %, for analysis, ACS, ISO, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия).

При определении сульфатной золы применяли серную кислоту концентрированную ($\geq 96,0$ %, for analysis, ISO, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия).

Для волюметрического определения содержания воды в исследуемых веществах методом Карла Фишера использовали HYDRANAL™ Titrant 5 и HYDRANAL™ Solvent (Honeywell, Германия)

Для оценки содержания посторонних примесей Каптоприла методом ВЭЖХ, в том числе при валидации разработанной методики, использовали СО примесей Каптоприла: В,С,Д,Е,Ж (EP CRS), а также сам СО Каптоприла (EP CRS). Для определения содержания примеси F в исследуемых образцах Каптоприла методом ГХ использовали СО Каптоприла для проверки пригодности системы, содержащий примесь F (EP CRS).

Для оценки содержания посторонних примесей Эналаприла методом ВЭЖХ, в том числе при валидации разработанной методики, использовали СО примесей Эналаприла: СО смеси примесей А (содержит примеси С и Н) (EP CRS), стандарт примеси G (EP CRS), СО Эналаприла для проверки пригодности хроматографической системы (содержащий примесь А) (EP CRS), а также сам СО Эналаприла малеата (EP CRS).

В рамках определения удельного вращения использовали этанол ($\geq 99,8$ %, чистое вещество для хроматографии (СТХ), Экросхим, Россия) и метанол ($\geq 99,8$ %, Ultra gradient HPLC grade, J.T. Baker, Нидерланды).

В рамках определения прозрачности и степени мутности (прозрачность), а также степень окраски (цветность) растворов, использовали воду (III тип), гидразина сульфат (for analysis, ACS, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия) и гексаметилентетрамин (for analysis, ACS, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия).

При определении содержания тяжелых металлов использовали воду (III тип), серную кислоту концентрированную ($\geq 96,0$ %, for analysis, ISO, Panreac Applichem, Испания, Германия,

Италия), натрия гидроксид (pure, pharma grade, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия), уксусную кислоту ледяную ($\geq 99,7$ %, for analysis, ACS, ISO, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия), ацетат аммония (for analysis, ACS, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия), свинца (II) нитрат (for analysis, ACS, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия), азотную кислоту концентрированную (69% (68%-70%) for analysis, ACS, ISO, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия), тиацетамид (for analysis, ACS, Panreac Applichem, Испания, Германия, Италия), натрия сульфид (pure, Acros Organics, Бельгия).

2.4. Используемые методики

В рамках разработки оригинальных хроматографических методик для анализа исследуемых образцов Каптоприла и Эналаприла методом ВЭЖХ по показателю «Посторонние примеси» были проанализированы и учтены данные из доступных разработанных методик, имеющих аналогичное или смежное применение [10-11, 39, 46, 56, 60, 77, 81, 87].

Применена методика определения Примеси F для фармакопейной субстанции Каптоприла из ГФ РФ XIV издания при хроматографическом определении Примеси F в исследуемых образцах Каптоприла методом ГХ.

Приготовление раствора метилирующего реактива, используемого для дальнейшего приготовления исследуемых растворов, осуществлялось следующим образом: к 17,2 мл безводного метанола при температуре 0 °С добавляли внимательно по каплям ацетилхлорид объемом 2,8 мл с последующим перемешиванием раствора. До того, как использовать раствор, его оставляли при комнатной температуре на 20 мин.

Приготовление испытуемого раствора осуществлялось следующим образом: 20,0 мг (точная навеска) субстанции помещали в пробирку и прибавляли 1,0 мл раствора метилирующего реактива. Полученный раствор перемешивали и нагревали при 60 °С в течение 30 мин, затем упаривали досуха в потоке азота. Растворение полученного остатка осуществляли в 0,5 мл этилацетата с последующим добавлением 0,5 мл пентафторпропионового ангидрида, полученный раствор перемешивали, нагревали при 60 °С в течение 30 мин и затем упаривали досуха в потоке азота. Растворение полученного остатка осуществляли в 1,0 мл бутилацетата.

Приготовление раствора сравнения А осуществляли следующим образом: содержимое флакона со СО Каптоприла для проверки пригодности системы и примесью F (((2S)-1-[(2R)-2-Метил-3-сульфанилпропаноил]пирролидин-2-карбоновая кислота) растворяли в 1,0 мл раствора метилирующего реактива. Обработывали полученный раствор по схеме, описанной для испытуемого раствора.

Приготовление раствора сравнения Б осуществляли следующим образом: смешивали

раствор сравнения А объемом 0,25 мл и бутилацетат объемом 0,75 мл.

Хроматографию испытуемого раствора и растворов сравнения А и Б объемом пробы по 1 мкл каждого из растворов осуществляли на хроматографической колонке из плавленного кварца (поли(диметил)(дифенил)силоксан) с размерами колонки 25 м × 0,32 мм × 1 мкм. Детектирование проводили с использованием пламенно-ионизационного детектора, в качестве ПФ применяли гелий для хроматографии (чистота 99,999) со скоростью потока 1,2 мл/мин. Ввод пробы с делением потока 1:20. Индивидуальные температурные значения колонки для хроматографии, детектора, а также инжектора выставляются согласно температурной программе методики (ГФ РФ, издание XIV, том III, ФС.2.1.01.06.18. Каптоприл, «Примесь F») [11].

ГЛАВА 3. АТТЕСТАЦИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ КАПТОПРИЛА

3.1. Проведение общефармакопейных испытаний исследуемых образцов Каптоприла

Проведено изучение образцов, предназначенных для создания СО, трех серий субстанции Каптоприла от разных производителей по следующим показателям: описание (внешний вид), растворимость в различных растворителях, прозрачность и цветность, температура плавления, удельное вращение, содержание воды, потеря в массе при высушивании, содержание тяжелых металлов, а также сульфатная зола. Результаты исследований позволили установить соответствующие нормы контроля качества СО.

3.1.1. Внешний вид

Все исследуемые образцы субстанции Каптоприла, предназначенные для создания СО, представляли собой белый или почти белый кристаллический порошок. Использовали визуальный метод определения и давали характеристику испытуемых образцов в соответствии с ГФ РФ XIV [8]. По итогам проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Описание» была установлена норма: белый или почти белый кристаллический порошок. Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

3.1.2. Растворимость

Изучение растворимости исследуемых образцов проводили в соответствии с ГФ РФ XIV [8].

Определяли растворимость в следующих растворителях: вода, метанол, этанол и МХ. Проанализированные серии субстанции исследуемых образцов Каптоприла, предназначенные для создания СО, растворимы в воде (от 10 до 30 мл растворителя на 1 г вещества) и легко растворимы в метаноле, этаноле и МХ (от 1 до 10 мл растворителя на 1 г вещества).

Предлагается определять растворимость при осуществлении контроля качества СО Каптоприла в следующих растворителях: вода (растворим), метанол, этанол и МХ (легко растворим). Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

3.1.3. Прозрачность и цветность

Прозрачность и степень мутности (прозрачность), а также степень окраски (цветность) растворов определяли в соответствии с ГФ РФ XIV [8].

Для каждой из трех серий субстанции проводили по шесть испытаний. Для оценки данных показателей из каждого испытуемого образца Каптоприла был приготовлен 2%-й водный раствор (0,2 г вещества на 10 мл воды).

Все приготовленные растворы СО Каптоприла являлись прозрачными относительно растворителя или не превышали опалесценцию (мутность) относительно свежеприготовленного эталона I, а также являлись бесцветными относительно растворителя. При проведении исследований не наблюдалось изменений вышеперечисленных показателей, что может указывать на постоянство состава СО.

По итогам проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Прозрачность» была установлена норма: 2%-й водный раствор вещества должен быть прозрачным.

По итогам проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Цветность» была установлена норма: раствор, полученный в испытании «Прозрачность», должен быть бесцветным. Установленные нормы подлежат включению в спецификацию СО.

3.1.4. Температура плавления

Изучение температуры плавления исследуемых образцов проводили в соответствии с ГФ РФ XIV капиллярным методом [8].

Предварительно высушенные испытуемые образцы субстанции подвергались плавлению в интервале 100 – 120° С. Скорость подъема температуры составляла 1°С в минуту. Каждый испытуемый образец субстанции Каптоприла четко и плавно переходил из твердого состояния в жидкое в пределах 1 – 2° С без видимых признаков разложения.

Для каждой из трех серий субстанции проводили по шесть испытаний, конечный результат определяли по среднему значению. Результаты испытаний представлены в Таблице 3. По итогам проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Температура плавления» была установлена норма: от 106,0° С до 108,0° С. Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

Таблица 3 – Температура плавления испытуемых образцов Каптоприла

№ серии	Температура плавления, ° С
1К	106,5 – 107,4
2К	106,1 – 107,8
3К	106,0 – 107,9

3.1.5. Удельное вращение

Анализ структуры Каптоприла позволил установить наличие двух хиральных центров, что может определять оптическую активность вещества. По этой причине рационально проводить определение удельного вращения растворов исследуемых образцов.

Проводили определение и рассчитывали удельное вращение для 1%-го раствора исследуемых образцов Каптоприла в этаноле безводном в соответствии с ГФ РФ XIV в пересчете на сухое вещество [8].

Для каждой из трех серий субстанции проводили по шесть испытаний, конечный результат определяли по среднему значению. Результаты испытаний представлены в Таблице 4. По итогам проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Удельное вращение» была установлена норма: от $-131,0^{\circ}$ до $-128,0^{\circ}$ в пересчете на сухое вещество для 1%-го раствора вещества в этаноле безводном. Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

Таблица 4 – Удельное вращение испытуемых образцов Каптоприла

№ серии	Удельное вращение ($\pm \sigma$), °
1К	$-129,6 \pm 0,5$
2К	$-129,2 \pm 0,5$
3К	$-128,5 \pm 0,5$

3.1.6. Содержание воды

В рамках определения чистоты в исследуемых образцах Каптоприла устанавливали содержание воды в соответствии с ГФ РФ XIV на приборе для титрования по методу К. Фишера [8].

Для каждой из трех серий субстанции проводили по шесть испытаний, конечный результат определяли по среднему значению. Результаты тестирования представлены в Таблице 5. В результате проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Содержание

воды» была установлена норма: не более 0,05%, которая подлежит включению в спецификацию СО.

Исследование данного показателя и его дальнейшее включение в перечень норм контроля качества СО Каптоприла обусловлено актуальными требованиями ведущих фармакопей.

Таблица 5 – Содержание воды в испытуемых образцах Каптоприла

№ серии	Содержание воды ($\pm \sigma$), %
1К	0,010 \pm 0,001
2К	0,031 \pm 0,001
3К	0,011 \pm 0,001

3.1.7. Сульфатная зола

В рамках определения чистоты в исследуемых образцах Каптоприла устанавливали содержание сульфатной золы в соответствии с ГФ РФ XIV [8].

Исследование для каждой из трех серий субстанции проводили в шести повторностях, конечный результат определяли по среднему значению. Результаты испытаний представлены в Таблице 6. Для контроля качества СО по показателю «Сульфатная зола» была установлена норма: не более 0,1%. Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

Таблица 6 – Содержание сульфатной золы в испытуемых образцах Каптоприла

№ серии	Содержание сульфатной золы ($\pm \sigma$), %
1К	0,069 \pm 0,002
2К	0,085 \pm 0,002
3К	0,063 \pm 0,002

3.1.8. Потери в массе при высушивании

В рамках определения чистоты в исследуемых образцах Каптоприла устанавливали потерю в массе при высушивании гравиметрическим методом в соответствии с ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании», способ 3 [8]. Высушивание около 1 г вещества (точная навеска) проводили в вакуум-сушильном шкафу на протяжении 3 часов при постоянной температуре 60° С при значении остаточного давления не выше 20 мм. рт. ст.

Для каждой из трех серий субстанции проводили по шесть испытаний, конечный результат определяли по среднему значению. Результаты испытаний представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Потеря в массе при высушивании испытуемых образцов Каптоприла

№ серии	Потеря в массе при высушивании ($\pm \sigma$), %
1К	0,032 \pm 0,001
2К	0,095 \pm 0,002
3К	0,034 \pm 0,001

3.1.9. Тяжелые металлы

В рамках определения чистоты в исследуемых образцах Каптоприла устанавливали содержание тяжелых металлов. Испытание проводили на зольном остатке, который был получен после сжигания 1,0 г каждого испытуемого образца, по методу 2 с использованием эталонного раствора 2 в соответствии с ГФ РФ XIV [8].

Исследование для каждой из трех серий субстанции проводили в шести повторностях. Результаты испытаний представлены в Таблице 8. По итогам проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Тяжелые металлы» была установлена норма: не более 0,002%. Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

Таблица 8 – Содержание тяжелых металлов в испытуемых образцах Каптоприла

№ серии	Содержание тяжелых металлов, %
1К	$\leq 0,002$
2К	$\leq 0,002$
3К	$\leq 0,002$

3.2. Комплексный подход к оценке спектральных характеристик для проведения идентификации исследуемых образцов Каптоприла

Для оценки спектральных характеристик исследуемых образцов были выбраны следующие методы: ИК-спектроскопия, Масс-спектрометрия (с конкретным типом ионизации), ЯМР-спектроскопия (^1H , ^{13}C). Совместное применение таких методик, как ИК-, ЯМР-спектроскопия и Масс-спектрометрия, позволило провести комплексную и надежную идентификацию анализируемых образцов и использовать данные методы в последующем контроле качества СО, что несомненно будет гарантировать качество производимой продукции и ее пригодность для выполнения поставленных задач.

3.2.1. ИК-спектроскопия

При изучении спектральных характеристик исследуемых образцов в области от 4000 см^{-1} до 400 см^{-1} применяли ИК-Фурье спектрометр IRAffinity-1S (Shimadzu Corporation, Япония) с программным обеспечением LabSolutions IR. Осуществляли приготовление смеси в соотношении 1-3 мг исследуемого образца вещества на 150-200 мг инертного наполнителя (калия бромид) с последующим прессованием в форму диска, по три образца каждой серии субстанции [35]. Испытания проводили согласно основным принципам изложенным в ГФ РФ XIV [8].

Типичный ИК-спектр исследуемых образцов Каптоприла изображен на Рисунке 11.

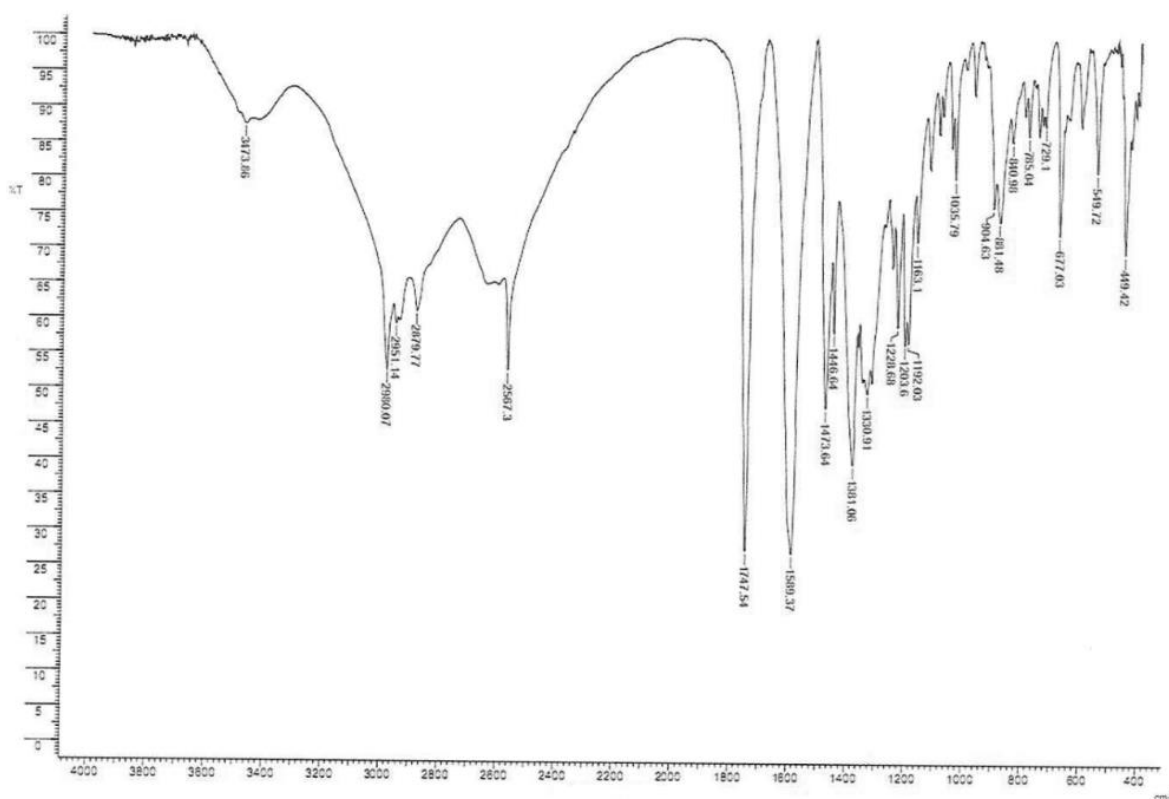


Рисунок 11 – Типичный ИК-спектр исследуемых образцов Каптоприла

Валентные колебания С-Н связей метиленовых, метиновых, а также метильных групп в соединении соотносились с полосами поглощения при $2980\text{--}2880\text{ см}^{-1}$. Валентные колебания связи -ОН в карбоксильной группе (-COOH) соединения соотносились с полосой поглощения, которая находилась в области от 3474 см^{-1} до 2567 см^{-1} , в свою очередь, деформационные колебания этой же связи в карбоксильной группе (-COOH) соотносились со среднеинтенсивной широкой полосой в области 881 см^{-1} . Полоса поглощения характерная для валентной связи в тиоловой группе (S-H) находилась при 2567 см^{-1} , а валентные колебания связи C-S соотносились с полосой поглощения при значении 729 см^{-1} .

Валентные колебания связей С=О для карбоксильной группы соотносились с полосой поглощения в области 1748 см^{-1} , а для амидной группы в области 1589 см^{-1}

Связи в метиленовых группах (С-Н) находились в состоянии деформационных симметричных колебаний, что определяло полосу в области 1474 см^{-1} . Деформационные антисимметричные и симметричные колебания связей С-Н метильной группы соотносились с полосами поглощения в областях рядом со значениями 1447 см^{-1} и 1331 см^{-1} . Полоса поглощения в области 1381 см^{-1} соотносилась с деформационными колебаниями в связи С-ОН. Полосы поглощения при 677 см^{-1} были характерны для плоскостных колебаний деформационного типа для связей С-Н в метиленовых группах [35].

В Таблице 9 показано соотношение значений полос поглощения ИК-спектра для исследуемых образцов.

Таблица 9 – Отнесение полос поглощения в ИК-спектрах исследуемых образцов Каптоприла

Максимумы полос поглощения деформационных (d) (d_s - симметричных, d_{as} - антисимметричных), плоскостных деформационных (r), а также валентных (n) колебаний, см^{-1}
3474-2567 (nO-H, -COOH), 2980-2880 (nC-H, -CH ₃ , -CH ₂ , -CH), 2567 (nS-H, -SH), 1748 (nC=O, -COOH), 1589 (nC=O, NC=O), 1474 (d_s C-H, -CH ₂), 1447 (d_{as} C-H, -CH ₃), 1381 (dC-OH, -COOH), 1331 (d_s C-H, -CH ₃), 1192 (nC-N, -C-N-), 881 (dO-H, -COOH), 729 (nC-S, -C-SH), 677 (rC-H, -CH ₂)

Все снятые ИК-спектры исследуемых образцов подтверждали химическое строение Каптоприла. Метод ИК-спектроскопии подлежит включению в раздел «Подлинность» спецификации СО. ИК-спектр СО Каптоприла должен совпадать с предложенным ИК-спектром и не должен противоречить химической структуре Каптоприла [35].

3.2.2 ЯМР-спектроскопия

Для осуществления анализа методом ЯМР-спектроскопии готовили рабочие растворы с концентрацией около 50 ммоль/л. Каждый исследуемый образец Каптоприла массой около 10 мг растворяли в 1 мл дейтерированного хлороформа, затем растворенный образец помещали в стеклянную ампулу для осуществления анализа методом ЯМР-спектроскопии.

Снятие и обработка ^1H и ^{13}C спектров испытуемых растворов проводились на спектрометре Bruker AVANCE III 400MHz Ultra Shield Plus при помощи программного обеспечения TopSpin. ЯМР-спектр ^1H снимали на частоте 400 МГц, в то время как ЯМР-спектр ^{13}C – на частоте 100 МГц [35].

Каждую из трех серий субстанции исследовали в трех повторностях. Анализ осуществляли согласно основным принципам изложенным в ГФ РФ XIV [8].

Проводилось соотнесение полученных сигналов ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров (Таблица 10) со структурой исследуемого образца согласно порядковой нумерации атомов в молекуле (Рисунок 12).

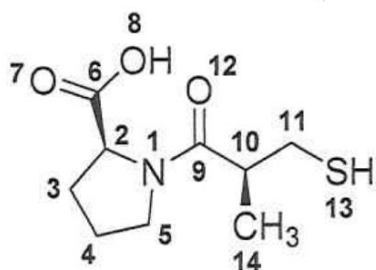


Рисунок 12 – Номерное отнесение атомов в молекуле Каптоприла

Довольно непростая картина ^1H ЯМР-спектра (Рисунок 13) определялась присутствием двух стереогенных центров в веществе. При тщательном рассмотрении полученного спектра, ввиду затрудненного вращения рядом со стерически загруженной амидной связью *OC9-N* присутствовали сигналы, которые подвергались разделению на две группы (обусловленные наличием в растворе образца двух заторможенных конформеров): основные (высокое отношение сигнала к шуму, интенсивные), минорные (судя по относительным интегральным интенсивностям сигналов в соотношении 0,93:0,07). Стоит отметить, что данное раздвоение достаточно хорошо различимо только на сигналах, которые принадлежали протонам, находящимся рядом со стереогенным центром. Чаще всего у двух конформеров отличие сдвигов химических сигналов протонов незначительны и почти незаметны, в связи с этим проведен анализ сигналов только основного конформера.

Дублет с КССВ $J = 6,7$ Гц при 1,19 м.д. соответствовал протонам метильной группы. Протоны *SH* группы наблюдались в форме триплета с КССВ $J = 8,7$ Гц при 1,55 м.д.. Мультиплеты в таких диапазонах, как 3,55 - 3,72 м.д. и 4,49 - 4,67 м.д. с с относительными интегральными интенсивностями 2 и 1 можно было соотнести с протонами при атомах вещества *C5* и *C2* соответственно. Уширенный синглет со значением 11,52 м.д. четко соотносился с *OH* группой [35].

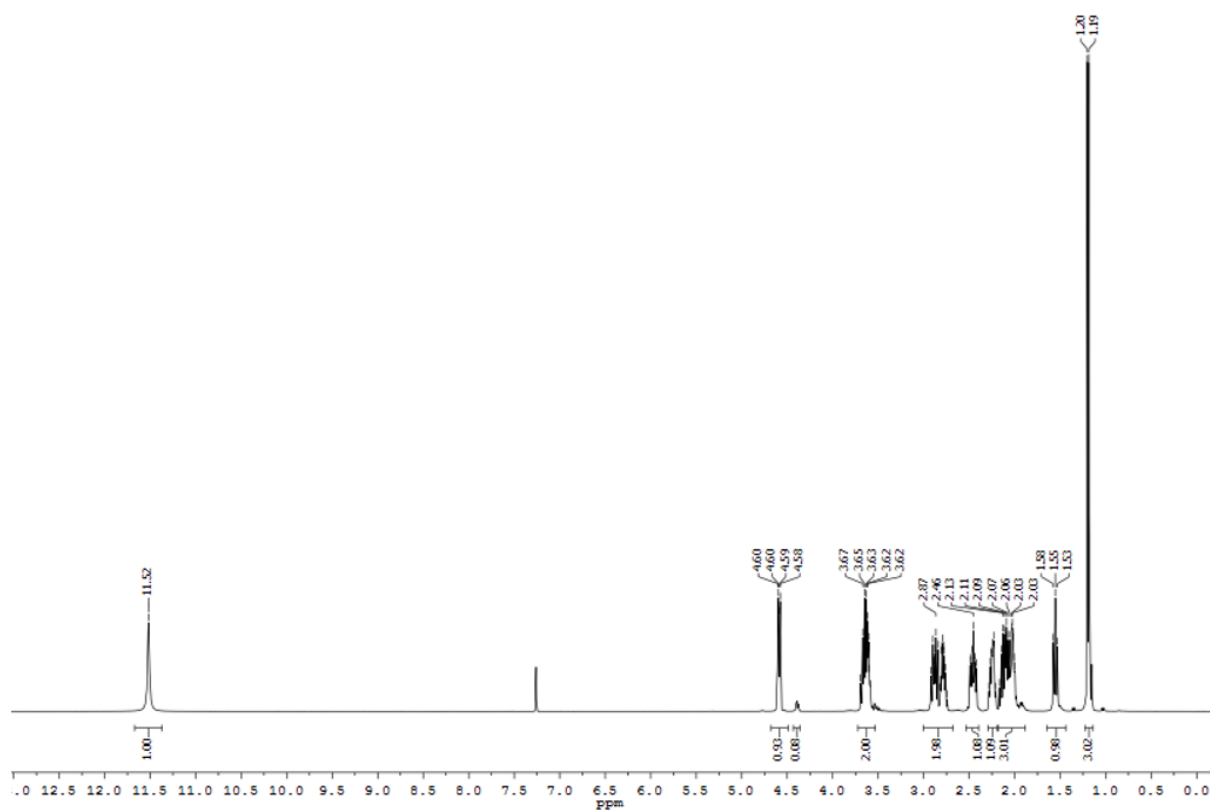


Рисунок 13 – ^1H ЯМР-спектр анализируемого образца Каптоприла

При рассмотрении ^{13}C ЯМР-спектра, который представлен на Рисунке 14, описаны лишь сигналы основного конформера [35].

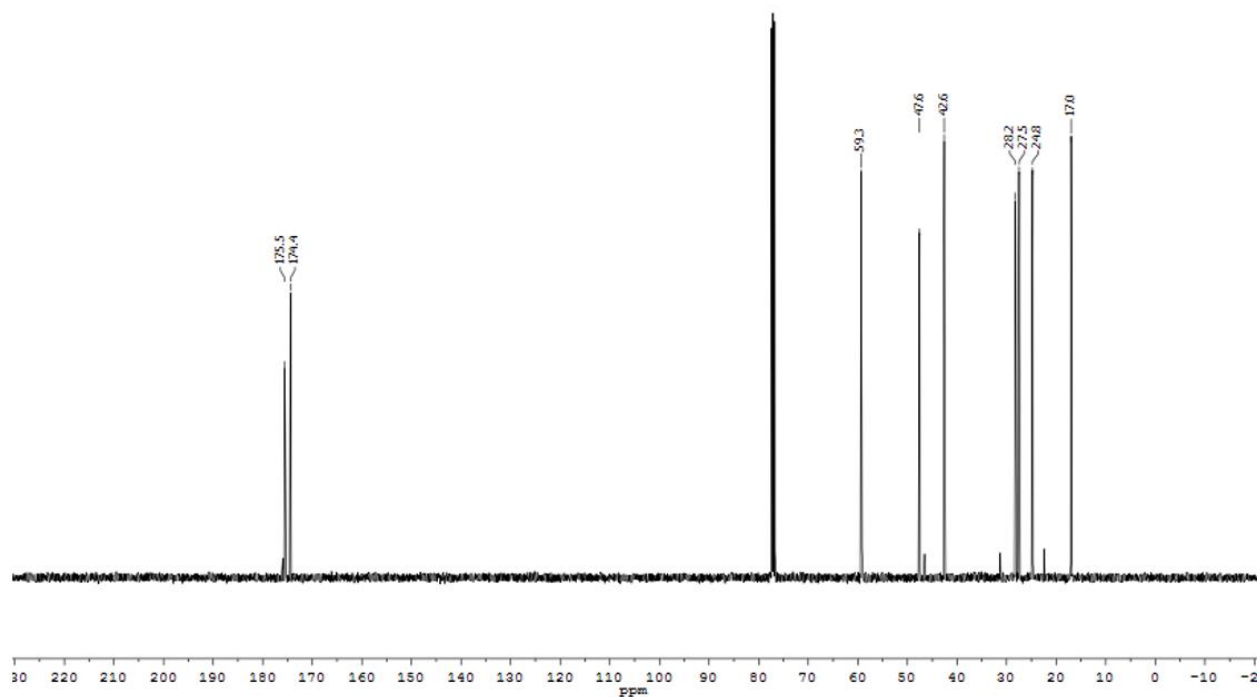


Рисунок 14 – ^{13}C ЯМР-спектр анализируемого образца Каптоприла

Количество выявленных сигналов в ^{13}C ЯМР-спектре около двух раз превосходило число магнитно-неэквивалентных атомов углерода вещества.

Данная картина определялась присутствием в анализируемом растворе двух заторможенным конформеров в результате затрудненного вращения рядом со стерически загруженной амидной связью *OC9-N*. В связи с этим проведен анализ сигналов только основного конформационного изомера.

Углерод метильной группы соответствовал сигналу в области 17,0 м.д.

Карбоксильные атомы *C9* и *C6* вещества были соотнесены с сигналами в областях 174,4 м.д. и 175,5 м.д. соответственно. Стоит отметить, что оставшиеся несоотнесенные атомы углерода не получилось точно соотнести с другими сигналами на полученном спектре, но количество сигналов было соразмерно несоотнесенному числу магнитно-неэквивалентных атомов углерода, и показатели химических сдвигов не говорили о противоречии химической структуре исследуемого вещества (Таблица 10) [35].

Таблица 10 – Описание и отнесение сигналов в ЯМР-спектрах ^1H и ^{13}C исследуемых образцов Каптоприла

Наименование ЯМР-спектра Каптоприла	Химический сдвиг (d, м.д.) с мультиплетностью в виде дублета (д), мультиплета (м), т-триплета (т), уширенного синглета (уш. с.), КССВ (J, Гц)
^1H	1,19 д (3H, CH ₃ , J 6,7 Гц), 1,55 т (1H, SH, J 8,7 Гц), 1,96 - 2,18, 2,19 - 2,30, 2,40 - 2,53, 2,72 - 2,96 м (7H, протоны при C3, C4, C10, C11), 3,55 - 3,72 м (2H, протоны при C5), 4,49 - 4,67 м (1H, протон при C2), 11,52 уш. с. (1H, COOH)
^{13}C	17,0 (CH ₃), 24,8 (C3), 27,5 (C4), 28,2 (C11), 42,6 (C10), 47,5 (C5), 59,3 (C2), 174,4 и 175,5 (C6 и C9)

Все полученные ^1H и ^{13}C ЯМР-спектры исследуемых образцов подтверждали химическое строение Каптоприла. Метод ЯМР-спектроскопии подлежит включению в раздел «Подлинность» спецификации СО. Положение и мультиплетность сигналов ЯМР-спектров ^1H и ^{13}C СО Каптоприла должны совпадать с предложенными ЯМР-спектрами ^1H и ^{13}C и не должны противоречить химической структуре Каптоприла [35].

3.2.3 Масс-спектрометрия

Проведение масс-спектрометрического анализа растворов с рабочими концентрациями 0,01 мг/мл осуществляли на жидкостном хроматографе Shimadzu Nexera с использованием масс-селективного детектора Shimadzu LCMS-8050. Для образования ионов с отрицательным и

положительным зарядом применялась химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). Исследованию подвергалась каждая серия субстанции в количестве трех образцов [37].

В Таблицах 11 и 12 описаны условия хроматографирования и детектирования при проведении идентификации исследуемых образцов Каптоприла. Информация о градиентной программе элюирования представлена в Таблице 13 [37].

Анализ осуществляли согласно основным принципам изложенным в ГФ РФ XIV [8].

Таблица 11 – Условия хроматографирования для растворов исследуемых образцов Каптоприла

Параметр	Условия
Прибор	Жидкостной хроматограф высокого давления
Колонка	2,5 мкм, 2,1 × 100 мм, XBridge ВЕН C18, (Waters, США)
Температура колонки	40 °С
Подвижная фаза	Смесь растворов А и Б
Скорость потока	0,3 мл/мин
Объем анализируемой пробы	5,0 мкл
Тип элюирования	Градиентный

Таблица 12 – Условия детектирования для исследуемых образцов Каптоприла

Параметр	Условия
Тип детектора	Масс-селективный
Тип ионизации	APCI
Температура интерфейса	350 °С
Режим сканирования	Полный ионный ток
Скорость сканирования	0,1 с
Диапазон сканирования	100-1000 m/z

Таблица 13 – Описание градиентной программы элюирования в масс-спектрометрическом анализе СО Каптоприла

Степень, №	Время, мин	Раствор А, %	Раствор Б, %	Режим
1	0	90	10	Изократический (Предварительное уравнивание колонки)
2	1	90	10	Изократический
3	10	5	95	Линейный градиент

Продолжение Таблицы 13

4	13	5	95	Изократический
5	14	90	10	Линейный градиент
6	17	90	10	Изократический (Уравновешивание колонки)

ПФ состояла из смеси раствора А и Б. Раствор А готовили, помещая 1,0 мл муравьиной кислоты в мерную колбу вместимостью 1 л, предварительно наполненную небольшим количеством воды I типа. Конечный объем раствора доводили водой I типа до метки, затем фильтровали с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм и осуществляли дегазацию ультразвуком. Для приготовления раствора Б фильтровали ацетонитрил с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм с последующей дегазацией ультразвуком. Растворитель представлял собой смесь ацетонитрила и воды I типа в соотношении к объемам 70:30.

Приготовление растворов исследуемых образцов для снятия масс-спектров осуществляли следующим образом: около 0,025 г испытуемого образца растворяли в растворителе в мерной колбе вместимостью 50 мл. Конечный объем раствора доводили растворителем до метки и фильтровали с помощью мембранного фильтра PTFE 0,45 мкм. Помещали 1,0 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 50 мл, перемешивали и доводили до метки растворителем [37].

При обработке полученного масс-спектра, снятого по типу положительной ионизации (APCI⁺), был определен основной пик молекулярного иона по отношению массы к заряду (m/z): $[M+H]^+ = 218 m/z$ (Рисунок 15). Полученное значение оказалось аналогичным теоретически рассчитанному. Фрагментация основного молекулярного иона на тандемном спектре показывала присутствие следующих ионов: $172 m/z$ ($C_8H_{14}NOS^+$), $116 m/z$ ($C_5H_{10}NS^+$), $75 m/z$ ($C_3H_7S^+$), $70 m/z$ ($C_4H_8N^+$) (Рисунок 16). Согласно полученным результатам была предложена вероятная схема процесса фрагментации соединения (Рисунок 17) [37].

При обработке полученного масс-спектра, снятого по типу отрицательной ионизации (APCI⁻), был определен основной пик молекулярного иона по отношению массы к заряду (m/z): $[M-H]^- = 216 m/z$ (Рисунок 18). Полученное значение оказалось аналогичным теоретически рассчитанному. Фрагментация основного молекулярного иона на тандемном спектре показывала присутствие следующих ионов: $182 m/z$ ($C_9H_{12}NO_3^-$), $138 m/z$ ($C_8H_{12}NO^-$), $126 m/z$ ($C_7H_{12}NO^-$), $114 m/z$ ($C_5H_8NS^-$) (Рисунок 19). Согласно полученным результатам была предложена вероятная схема процесса фрагментации соединения (Рисунок 20) [37].

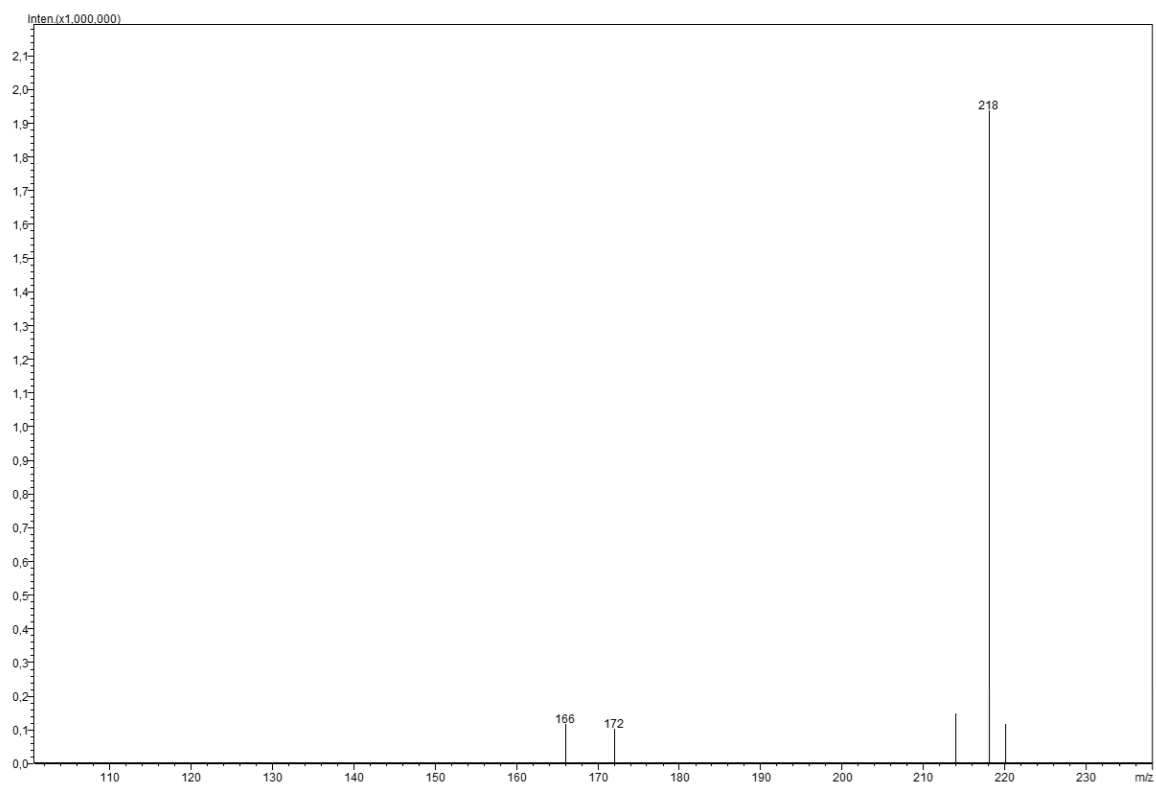


Рисунок 15 – Масс-спектр анализируемого образца Каптоприла (ВЭЖХ-МС, АРСІ⁺)

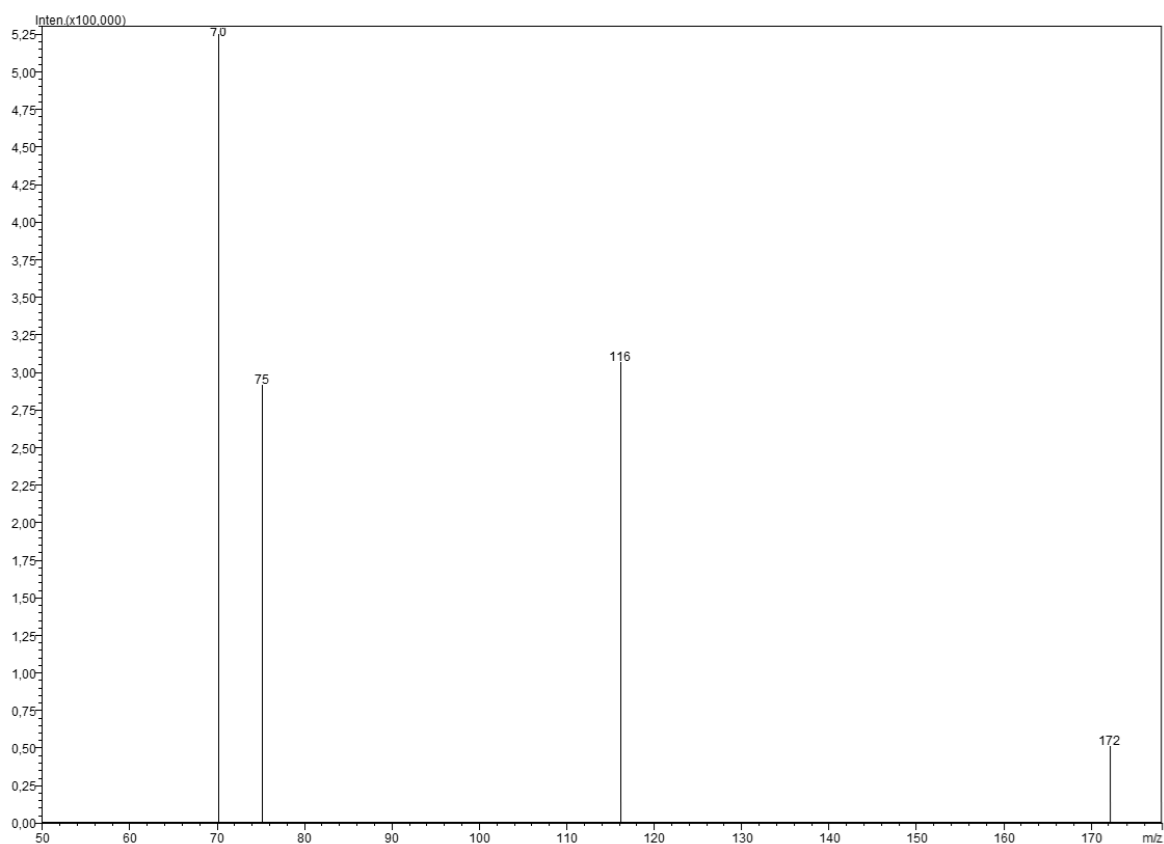


Рисунок 16 – Фрагментации молекулярного иона $[M+H]^+ = 218 m/z$ анализируемого образца Каптоприла (ВЭЖХ-МС, АРСІ⁺)

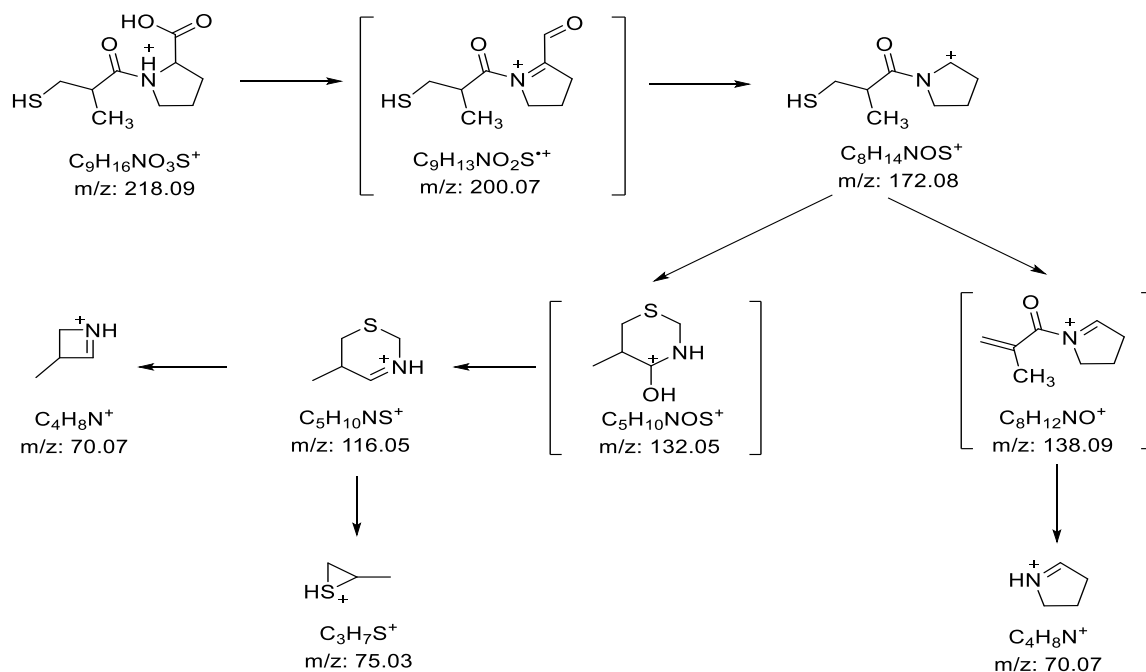


Рисунок 17 – Модель фрагментации основного молекулярного иона $[M+H]^+ = 218$ m/z анализируемого образца Каптоприла (ВЭЖХ-МС, АРСІ⁺)

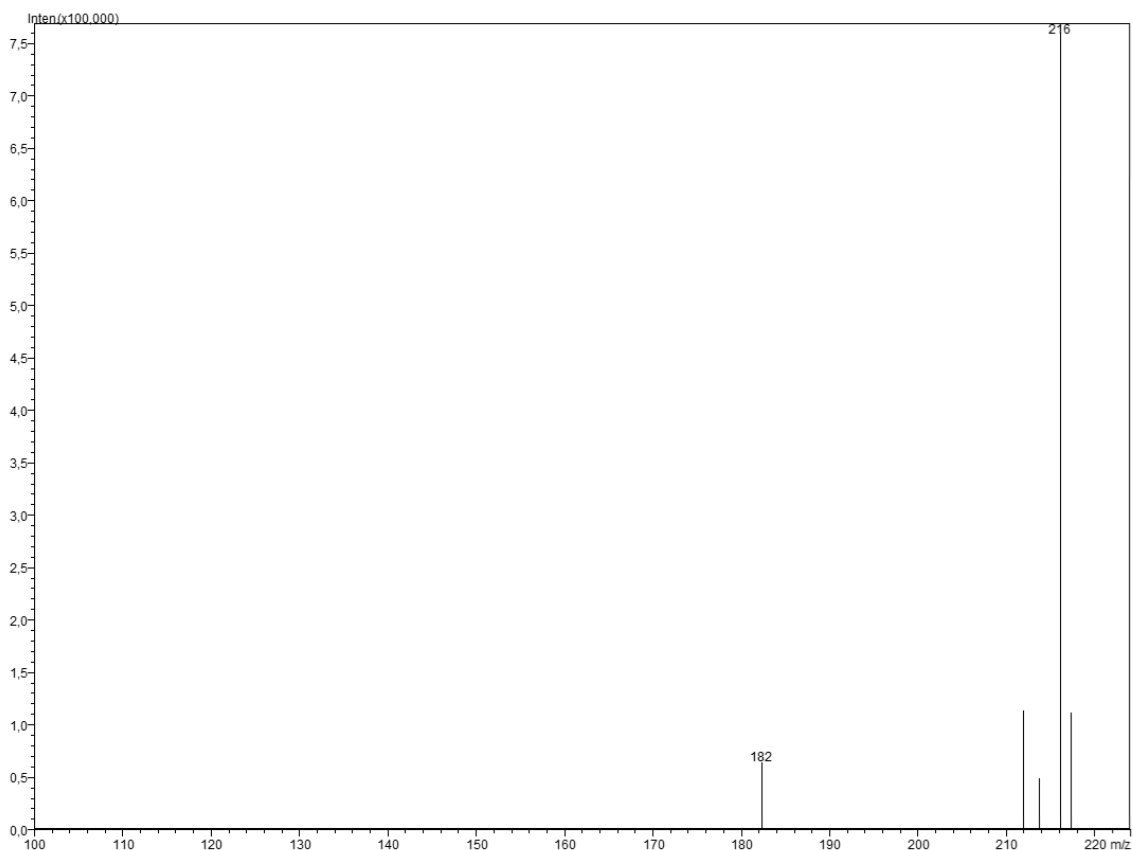


Рисунок 18 – Масс-спектр анализируемого образца Каптоприла (ВЭЖХ-МС, АРСІ⁺)

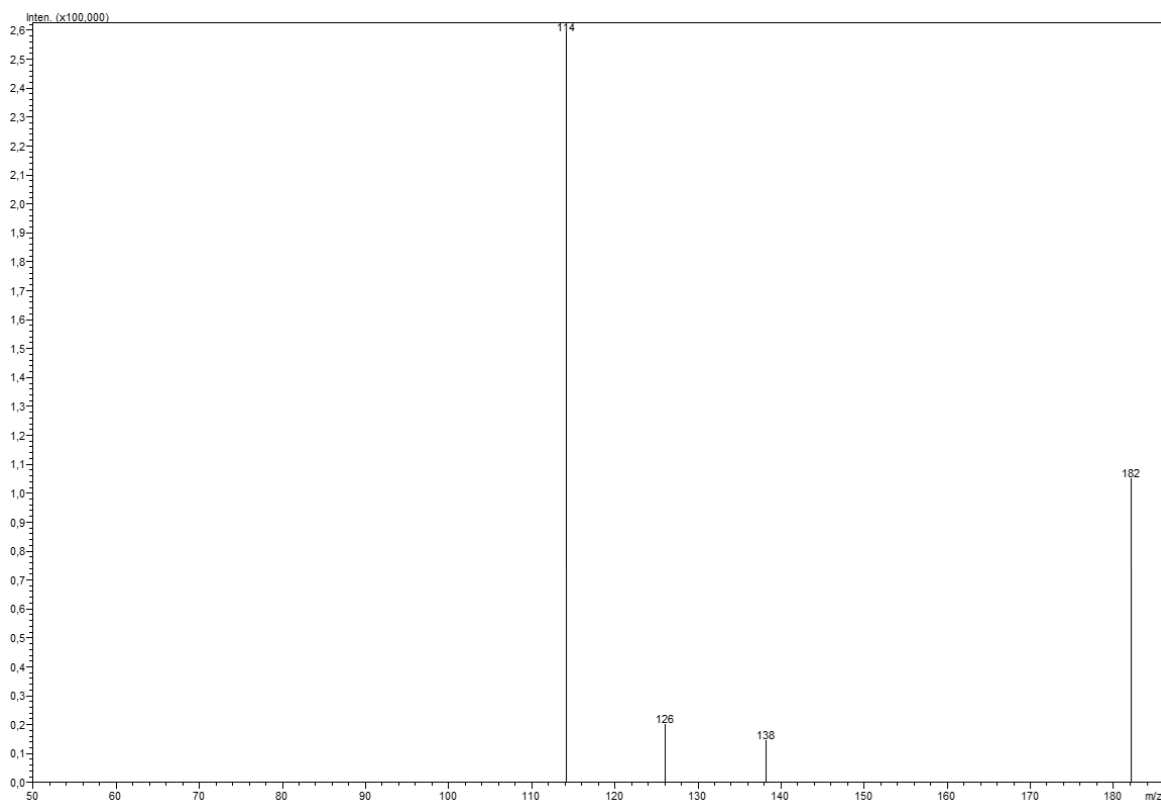


Рисунок 19 – Фрагментации молекулярного иона $[M-H]^- = 216$ m/z анализируемого образца Каптоприла (ВЭЖХ-МС, АРСІ)

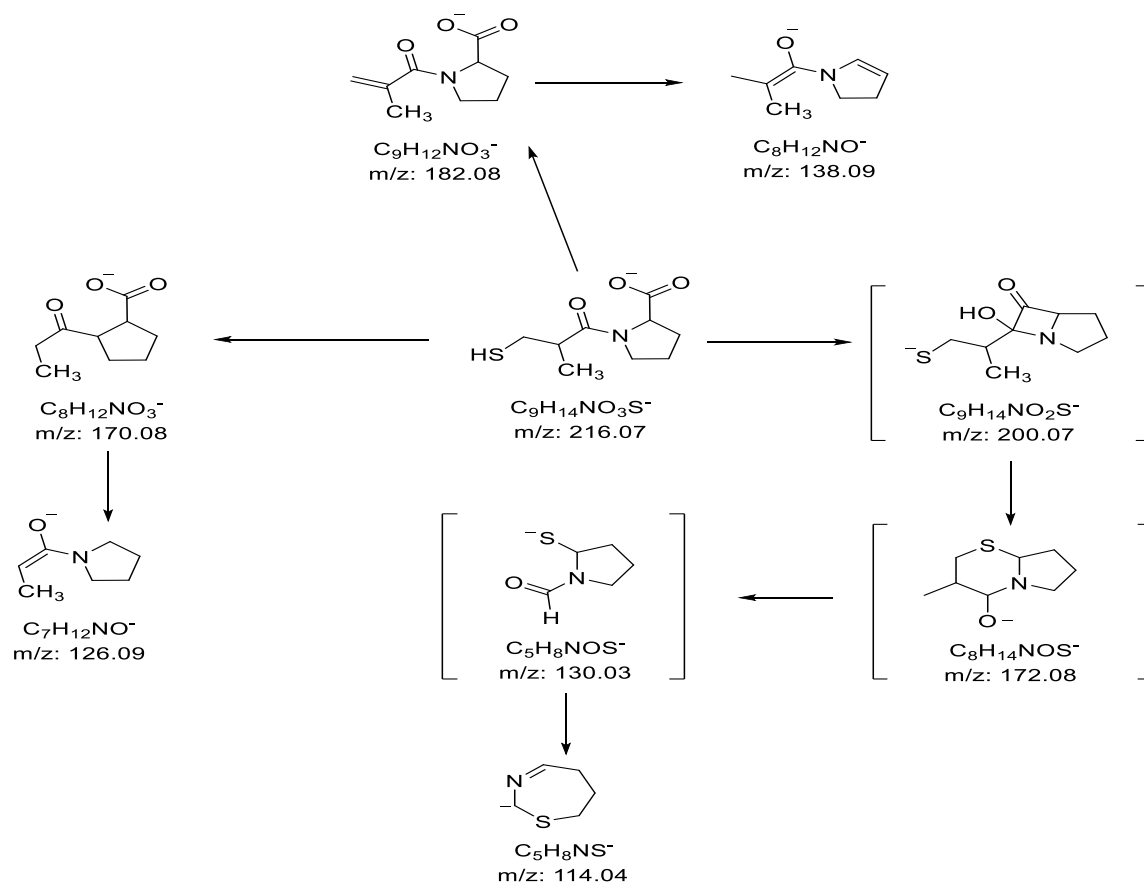


Рисунок 20 – Модель фрагментации основного молекулярного иона $[M-H]^- = 216$ m/z анализируемого образца Каптоприла (ВЭЖХ-МС, АРСІ)

Все полученные масс-спектры исследуемых образцов подтверждали химическое строение Каптоприла. Метод масс-спектрометрии подлежит включению в раздел «Подлинность» спецификации СО. Значения сигналов масс-спектров СО Каптоприла должны совпадать с предложенными масс-спектрами и не должны противоречить химической структуре Каптоприла [37].

3.3. Применение хроматографических методов в анализе исследуемых образцов Каптоприла

Хроматографические исследования разрабатываемых СО Каптоприла применяли для определения примесей и остаточных органических растворителей.

3.3.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе исследуемых образцов Каптоприла

Среди ключевых подходов, которые применяют к аттестации СО с целью определения чистоты, находится установление содержания посторонних примесей, основными путями образования которых являются процессы синтеза и/или деструкции соответствующих СО.

3.3.1.1. Разработка хроматографической методики определения посторонних примесей

На основании анализа данных доступных ранее разработанных методик, имеющих аналогичное или смежное применение, была разработана методика для определения предполагаемых посторонних примесей (Таблица 14) с использованием метода ВЭЖХ.

Разделение компонентов растворов исследуемых образцов Каптоприла проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu Nexera с использованием детектора UV/VIS SPD-40.

Условия и последовательность хроматографирования исследуемых образцов представлены в Таблице 15 и Таблице 16 соответственно. Информация о градиентной программе элюирования представлена в Таблице 17 [36].

Таблица 14 – Описание предполагаемых примесей СО Каптоприла

Структурная формула	Кодировка примеси	Химическое наименование
	Примесь А	1,1'-[дисульфандиилбис[(2 <i>S</i>)-2-метил-1-оксoproпан-3,1-диил]]бис[(2 <i>S</i>)-пирролидин-2-карбоновая] кислота
	Примесь В	(2 <i>S</i>)-1-[(2 <i>S</i>)-3-бром-2-метилпропаноил]пирролидин-2-карбоновая кислота
	Примесь С	(2 <i>RS</i>)-2-метил-3-сульфанилпропановая кислота
	Примесь D	(2 <i>RS</i>)-3-бром-2-метилпропановая кислота
	Примесь Е	(2 <i>S</i>)-1-(2-метилпропаноил)пирролидин-2-карбоновая кислота
	Примесь J	(2 <i>S</i>)-1-[(2 <i>S</i>)-3-(ацетилсульфонил)-2-метилпропаноил]пирролидин-2-карбоновая кислота

Таблица 15 – Условия хроматографирования посторонних примесей методом ВЭЖХ

Параметр	Условие
Прибор	Жидкостной хроматограф высокого давления
Колонка	10 мкм, 3,9 × 300 мм, μBondapak C18, (Waters, США)
Тип детектора	УФ
Длина волны	210 нм
Температура колонки	50 °С
Подвижная фаза	Смесь растворов А и Б
Тип элюирования	Градиентный
Объем анализируемой пробы	25 мкл
Скорость потока	1,5 мл/мин

Таблица 16 – Последовательность хроматографирования при определении посторонних примесей методом ВЭЖХ

№	Наименование раствора	Количество вколов	Примечание
1	Холостая проба	Не менее 2	Уравновешивание хроматографической системы
2	Контрольный раствор	1	Проверка пригодности хроматографической системы
3	Раствор сравнения D (1)	Не менее 5	
4	Раствор сравнения А	1	
5	Раствор сравнения В	1	
6	Раствор сравнения С	1	
7	Холостая проба	Не менее 1	Контроль массопереноса
8	Раствор сравнения D (2, 3 и т.д.)	1	Определение примесей
9	Испытуемый раствор (1, 2, 3 и т.д.)	1	

Таблица 17 – Описание градиентной программы элюирования в определении посторонних примесей СО Каптоприла методом ВЭЖХ

Ступень, №	Время, мин	Раствор А, %	Раствор Б, %	Режим
1	0	95	5	Изократический (Предварительное уравновешивание колонки)
2	5	95	5	Изократический
3	20	75	25	Линейный градиент
4	45	75	25	Изократический
5	47	95	5	Линейный градиент
6	60	95	5	Изократический (Уравновешивание колонки)

Для приготовления раствора А добавляли фосфорную кислоту в объеме 0,8 мл к небольшому объему воды для хроматографии в мерную колбу вместимостью 1 л, перемешивали и доводили конечный объем водой для хроматографии до метки. Для приготовления раствора Б добавляли фосфорную кислоту в объеме 0,8 мл к небольшому объему ацетонитрила в мерную колбу вместимостью 1 л, перемешивали и доводили конечный объем ацетонитрилом до метки. Оба раствора перемешивали, проводили фильтрацию через мембранный фильтр 0,45 мкм (Supor PES/PTFE), а затем дегазировали ультразвуком.

Растворитель готовили путем смешивания растворов А и Б в соотношении объемов 90:10. Для получения необходимого объема холостой пробы осуществляли фильтрацию приготовленного растворителя через мембранный фильтр 0,45 мкм (PTFE/RC).

Для приготовления испытуемого раствора отбирали около 0,125 г (точная навеска) анализируемого образца в мерную колбу вместимостью 25 мл. В колбу добавляли небольшой объем растворителя и проводили растворение навески. После полного растворения твердого вещества доводили конечный объем до метки растворителем, осуществляли фильтрацию с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм (RC/PTFE). Для осуществления анализа испытуемый раствор готовили не менее чем в шести повторностях, где для каждого раствора готовили раствор сравнения D.

Для приготовления раствора сравнения A взвешивали точные навески примесей. Навеска каждой примеси B, C и D составляла около 0,005 г, а навеска примеси J составляла около 0,004 г. Точные навески помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, затем смесь подвергали растворению в небольшом объеме растворителя с последующим доведением конечного объема до метки. Для разведения отбирали 2,5 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 50 мл, конечный объем доводили тем же растворителем, затем проводили фильтрацию с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм (PTFE/RC).

Для приготовления раствора сравнения B взвешивали точные навески примеси E и испытуемого образца. Навески как примеси E, так и испытуемого образца составляли около 0,005 г и помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл. Растворение полученной смеси навесок проводили в небольшом объеме ацетонитрила с последующим доведением конечного объема до метки тем же растворителем. Для разведения отбирали 4,0 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 50 мл, конечный объем доводили водой I типа, затем проводили фильтрацию с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм (PTFE/RC).

Для приготовления раствора сравнения C проводили отбор 1,0 мл испытуемого раствора в мерную колбу вместимостью 50 мл. К отобранной аликвоте в колбу добавляли 0,23 мл раствора йода (0,05 M). В случае, если раствор не являлся бесцветным, то проводили обесцвечивание с помощью раствора натрия тиосульфата (0,1 M) с дальнейшим доведением конечного объема тем же растворителем до метки. Для разведения отбирали 2,5 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили до метки тем же растворителем, затем фильтровали с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм (PTFE/RC).

Для приготовления раствора сравнения D проводили отбор 1,0 мл испытуемого раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл с дальнейшим доведением конечного объема растворителем до метки. Для разведения отбирали 1,0 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 10 мл и проводили доведение конечного объема тем же растворителем.

Для приготовления контрольного раствора отбирали 2,5 мл раствора сравнения D в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили подвижной фазой и перемешивали.

Срок годности испытуемого, контрольного раствора и растворов сравнения составлял не более 24 ч в условиях хранения при температуре не выше 10 °С, исключая возможность замораживания [36].

Регистрировали и обрабатывали данные хроматограмм, полученных в условиях разработанной и валидированной методики. Идентификацию примесей проводили по хроматограммам растворов сравнения А (Рисунок 25), В (Рисунок 26) и С (Рисунок 27).

Оценку пригодности хроматографической системы выполняли по следующим критериям:

1. Отношение сигнал/шум (S/N), которое рассчитывалось по пику основного вещества, на хроматограмме контрольного раствора – не менее 10;
2. Разрешение (R_s) между пиками примеси Е и Каптоприлом на хроматограмме раствора сравнения В – не менее 2,0;
3. Разрешение (R_s) между пиками примеси В и примеси J на хроматограмме раствора сравнения А – не менее 1,5;
4. На хроматограмме раствора сравнения D:
 - 4.1. Относительное стандартное отклонение значений времен удерживания пика основного вещества – не более 1 %, площади – не более 5 % ($n \geq 5$);
 - 4.2. Фактор асимметрии (A_s), рассчитанный по пику основного вещества – не менее 0,8 и не более 1,5.

При условии выполнения вышеперечисленных критериев хроматографическая система считалась пригодной [36].

Допускалась незначительная корректировка объемного соотношения компонентов подвижной фазы / градиента для обеспечения соответствия требованиям пригодности хроматографической системы при условии, если:

1. Конечный состав подвижной фазы по элюирующей силе не слабее, чем указано в условиях хроматографирования (Таблица 17, промежуток с 20 по 47 минуту программы);
2. Пик основного вещества элюировался в пределах ± 15 % от обозначенного времени удерживания.

Определение содержания примеси В (примеси С, D, J) в испытуемом образце (X, %), рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{S_x \cdot a_{rs} \cdot 2,5 \cdot 25 \cdot 100}{S_0 \cdot a_x \cdot 50 \cdot 50} = \frac{S_x \cdot a_{rs} \cdot 2,5}{S_0 \cdot a_x},$$

где S_x – площадь пика примеси В (примеси С, D, J) на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика примеси В (примеси С, D, J) на хроматограмме раствора сравнения А;

a_{rs} – навеска СО примеси В (примеси С, D, J) для приготовления раствора сравнения А, г;

a_x – навеска испытуемого образца для приготовления испытуемого раствора, г.

Определение содержания примеси А (примеси Е, любой другой единичной примеси) в испытуемом образце (X, %), рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{S_x \cdot a_x \cdot 25 \cdot 1,0 \cdot 1,0 \cdot 100}{S_0 \cdot a_x \cdot 25 \cdot 100 \cdot 10} = \frac{S_x \cdot 0,1}{S_0},$$

где S_x – площадь пика примеси А (примеси Е, любой другой единичной примеси) на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика основного вещества на хроматограмме раствора сравнения D;

a_x – навеска испытуемого образца для приготовления испытуемого раствора, г.

Не учитывали пики, совпадающие с пиками, которые были получены на хроматограмме холостой пробы. Также не учитывали пики, площадь которых была менее площади пика основного вещества, выявленного на хроматограмме контрольного раствора (менее 0,025 %) [36].

Проведена валидация методики согласно необходимым параметрам [9].

3.3.1.2. Валидация хроматографической методики определения посторонних примесей

Валидацию методики проводили в соответствии с ГФ РФ XIV, ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методов [9].

В зависимости от метода количественного определения примеси (по количественному содержанию относительно СО или по предельному содержанию относительно основного вещества), был составлен план определяемых параметров валидации для каждой примеси.

Параметры валидации для каждой определяемой примеси приведены в Таблице 18.

Таблица 18 – Параметры валидации методики определения посторонних примесей в исследуемых образцах Каптоприла

Параметр валидации	Определяемое вещество					
	Примесь А	Примесь В	Примесь С	Примесь D	Примесь Е	Примесь J
Правильность		+	+	+		+
Прецизионность						
• Повторяемость		+	+	+		+
• Промежуточная прецизионность		+	+	+		+
Специфичность	+	+	+	+	+	+
Предел обнаружения	+				+	

Продолжение Таблицы 18

Предел количественного определения		+	+	+		+
Линейность		+	+	+		+
Аналитическая область		+	+	+		+

Специфичность

При оценке специфичности исключают влияние прочих примесей и веществ на хроматографическое разделение и детектирование анализируемых веществ [9].

Для оценки специфичности рассчитывали параметры пригодности хроматографической системы согласно указаниям Раздела 3.3.1.1.

Результаты проверки пригодности хроматографической системы приведены в Таблице 19.

Для проверки специфичности также готовились модельные смеси испытуемого раствора с добавлением стандартных растворов А, В и С соответственно. Наличие основного вещества СО Каптоприла в растворах сравнения не повлияло на параметры хроматографического разделения и количественное определение примесей.

Таблица 19 – Результаты проверки пригодности хроматографической системы методики определения посторонних примесей исследуемых образцов Каптоприла

Критерий пригодности	Полученное значение	Соответствие критерию пригодности
Отношение сигнал/шум (S/N), которое рассчитывалось по пику основного вещества, на хроматограмме контрольного раствора составляло не менее 10	26,2	Соответствует
Разрешение (R_s) между пиками примеси В и примеси J на хроматограмме раствора сравнения А составляло не менее 1,5;	1,79	Соответствует
Разрешение (R_s) между пиками примеси Е и Каптоприлом на хроматограмме раствора сравнения В составляло не менее 2,0;	2,12	Соответствует
На хроматограмме раствора сравнения D:		
Относительное стандартное отклонение значений времен удерживания пика основного вещества – не более 1 % ($n \geq 5$)	$0,64 \pm 0,23$ (n=6)	Соответствует
Площади – не более 5 % ($n \geq 5$)	$3,38 \pm 0,89$ (n=6)	Соответствует
Фактор асимметрии (A_s), рассчитанный по пику основного вещества – не менее 0,8 и не более 1,5.	0,97	Соответствует

Полученные результаты подтверждали специфичность методики количественного определения посторонних примесей Каптоприла А, В, С, D, Е и J.

Линейность

Линейность методики для определения посторонних примесей в исследуемых образцах Каптоприла должна быть обеспечена от ПКО примеси до 120-процентного значения, указанного в спецификации (см. раздел «Аналитическая область»).

В рамках валидации проводили анализ калибровочных образцов, соответствующих калибровочным уровням, указанным в Таблице 20, путем соответствующего разведения матричного раствора растворителем.

Методика приготовления матричного раствора и растворителя приведена ниже.

Растворитель готовили путем смешивания растворов А и Б в соотношении объемов 90:10

Для приготовления раствора А добавляли фосфорную кислоту в объеме 0,8 мл к небольшому объему воды для хроматографии в мерную колбу вместимостью 1 л, перемешивали и доводили конечный объем водой для хроматографии до метки. Для приготовления раствора Б добавляли фосфорную кислоту в объеме 0,8 мл к небольшому объему ацетонитрила в мерную колбу вместимостью 1 л, перемешивали и доводили конечный объем ацетонитрилом до метки. Оба раствора перемешивали, проводили фильтрацию через мембранный фильтр 0,45 мкм (Supor PES/PTFE), а затем дегазировали ультразвуком.

Для приготовления матричного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл добавляли 0,006 г (точная навеска) СО примеси В, 0,006 г (точная навеска) СО примеси С, 0,006 г (точная навеска) СО примеси D и 0,008 г (точная навеска) СО примеси J, после чего объем колбы доводили растворителем до метки. Затем 12,5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, после чего доводили объем колбы растворителем до метки и перемешивали. Концентрация растворителей в полученном матричном растворе составила: 15 мкг/мл примеси В, 15 мкг/мл примеси С, 15 мкг/мл примеси D и 20 мкг/мл примеси J.

По полученным значениям были построены калибровочные графики в, где ось у - площадь пика примеси, ось х - концентрации примеси в калибровочном образце. Графики приведены на Рисунках 21-24 совместно с уравнениями калибровочных кривых и коэффициентами корреляции.

Линейность методики подтверждалась, если коэффициент корреляции (R^2) составлял не менее 0,99.

Таблица 20 – Калибровочные уровни методики определения посторонних примесей в исследуемых образцах Каптоприла

Калибровочный образец		Содержание примеси, %	Концентрация примеси, мкг/мл	Объем матричного раствора сравнения А	Общий объем калибровочного образца
Уровень линейности	Примесь				
120	В	0,18	1,8	6,0	50
	С	0,18	1,8		
	Д	0,18	1,8		
	Ж	0,24	2,4		
110	В	0,165	1,65	5,5	50
	С	0,165	1,65		
	Д	0,165	1,65		
	Ж	0,22	2,2		
100	В	0,15	1,5	5,0	50
	С	0,15	1,5		
	Д	0,15	1,5		
	Ж	0,2	2,0		
90	В	0,135	1,35	4,5	50
	С	0,135	1,35		
	Д	0,135	1,35		
	Ж	0,18	1,8		
80	В	0,12	1,2	4,0	50
	С	0,12	1,2		
	Д	0,12	1,2		
	Ж	0,16	1,6		
ПКО	В	0,024	0,24	0,8	50
	С	0,024	0,24		
	Д	0,024	0,24		
	Ж	0,032	0,32		

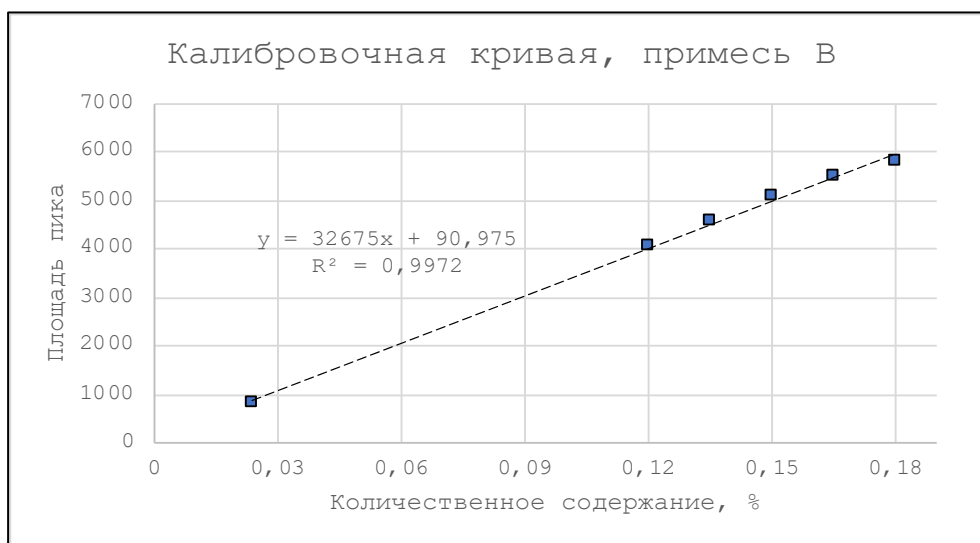


Рисунок 21 – Калибровочный график линейности для примеси В

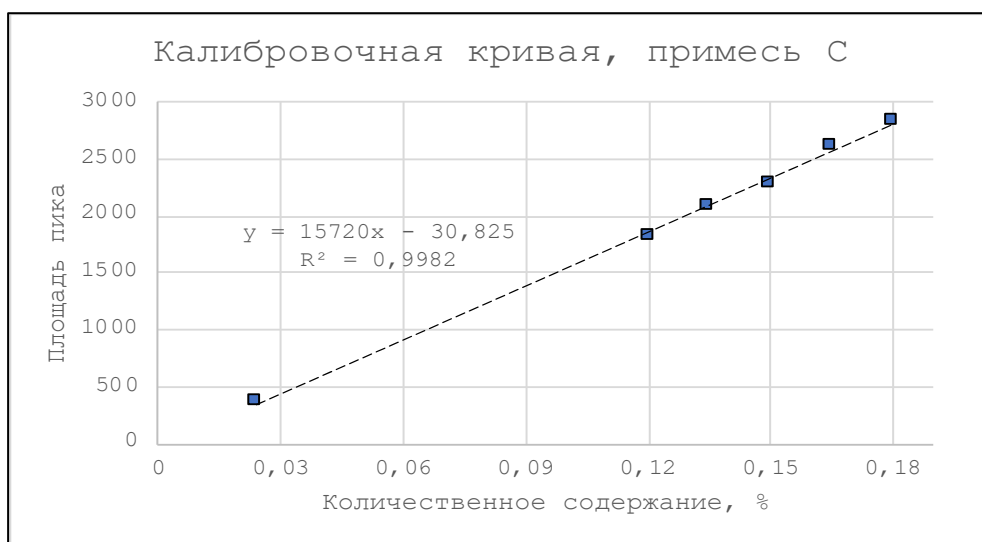


Рисунок 22 – Калибровочный график линейности для примеси С

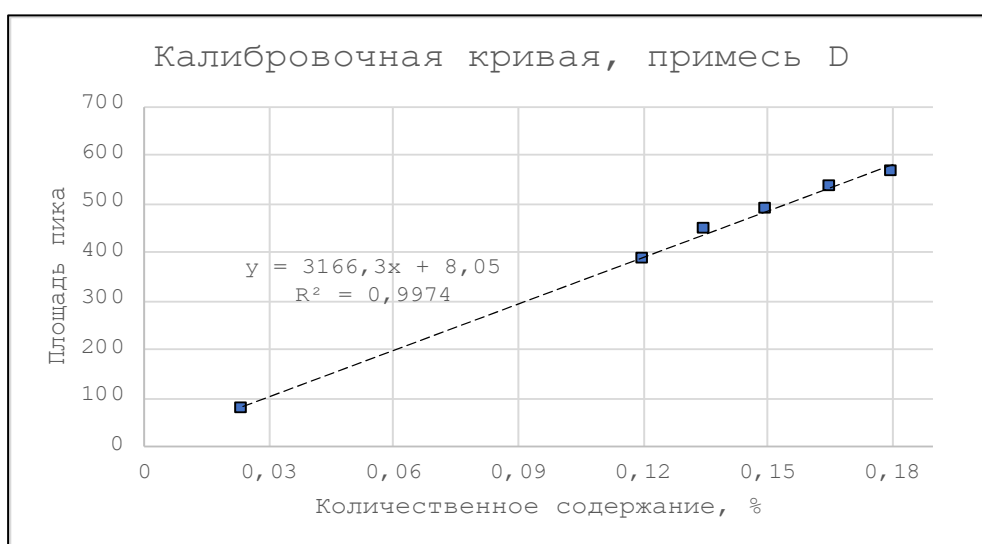


Рисунок 23 – Калибровочный график линейности для примеси D

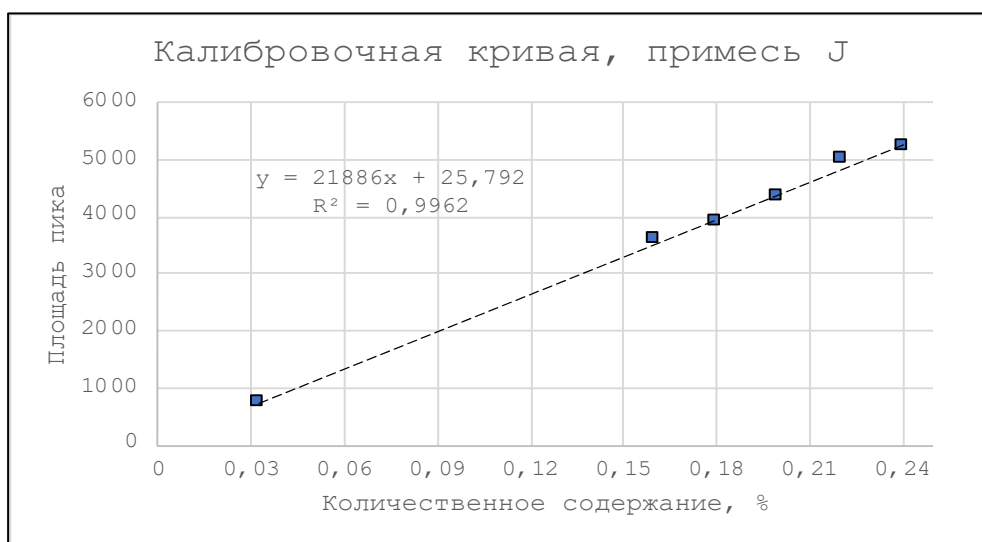


Рисунок 24 – Калибровочный график линейности для примеси С

Получены коэффициенты корреляции (R^2) для калибровочных кривых посторонних примесей Каптоприла:

Примеси В – 0,9972;

Примеси С – 0,9982;

Примеси D – 0,9974;

Примеси J – 0,9962.

Полученные результаты подтверждали линейность методики количественного определения посторонних примесей в исследуемых образцах Каптоприла:

Примеси В – в диапазоне процентного содержания 0,024 % – 0,180 %;

Примеси С – в диапазоне процентного содержания 0,024 % – 0,180 %;

Примеси D – в диапазоне процентного содержания 0,024 % – 0,180 %;

Примеси J – в диапазоне процентного содержания 0,032 % – 0,240 %.

Правильность

Правильность методики определяли для трех калибровочных образцов (80, 100 и 120), каждый из которых был проанализирован 3 раза. По результатам анализа определяли среднее значение расчетного содержания примеси в образце и относительная стандартная погрешность (RSE, %).

Правильность подтверждалась, если значение RSE составляло не более 5% для каждого уровня концентрации.

Полученные результаты определения правильности приведены в Таблице 21.

Таблица 21 – Правильность методики количественного определения посторонних примесей в исследуемых образцах Каптоприла

Калибровочный образец		Фактическое содержание в образце, %	Среднее значение расчетного содержания, % (n = 3)	RSE, % (n = 3)	Соответствие критерию приемлемости
Уровень линейности	Примесь				
120	В	0,18	0,1797	-0,17	Соответствует
	С	0,18	0,1750	-2,76	Соответствует
	D	0,18	0,1765	-1,93	Соответствует
	J	0,24	0,2362	-1,58	Соответствует
100	В	0,15	0,1531	2,04	Соответствует
	С	0,15	0,1441	-3,91	Соответствует
	D	0,15	0,1553	3,51	Соответствует
	J	0,20	0,1973	-1,33	Соответствует

Продолжение Таблицы 21

80	B	0,12	0,1157	-3,56	Соответствует
	C	0,12	0,1219	1,61	Соответствует
	D	0,12	0,1228	2,31	Соответствует
	J	0,16	0,1659	3,71	Соответствует

Полученные результаты подтверждали правильность методики количественного определения посторонних примесей каптоприла В, С, D и J.

Прецизионность

Прецизионность методики определяли для трех калибровочных образцов (80, 100 и 120). Для подтверждения прецизионности было проведено два исследования:

Повторяемость в рамках одного дня ($n = 3$);

Внутрилабораторная прецизионность на следующий день после определения повторяемости ($n = 3$).

По результатам анализа определяли среднее значение расчетного содержания примеси в образце, стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение (RSD, %).

Правильность подтверждалась, если значение RSD составляло не более 5% для каждого уровня концентрации.

Полученные результаты определения прецизионности приведены в Таблице 22.

Таблица 22 – Прецизионность методики количественного определения посторонних примесей в исследуемых образцах Каптоприла

Калибровочный образец		Среднее значение, % ($n = 3$)	Стандартное отклонение, % ($n = 3$)	RSD, % ($n = 3$)	Соответствие критерию приемлемости
Уровень линейности	Примесь				
Повторяемость (день 1)					
120	B	0,1797	0,0036	2,01	Соответствует
	C	0,1750	0,0036	2,05	Соответствует
	D	0,1765	0,0061	3,44	Соответствует
	J	0,2362	0,0082	3,48	Соответствует
100	B	0,1531	0,0040	2,61	Соответствует
	C	0,1441	0,0053	3,69	Соответствует
	D	0,1553	0,0046	2,98	Соответствует
	J	0,1973	0,0042	2,12	Соответствует
80	B	0,1157	0,0015	1,30	Соответствует
	C	0,1219	0,0046	3,76	Соответствует
	D	0,1228	0,0041	3,33	Соответствует
	J	0,1659	0,0020	1,18	Соответствует

Продолжение Таблицы 22

Внутрилаборатная прецизионность (день 2)					
120	B	0,1809	0,0037	2,04	Соответствует
	C	0,1762	0,0034	1,93	Соответствует
	D	0,1777	0,0067	3,75	Соответствует
	J	0,2345	0,0049	2,08	Соответствует
100	B	0,1541	0,0048	3,12	Соответствует
	C	0,1466	0,0047	3,23	Соответствует
	D	0,1563	0,0031	2,01	Соответствует
	J	0,1987	0,0059	2,98	Соответствует
80	B	0,1165	0,0013	1,09	Соответствует
	C	0,1227	0,0051	4,15	Соответствует
	D	0,1236	0,0035	2,80	Соответствует
	J	0,1670	0,0038	2,30	Соответствует

Полученные результаты подтверждали прецизионность методики количественного определения посторонних примесей исследуемых образцов Каптоприла В, С, D и J.

Аналитическая область

Аналитическая область – интервал между наибольшей и наименьшей концентрациями (количеством) определяемого вещества в образце (включая эти концентрации), для которого показано, что аналитическая методика имеет приемлемый уровень прецизионности, правильности и линейности [9].

Аналитическая область методики для определения посторонних примесей должна быть обеспечена от ПКО примеси до 120-процентного значения, указанного в спецификации.

По результатам определения линейности, правильности и прецизионности, аналитическая область методики определения посторонних примесей Каптоприла была установлена в следующих диапазонах:

Примесь В – 0,024 % – 0,180 % (от ПКО до 120 %);

Примесь С – 0,024 % – 0,180 % (от ПКО до 120 %);

Примесь D – 0,024 % – 0,180 % (от ПКО до 120 %);

Примесь J – 0,032 % – 0,240 % (от ПКО до 120 %).

Полученные результаты удовлетворяли требованиям, выдвигаемым для аналитического диапазона методики количественного определения посторонних примесей исследуемых образцов Каптоприла В, С, D и J.

Предел количественного определения

ПКО – наименьшее количество вещества в образце, которое можно количественно определить с соответствующей прецизионностью и правильностью [9].

ПКО определяли на основании соотношения «сигнал/шум», сравнения измеряемых сигналов, полученных от образцов с известными низкими концентрациями определяемого вещества, с сигналами, полученными от холостых проб, и установления минимальной концентрации, при которой определяемое вещество может быть достоверно определено количественно [9].

За критерий приемлемости взято отношение "сигнал/шум" не менее 10:1.

Результаты определения ПКО приведены в Таблице 23.

Таблица 23 – ПКО методики определения посторонних примесей исследуемых образцов Каптоприла

Калибровочный образец		Фактическое содержание в образце, %	Отношение «сигнал/шум»	Соответствие критерию приемлемости
Уровень линейности	Примесь			
ПКО	В	0,024	28,1	Соответствует
	С	0,024	12,3	Соответствует
	Д	0,024	15,4	Соответствует
	Ж	0,032	20,8	Соответствует

Предел обнаружения

ПО – наименьшее количество определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено, но необязательно точно количественно определено [9].

ПО определяли по соотношению «сигнал/шум», сравнения измеряемых сигналов, полученных от образцов с известными низкими концентрациями определяемого вещества, с сигналами, полученными от холостых проб, и установления минимальной концентрации, при которой определяемое вещество может быть достоверно обнаружено [9].

За критерий приемлемости взято отношение "сигнал/шум" от 3:1 до 2:1.

Образцы для определения предела обнаружения посторонних примесей А и Е Каптоприла готовили путем последовательного разведения растворов сравнения С и В растворителем до достижения установленного соотношения «сигнал/шум» для пиков примесей на хроматограмме.

Результаты определения ПО приведены в Таблице 24.

Таблица 24 – ПО методики определения посторонних примесей исследуемых образцов Каптоприла

Калибровочный образец		Фактическое содержание в образце, %	Отношение «сигнал/шум»	Соответствие критерию приемлемости
Уровень концентрации	Примесь			
ПО	А	0,005	2,5	Соответствует
	Е	0,005	2,7	Соответствует

Таким образом, проведенная валидация методики количественного определения посторонних примесей Каптоприла методом ВЭЖХ показала, что методика удовлетворяет критериям приемлемости по параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная прецизионность), аналитическая область, ПКО, ПО.

3.3.1.3. Количественное определение посторонних примесей

Результаты количественного определения посторонних примесей в исследуемых образцах Каптоприла, полученные с помощью разработанной и валидированной методики, приведены в Таблица 25. Рассчитывали содержание каждого из примесных веществ, как описано выше.

Общее содержание примесей вычисляли, как сумму содержания каждой примеси. Итоговым значением являлся средний показатель не менее шести определений [36].

Таблица 25 – Содержание посторонних примесей в испытуемых образцах Каптоприла

№ серии	Содержание посторонних примесей ($\pm \sigma$), %
1К	Примесь А – $0,084 \pm 0,002$ Примесь В – $0,026 \pm 0,001$ Примесь С – $0,032 \pm 0,001$ Примеси: D, J – Ниже ПКО Примесь Е – Ниже ПО Любая другая единичная примесь – $0,039 \pm 0,0009$ Сумма примесей – 0,181
2К	Примесь А – $0,373 \pm 0,001$ Примесь С – $0,028 \pm 0,001$ Примесь J – $0,105 \pm 0,003$ Примесь Е – $0,065 \pm 0,001$ Примеси: В, D – Ниже ПКО Любая другая единичная примесь – $0,054 \pm 0,0007$ Сумма примесей – 0,625

Продолжение Таблицы 25

ЗК	Примесь А – $0,099 \pm 0,002$ Примесь С – $0,040 \pm 0,001$ Примеси: В, С, D, J – Ниже ПКО Примесь Е – Ниже ПО Любая другая единичная примесь – $0,041 \pm 0,0009$ Сумма примесей – $0,180$
----	--

Метод ВЭЖХ подлежит включению в раздел «Посторонние примеси» спецификации СО. Были установлены следующие нормы содержания посторонних примесей: каждая из примесей В, С, D, Е – не более 0,15 %, примесь J – не более 0,2 %, примесь А – не более 1,0 %. Любая другая единичная примесь должна быть не более 0,10 %. Сумма примесей должна составлять не более 1,0 %. [36].

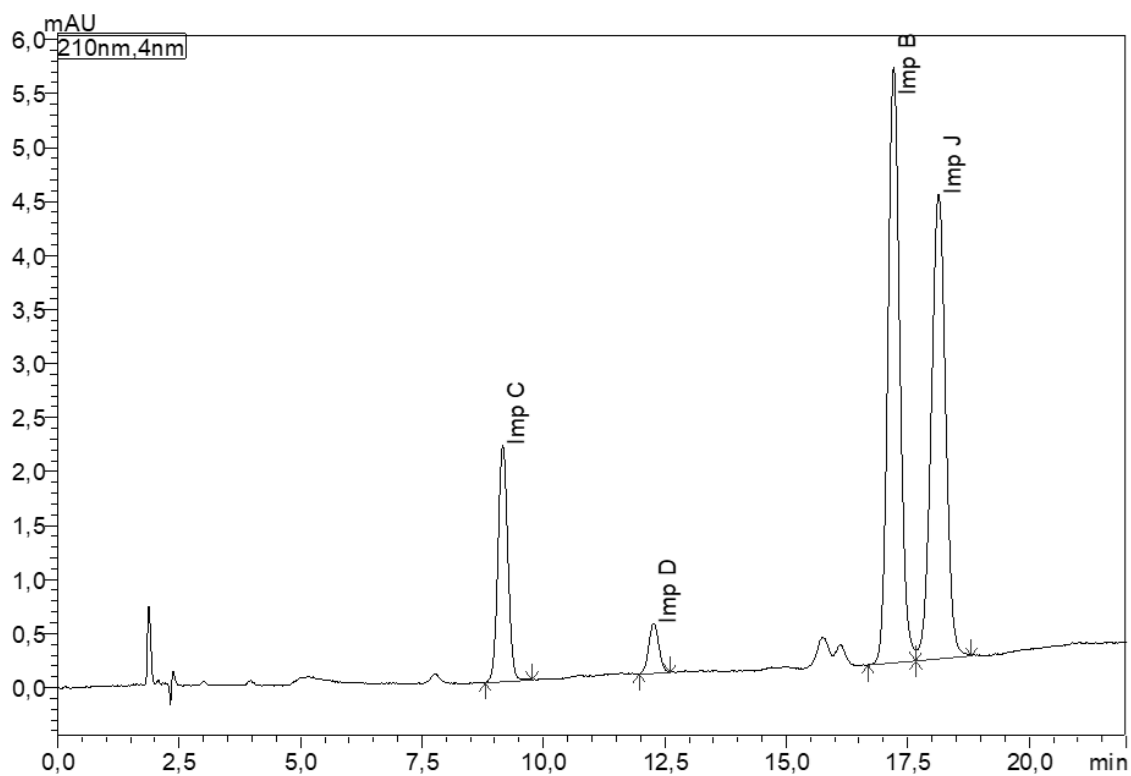


Рисунок 25 – Хроматограмма раствора сравнения А

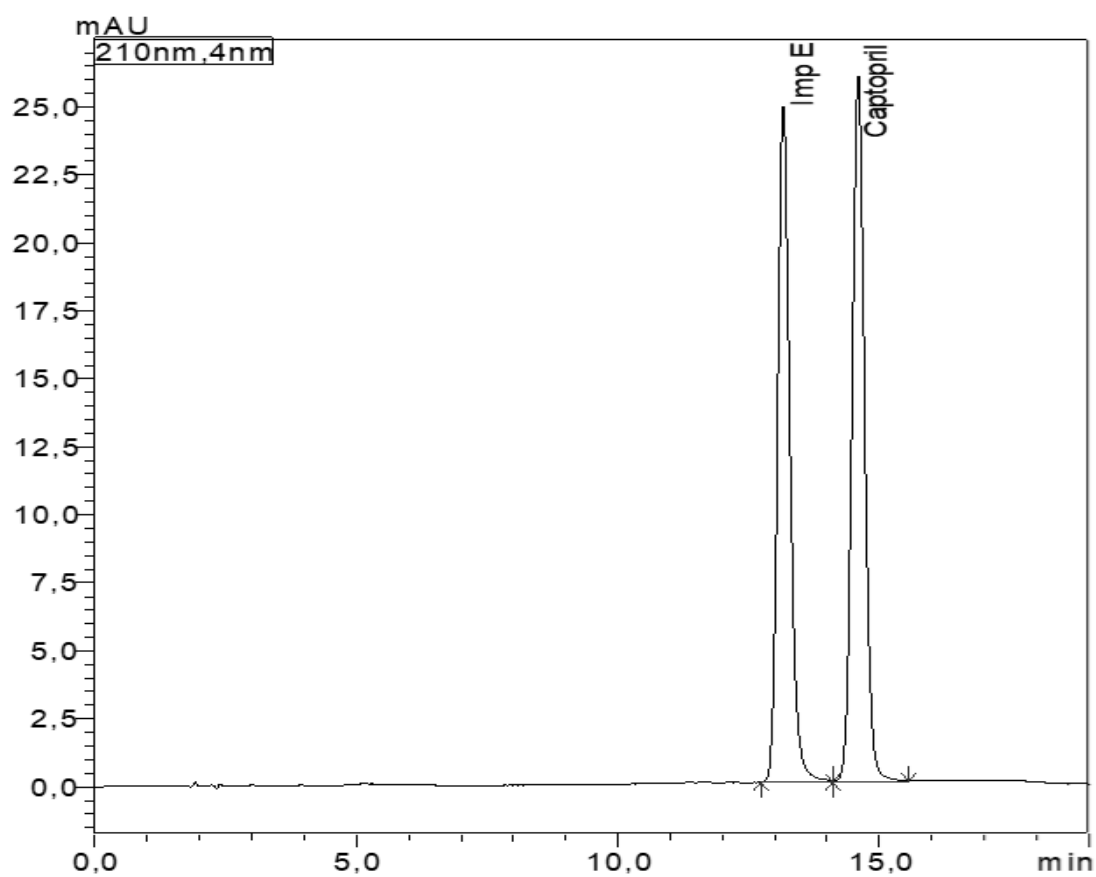


Рисунок 26 – Хроматограмма раствора сравнения В

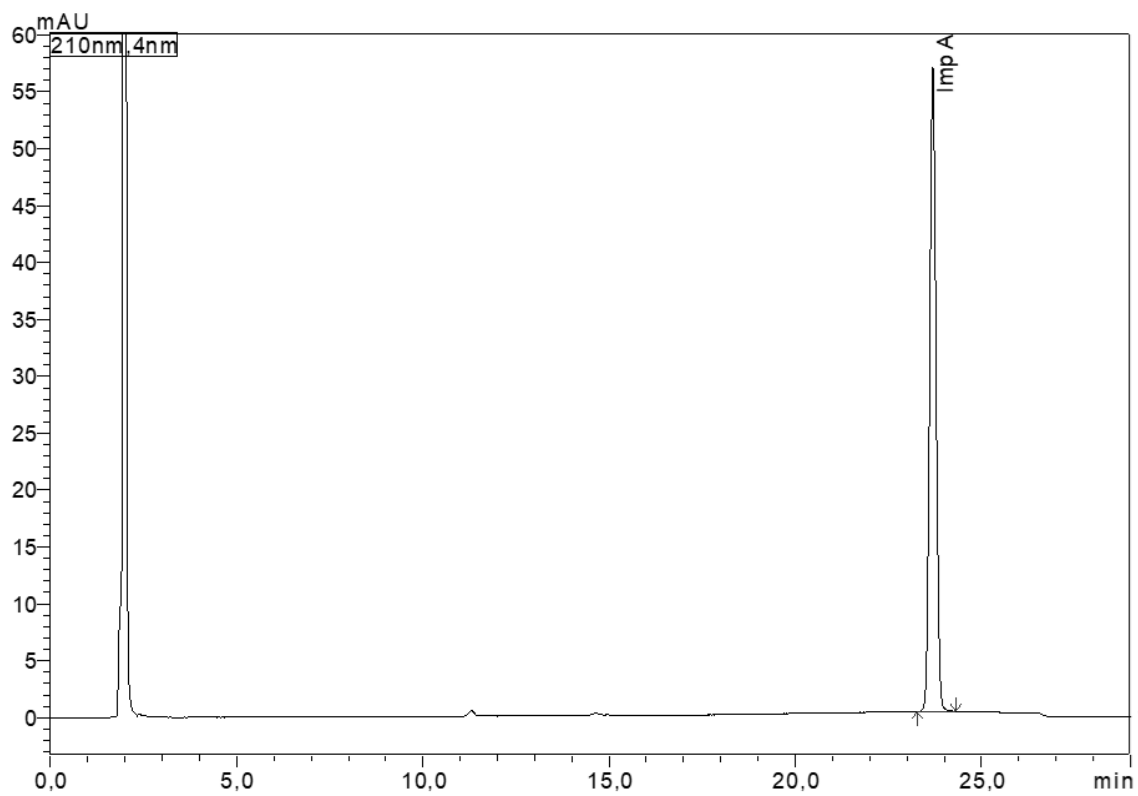


Рисунок 27 – Хроматограмма раствора сравнения С

Относительное время удерживания (t_r) и поправочные коэффициенты (k_i) представлены в Таблице 26 и основываются на результатах хроматографического анализа в условиях разработанной и валидированной методики определения посторонних примесей Каптоприла.

Таблица 26 – Относительное время удерживания и поправочные коэффициенты для определяемых посторонних примесей Каптоприла

Наименование компонента	Относительное время удерживания (t_r)	Поправочный коэффициент (k_i)
Примесь С	Около 0,6	1,0
Примесь D	Около 0,8	1,0
Примесь E	Около 0,9	1,0
Каптоприл	1	1,0
Примесь В	Около 1,2	1,0
Примесь J	Около 1,3	1,0
Примесь А	Около 1,7	1,0

3.3.2. Газовая хроматография в анализе исследуемых образцов Каптоприла

Метод ГХ использовался в определении примеси F в виде дериватизированного вещества, а также в качестве классического метода определения остаточных органических растворителей в исследуемых образцах Каптоприла.

3.3.2.1. Определение примеси F

Определение примеси F проводили с предварительной предколоночной дериватизацией, осуществляя метилирование по карбоксильной группе и последующее ацилирование пентафторпропионовым ангидридом по тиоловой группе. Результатом дериватизации являлись вещества пригодные для анализа методом ГХ (Таблица 27).

Исследуемые растворы образцов регистрировали на газовом хроматографе Shimadzu GC-2010 Plus оснащенном пламенно-ионизационным детектором и автоматическим устройством для анализа равновесной паровой фазы со шприцевым дозированием пробы Shimadzu Headspace, AOC-5000 Plus.

Условия и последовательность хроматографирования исследуемых образцов представлены в Таблице 28 и Таблице 29 соответственно.

Методика определения примеси F в исследуемых образцах Каптоприла является воспроизведенной методикой из ГФ РФ XIV ФС.2.1.0106.18 Каптоприл, «Примесь F» [11].

Таблица 27 – Сравнительное описание дериватизированных веществ в методе определения посторонней примеси F методом ГХ

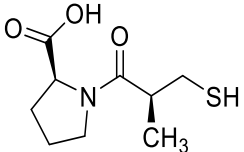
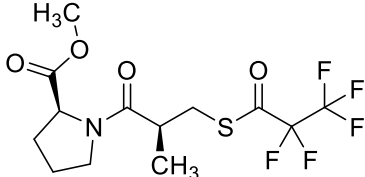
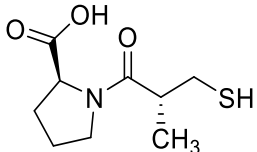
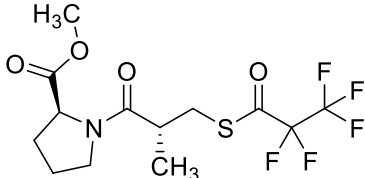
Структурная формула	Кодировка	Химическое наименование
	Каптоприл	(2 <i>S</i>)-1-[(2 <i>S</i>)-2-Метил-3-сульфанилпропаноил]пирролидин-2-карбоновая кислота
	Каптоприл (после дериватизации)	Метил-((<i>S</i>)-2-метил-3-((2,2,3,3,3-пентафторпропаноил)тио)пропаноил)-L-пролинат
	Примесь F	(2 <i>S</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-2-метил-3-сульфанилпропаноил]пирролидин-2-карбоновая кислота
	Примесь F (после дериватизации)	Метил-((<i>R</i>)-2-метил-3-((2,2,3,3,3-пентафторпропаноил)тио)пропаноил)-L-пролинат

Таблица 28 – Условия хроматографирования примеси F методом ГХ

Параметр	Условие
Прибор	Газовый хроматограф
Тип детектора	Пламенно-ионизационный
Колонка	25м×0,32мм, 1,05 мкм, НФ: (5%-фенил)-95% метилполисилоксан (Agilent Technologies, США)
Газ-носитель (ПФ)	Гелий
Деление потока	1:20
Скорость газ-носителя	1,2 мл/мин
Обдув септы	3 мл/мин
Температура колонки	10 минут при 200 °С, дальнейшее увеличение до 240 °С при скорости 10 °С в минуту и выдерживание при 240 °С в течение 20 мин
Температура инжектора	270 °С
Температура детектора	300 °С
Объем пробы	1 мкл

Таблица 29 – Последовательность хроматографирования при определении примеси F методом ГХ

№	Наименование раствора	Количество вколов	Примечание
1	Холостая проба	Не менее 2	Уравновешивание хроматографической системы, достижение стабильной базовой линии
2	Раствор сравнения В	1	Проверка пригодности хроматографической системы
3	Раствор сравнения А	Не менее 5	
4	Холостая проба	1	Контроль массопереноса
5	Испытуемый раствор (1, 2, 3 и т.д.)	1	Определение примеси F

Приготовление раствора метилирующего реактива:

К 30 мл безводного метанола, предварительно охлажденного до 0 °С, по каплям при перемешивании добавляли 5 мл ацетилхлорида. Выдерживали 20 мин перед использованием при комнатной температуре.

Приготовление раствора холостой пробы:

1,0 мл раствора метилирующего реактива помещали в виалу вместимостью 2 мл и закручивали крышкой с септой. Данный раствор подвергали термостатированию на протяжении 30 мин при 60 °С, затем проводили упаривание досуха системой параллельного упаривания и концентрирования при 50 °С. Остаток растворяли этилацетатом в объеме 0,5 мл и добавляли пентафторпропионовый ангидрид в объеме 0,5 мл, перемешивали и термостатировали на протяжении 30 мин при 60 °С. Повторное выпаривание проводили при 60 °С с последующим добавлением к остатку 1,0 мл бутилацетата и перемешиванием.

Приготовление испытуемого раствора:

Испытуемый образец массой 20 мг (точная навеска) помещали в виалу вместимостью 2 мл, добавляли раствор метилирующего реактива в объеме 1 мл, закручивали крышкой с септой, перемешивали и термостатировали 30 мин при 60 °С. Далее проводили упаривание досуха системой параллельного упаривания и концентрирования при 50 °С. Остаток растворяли этилацетатом в объеме 0,5 мл и добавляли пентафторпропионовый ангидрид в объеме 0,5 мл, перемешивали и термостатировали на протяжении 30 мин при 60 °С. Повторное выпаривание проводили при температуре 60 °С с последующим добавлением к остатку 1,0 мл бутилацетата и перемешиванием.

Готовили не менее шести испытуемых растворов.

Приготовление раствора сравнения А проводили следующим образом: содержимое флакона со СО Каптоприла для осуществления проверки пригодности хроматографической системы, включающим примесь F, растворяли в растворе метилирующего реактива в объеме

1,0 мл, перемешивали и термостатировали на протяжении 30 мин при 60 °С. Далее проводили упаривание досуха системой параллельного упаривания и концентрирования при 50 °С. Остаток растворяли этилацетатом в объеме 0,5 мл и добавляли пентафторпропионовый ангидрид в объеме 0,5 мл, перемешивали и термостатировали на протяжении 30 мин при 60 °С. Повторное выпаривание проводили при 60 °С с последующим добавлением к остатку 1,0 мл бутилацетата и перемешиванием.

Приготовление раствора сравнения В проводили следующим образом: смешивали раствор сравнения А в объеме 0,25 мл и бутилацетат в объеме 0,75 мл.

Все растворы в процессе анализа использовали свежеприготовленными. Осуществляли хроматографию приготовленных растворов, регистрировали и рассчитывали хроматограммы. Относительное время удерживания производного примеси F – около 0,96.

Пригодность хроматографической системы определяли по следующим параметрам:

На хроматограмме раствора сравнения А (Рисунок 28):

1. Разрешение (R_s) между пиками производного Каптоприла и производного примеси F – не менее 1,5;
2. Относительное стандартное отклонение значений времени удерживания пика производного примеси F – не более 2 %, площади – не более 10 % ($n \geq 5$);
3. Значение фактора асимметрии (A_s), полученное для пика производного примеси F должно укладываться в интервал: не менее 0,8 и не более 1,5.

На хроматограмме раствора сравнения В:

1. Отношение сигнал/шум (S/N), определенное по пику производного примеси F – не менее 10.

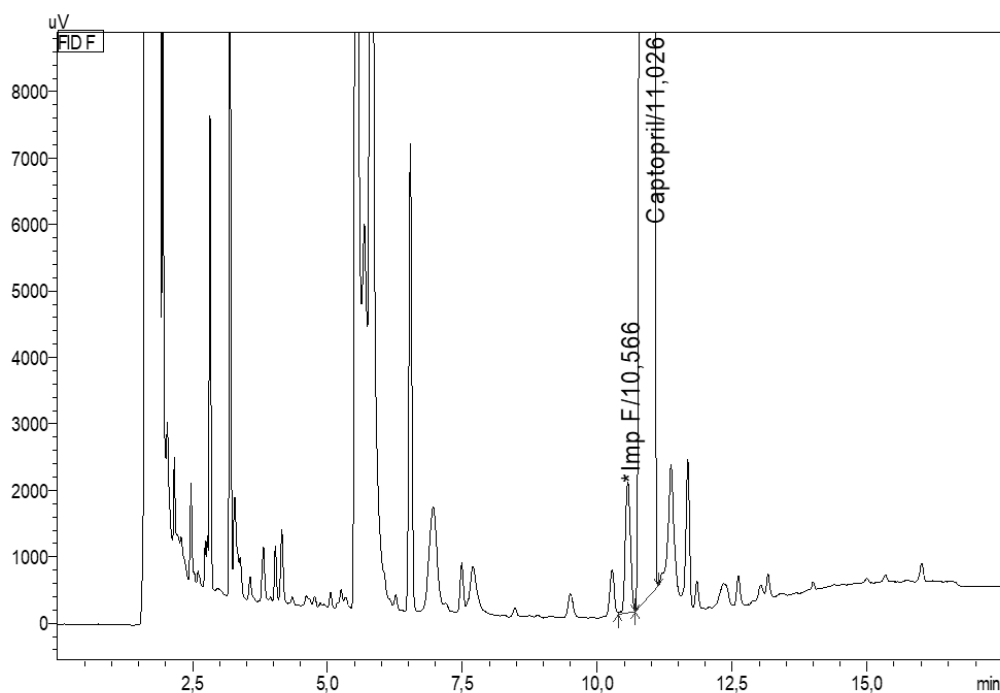


Рисунок 28 – Хроматограмма раствора сравнения А при определении примеси F методом ГХ

На хроматограмме испытуемого раствора интегрировали только пики производного Каптоприла и производного примеси F.

Количество примеси F (X,%) в анализируемом образце устанавливали по следующей формуле:

$$X = \frac{S_F \cdot 100}{S_F + S_C},$$

где S_F – площадь пика производного примеси F на хроматограмме испытуемого раствора;

S_C – площадь пика производного каптоприла на хроматограмме испытуемого раствора.

При вычислениях допускалось использование программного обеспечения газового хроматографа. За результат измерения принимали среднее значение шести определений (Таблица 30).

Таблица 30 – Результаты определения примеси F методом ГХ

№ серии	Содержание примеси F ($\pm \sigma$), %
1К	0,051 \pm 0,003
2К	0,081 \pm 0,002
3К	0,064 \pm 0,003

Метод определения примеси F методом ГХ подлежит включению в раздел «Примесь F» спецификацию СО с установлением нормы: не более 0,1%.

3.3.2.2. Разработка хроматографической методики определения остаточных органических растворителей

Контроль остаточных органических растворителей является составляющей частью определения чистоты СО. Органические растворители могут использоваться или образовываться на любой стадии производства фармацевтических субстанций, из которых в дальнейшем разрабатывают соответствующие СО, и полностью не удаляются после завершения технологического производства. Наиболее распространенным методом обнаружения остаточных органических растворителей в веществах является ГХ.

Предложена универсальная методика определения остаточных органических растворителей в исследуемых образцах как Каптоприла, так и Эналаприла малеата. В качестве потенциальных примесей органической природы с последующим нормированием были определены: этанол, ацетон, МХ, гексан. Выбор вышеописанных остаточных органических

растворителей определялся их использованием при производстве исходных объектов исследования – активных фармацевтических субстанций (АФС) Каптоприла и Эналаприла малеата – на стадии очистки.

Исследование проводили на газовом хроматографе Shimadzu GC-2010 с использованием пламенно-ионизационного детектора и автоматическим устройством для анализа равновесной паровой фазы со шприцевым дозированием пробы Shimadzu Headspace, AOC-5000 Plus.

Условия и последовательность хроматографирования исследуемых образцов представлены в Таблице 31 и Таблице 32 соответственно.

Таблица 31 – Условия хроматографирования остаточных органических растворителей методом ГХ

Параметр	Условие
Прибор	Газовый хроматограф
Колонка	1,8 мкм, 60 м × 0,32 мм, DB-624, (Agilent Technologies, США)
Тип детектора	Пламенно-ионизационный детектор
Подвижная фаза (Газ-носитель)	Гелий
Скорость газа-носителя	30 см/с
Деление потока	1:10
Температура инжектора	180 °С
Температура детектора	250 °С
Температура колонки	40 °С на протяжении 11 мин; последующее повышение до 240 °С со скоростью 35 °С/мин; постоянство при 240 °С на протяжении 3 мин
Объем анализируемой пробы	1 мл

Таблица 32 – Последовательность хроматографирования при определении остаточных органических растворителей методом ГХ

№	Наименование раствора	Количество вколов	Примечание
1	Холостая проба	Не менее 2	Уравновешивание хроматографической системы
2	Контрольный раствор	1	Проверка пригодности хроматографической системы
3	Стандартный раствор 1	Не менее 5	Проверка пригодности хроматографической системы / идентификация остаточных органических растворителей
4	Стандартный раствор 2	Не менее 2	
5	Холостая проба	Не менее 1	Контроль массопереноса
6	Испытуемый раствор (1, 2, 3 и т.д.)	1	Определение остаточных органических растворителей

Холостую пробу готовили путем добавления 5 мл диметилацетамида в виалу вместимостью 20 мл из темного стекла с последующей укупоркой пробкой с обкатанным колпачком.

Стандартный раствор готовили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 25 мл добавляли 5 мл диметилацетамида, затем последовательно добавляли около 0,07 г (точная навеска) гексана, около 0,15 г (точная навеска) МХ, доводя объем раствора диметилацетамидом до метки с перемешиванием (Раствор А). Раствор готовили в двух повторностях.

Затем в мерную колбу вместимостью 25 мл добавляли 5 мл диметилацетамида, затем последовательно добавляли около 0,13 г (точная навеска) этанола, около 0,13 г (точная навеска) ацетона, 2,5 мл раствора А, доводя объем раствора диметилацетамидом до метки и перемешивали (Раствор Б). Раствор готовили в двух повторностях.

Приготовление стандартного раствора 1: 1 мл раствора Б помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем раствора до метки диметилацетамидом и перемешивали.

Приготовление стандартного раствора 2: 5 мл стандартного раствора 1 помещали в виалу из темного стекла вместимостью 20 мл с последующей укупоркой пробкой с обкатанным колпачком.

Контрольный раствор готовили путем добавления 2 мл раствора Б в виалу из темного стекла вместимостью 20 мл с последующим добавлением 3 мл диметилацетамида и укупориванием пробкой с обкатанным колпачком. Испытуемый раствор готовили путем добавления около 0,1 г (точная навеска) испытуемого образца субстанции в виалу из темного стекла вместимостью 20 мл с последующим добавлением 5 мл диметилацетамида и укупориванием пробкой с обкатанным колпачком. Хранение всех растворов осуществлялось при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 24 ч.

Регистрировали и обрабатывали данные хроматограмм, полученных в условиях разработанной и валидированной методики. Порядок выхода компонентов на хроматограмме стандартного раствора: этанол, ацетон, МХ, гексан (Рисунок 29).

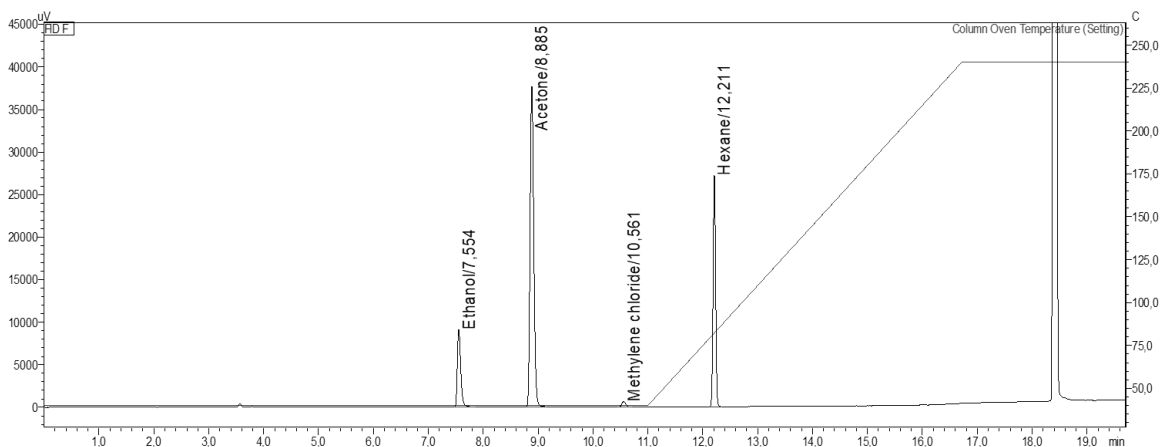


Рисунок 29 – Порядок выхода остаточных органических растворителей на хроматограмме стандартного раствора

Оценка пригодности хроматографической системы выполнялась по следующим критериям:

Хроматограмма стандартного раствора:

1. Разрешение (R_s) между пиками этанола и ацетона составляло не менее 5;
2. Относительное стандартное отклонение значений времен удерживания пиков этанола, ацетона, МХ и гексана составляло не более 2 %, а площадей пиков этанола, ацетона, МХ и гексана составляло не более 10 % ($n \geq 5$);
3. Эффективность хроматографической колонки (N), определенное по пику этанола, составляла не менее 10000 теоретических тарелок;
4. Значение фактора асимметрии (A_s), определенное для пика этанола, составлял не более 1,8.

Хроматограмма контрольного раствора:

1. Отношение сигнал / шум (S/N), определенное по пику МХ, составляло не менее 10.

При условии выполнения вышеперечисленных критериев хроматографическая система считалась пригодной.

Не производили учет пиков, которые относились к холостой пробе, на полученной хроматограмме испытуемого раствора.

Определение содержания этанола (ацетона) в испытуемом образце (X , %), рассчитывали по следующей формуле:

$$X, \% = \frac{S_x \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 5 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_x \cdot 100 \cdot 25 \cdot 50} = \frac{S_x \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_x \cdot 250}$$

где S_x – площадь пика этанола (ацетона) на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика этанола (ацетона) на хроматограмме стандартного раствора;

a_x – навеска испытуемого образца, взятая для приготовления испытуемого раствора, г;

a_0 – навеска этанола (ацетона), г;

P – содержание основного вещества в этаноле (ацетоне), %.

Определение содержания МХ (гексана) в испытуемом образце (X , %), рассчитывали по следующей формуле:

$$X, \% = \frac{S_x \cdot a_0 \cdot 2,5 \cdot 1 \cdot 5 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a_x \cdot 100 \cdot 25 \cdot 25 \cdot 50} = \frac{S_x \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot a_x \cdot 2500}$$

где S_x – площадь пика МХ (гексана) на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика МХ (гексана) на хроматограмме стандартного раствора;

a_x – навеска испытуемого образца, взятая для приготовления испытуемого раствора, г;

a_0 – навеска МХ (гексана), г;

P – содержание основного вещества в МХ (гексане), %.

Проведена валидация методики согласно необходимым параметрам [9].

3.3.2.3. Валидация хроматографической методики определения остаточных органических растворителей

Валидацию методики проводили в соответствии с ГФ РФ XIV, ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик [9].

Согласно методу количественного определения остаточных органических растворителей (количественное содержание относительно стандартного образца) был составлен план определяемых параметров валидации для каждой примеси.

Параметры валидации для каждого определяемого остаточного органического растворителя приведены в Таблице 33.

Таблица 33 – Параметры валидации методики определения остаточных органических растворителей в исследуемых образцах Каптоприла

Параметр валидации	Определяемое вещество			
	Этанол	Ацетон	МХ	Гексан
Правильность	+	+	+	+
Прецизионность				
• Повторяемость	+	+	+	+
• Промежуточная прецизионность	+	+	+	+
Специфичность	+	+	+	+
Предел обнаружения				
Предел количественного определения	+	+	+	+
Линейность	+	+	+	+
Аналитическая область	+	+	+	+

Специфичность

При оценке специфичности исключают влияние прочих примесей и веществ на хроматографическое разделение и детектирование анализируемых веществ [9].

Для оценки специфичности рассчитывали параметры пригодности хроматографической системы согласно указаниям раздела 3.3.2.2.

Результаты проверки пригодности хроматографической системы приведены в Таблице 34.

Для проверки специфичности также готовились модельные смеси испытуемого раствора с добавлением стандартного раствора 2, содержащего органические примеси этанол, ацетон, МХ и гексан в известной концентрации. В качестве СО исследуемых остаточных органических растворителей использовались реактивы соответствующей чистоты (пригодные для хроматографии). Наличие основного вещества СО Каптоприла или Эналаприла в растворах

сравнения не повлияло на параметры хроматографического разделения и количественное определение остаточных органических растворителей.

Таблица 34 – Результаты проверки пригодности хроматографической системы, методика определения остаточных органических растворителей

Критерий пригодности	Полученное значение	Соответствие критерию пригодности
На хроматограмме стандартного раствора:		
Разрешение (R_s) между пиками этанола и ацетона составляет не менее 5	7,4	Соответствует
Относительное стандартное отклонение значений времен удерживания пиков этанола, Ацетона, МХ и гексана составляло не более 2 % ($n \geq 5$)	Этанол – 0,61 % Ацетон – 0,74 % МХ – 0,43 % Гексан – 0,46 % ($n = 5$)	Соответствует
Относительное стандартное отклонение значений площадей пиков этанола, ацетона, МХ и гексана составляет не более 10 % ($n \geq 5$)	Этанол – 3,17 % Ацетон – 3,56 % МХ – 2,63 % Гексан – 2,39 % ($n = 5$)	Соответствует
Эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику этанола, составляла не менее 10000 теоретических тарелок	14531	Соответствует
Фактор асимметрии (A_s), рассчитанный для пика этанола, составлял не более 1,8	1,48	Соответствует
На хроматограмме контрольного раствора:		
Отношение сигнал / шум (S/N), рассчитанное по пику МХ, составляло не менее 10	28,3	Соответствует

Полученные результаты подтверждали специфичность методики количественного определения остаточных органических растворителей в СО.

Линейность

Линейность методики для определения остаточных органических растворителей в СО должна быть обеспечена от ПКО до 120-процентного значения, указанного в спецификации (см. раздел «Аналитическая область»).

В рамках валидации проводили анализ калибровочных образцов, соответствующих калибровочным уровням, указанным в Таблице 35, путем соответствующего разведения матричного раствора.

Матричный раствор готовили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 100 мл добавляли 5 мл диметилацетамида, затем последовательно добавляли 0,5 г (точная навеска) этанола, 0,5 г (точная навеска) ацетона, 0,06 г (точная навеска) МХ и 0,029 г (точная навеска) гексана доводя объем раствора диметилацетамидом до метки с перемешиванием. Затем 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, после чего доводили объем колбы диметилацетамидом до метки с перемешиванием. Концентрация растворителей в полученном матричном растворе составила: 50 мкг/мл этанола, 50 мкг/мл ацетона, 6 мкг/мл МХ и 2,9 мкг/мл гексана.

Калибровочные образцы готовили путем добавления соответствующего объема матричного раствора (согласно Таблице 35) в мерную колбу вместимостью 50 мл, после чего доводили объем колбы диметилацетамидом до метки с перемешиванием.

Калибровочный образец на уровне ПКО готовили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 100 мл добавляли 5 мл диметилацетамида, затем последовательно добавляли 0,02 г (точная навеска) этанола, 0,02 г (точная навеска) ацетона, 0,02 г (точная навеска) МХ и 0,02 г (точная навеска) гексана доводя объем раствора диметилацетамидом до метки с перемешиванием (содержание растворителей 0,2 мг/мл). Затем в отдельную мерную колбу вместимостью 100 мл добавляли 5 мл диметилацетамида, после чего 0,1 мл полученного раствора помещали в колбу, доводили объем колбы диметилацетамидом до метки с перемешиванием (содержание растворителей на уровне ПКО 0,2 мкг/мл).

По полученным значениям были построены калибровочные графики, где ось у - площадь пика остаточного органического растворителя, ось х - концентрации остаточных органических растворителей в калибровочном образце. Графики приведены на Рисунках 30-33 совместно с уравнениями калибровочных кривых и коэффициентами корреляции.

Линейность методики подтверждалась, если коэффициент корреляции (R^2) составлял не менее 0,99.

Таблица 35 – Калибровочные уровни методики определения остаточных органических растворителей в исследуемых образцах Каптоприла

Калибровочный образец		Содержание примеси, %	Концентрация примеси, мкг/мл	Объем матричного раствора, мл	Общий объем калибровочного образца, мл
Уровень линейности	Примесь				
120	Этанол	0,60	6,0	6,0	50
	Ацетон	0,60	6,0		
	МХ	0,072	0,72		
	Гексан	0,035	0,35		

Продолжение Таблицы 35

110	Этанол	0,55	5,5	5,5	50
	Ацетон	0,55	5,5		
	МХ	0,066	0,66		
	Гексан	0,032	0,32		
100	Этанол	0,50	5,0	5,0	50
	Ацетон	0,50	5,0		
	МХ	0,060	0,6		
	Гексан	0,029	0,29		
90	Этанол	0,45	4,5	4,5	50
	Ацетон	0,45	4,5		
	МХ	0,054	0,54		
	Гексан	0,026	0,26		
80	Этанол	0,40	4,0	4,0	50
	Ацетон	0,40	4,0		
	МХ	0,048	0,48		
	Гексан	0,023	0,23		
ПКО	Этанол	0,020	0,2	Готовился отдельно согласно описанной методике	
	Ацетон	0,020	0,2		
	МХ	0,020	0,2		
	Гексан	0,020	0,2		

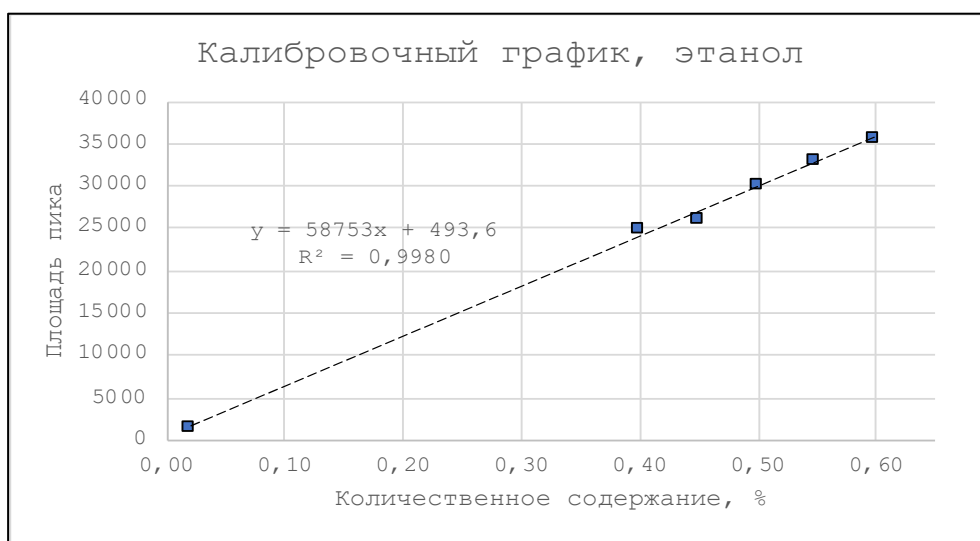


Рисунок 30 – Калибровочный график линейности для этанола

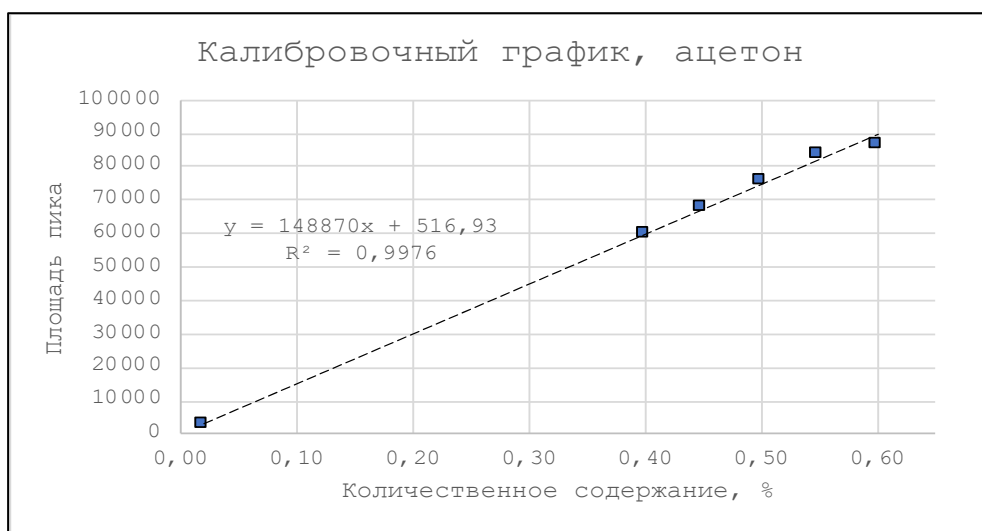


Рисунок 31 – Калибровочный график линейности для ацетона

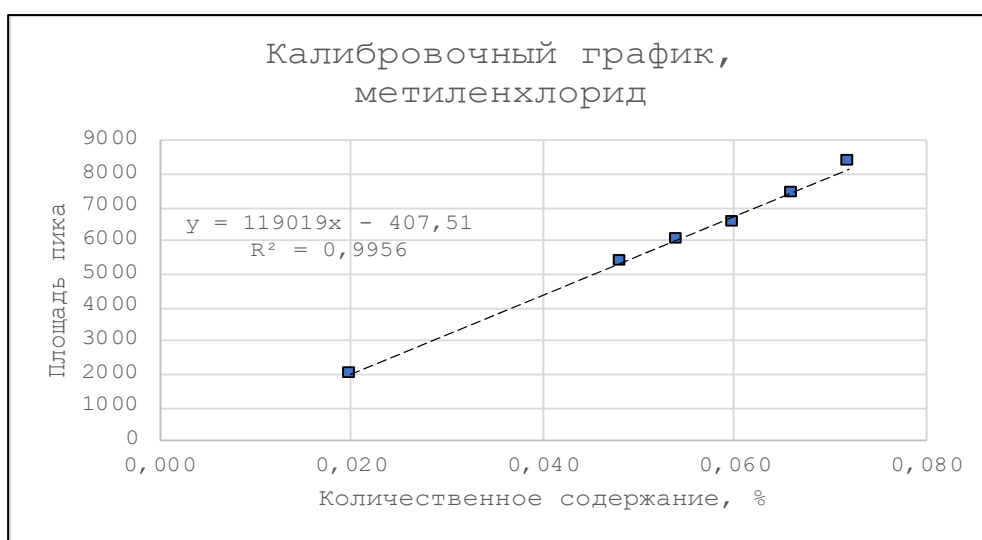


Рисунок 32 – Калибровочный график линейности для МХ

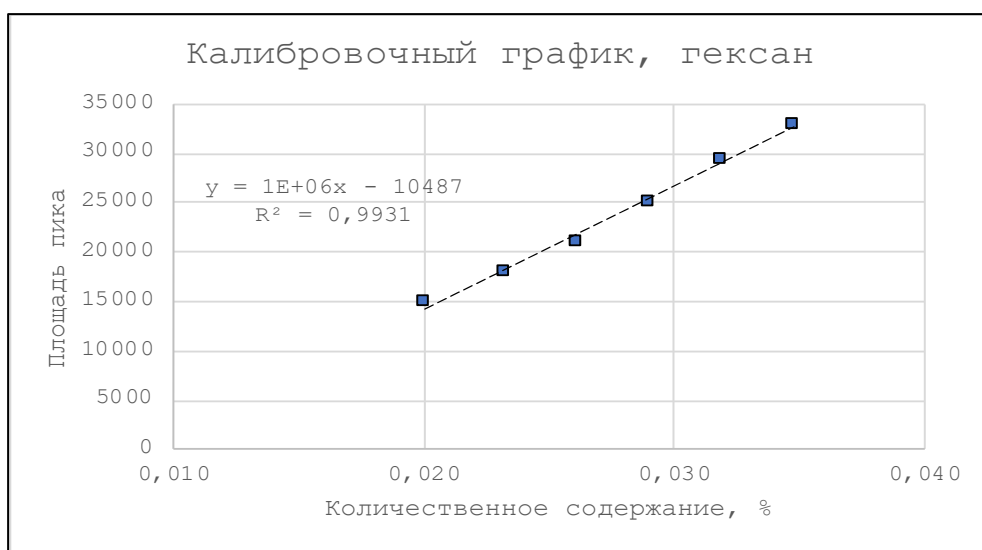


Рисунок 33 – Калибровочный график линейности для гексана

Получены коэффициенты корреляции (R^2) для калибровочных графиков ООР:

Этанола – 0,9980;

Ацетона – 0,9976;

МХ – 0,9956;

Гексана – 0,9931.

Полученные результаты подтверждали линейность методики количественного определения остаточных органических растворителей:

Этанола – в диапазоне процентного содержания 0,020 % – 0,60 %;

Ацетона – в диапазоне процентного содержания 0,020 % – 0,60 %;

МХ – в диапазоне процентного содержания 0,020 % – 0,072 %;

Гексана – в диапазоне процентного содержания 0,020 % – 0,035 %.

Правильность

Правильность методики определяли для трех калибровочных образцов (80, 100 и 120), каждый из которых был проанализирован 3 раза. По результатам анализа определялось среднее значение расчетного содержания остаточных органических растворителей в образце и относительная стандартная погрешность (RSE, %).

Правильность подтверждалась, если значение RSE составляло не более 5% для каждого уровня концентрации.

Полученные результаты определения правильности приведены в Таблице 36.

Таблица 36 – Правильность методики количественного определения остаточных органических растворителей в исследуемых образцах Каптоприла

Калибровочный образец		Фактическое содержание в образце, %	Среднее значение расчетного содержания, % (n = 3)	RSE, % (n = 3)	Соответствие критерию приемлемости
Уровень линейности	Примесь				
120	Этанол	0,60	0,6131	2,18	Соответствует
	Ацетон	0,60	0,6116	1,93	Соответствует
	МХ	0,072	0,0731	1,57	Соответствует
	Гексан	0,035	0,0342	-2,38	Соответствует
100	Этанол	0,50	0,4863	-2,73	Соответствует
	Ацетон	0,50	0,5221	4,43	Соответствует
	МХ	0,060	0,0578	-3,72	Соответствует
	Гексан	0,029	0,0277	-4,48	Соответствует
80	Этанол	0,40	0,3874	-3,16	Соответствует
	Ацетон	0,40	0,4160	3,99	Соответствует
	МХ	0,048	0,0497	3,54	Соответствует
	Гексан	0,023	0,0225	-2,32	Соответствует

Полученные результаты подтверждали правильность методики количественного определения остаточных органических растворителей.

Прецизионность

Прецизионность методики определяли для трех калибровочных образцов (80, 100 и 120). Для подтверждения прецизионности было проведено два исследования:

Повторяемость в рамках одного дня ($n = 3$);

Внутрилабораторная прецизионность на следующий день после определения повторяемости ($n = 3$).

По результатам анализа определялось среднее значение расчетного содержания примеси в образце, стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение (RSD, %).

Правильность подтверждалась, если значение RSD составляло не более 5% для каждого уровня концентрации.

Полученные результаты определения прецизионности приведены в Таблице 37.

Таблица 37 – Прецизионность методики количественного определения остаточных органических растворителей в исследуемых образцах Каптоприла

Калибровочный образец		Среднее значение, % ($n = 3$)	Стандартное отклонение, % ($n = 3$)	RSD, % ($n = 3$)	Соответствие критерию приемлемости
Уровень линейности	Примесь				
Повторяемость (день 1)					
120	Этанол	0,6131	0,0076	1,24	Соответствует
	Ацетон	0,6116	0,0116	1,90	Соответствует
	МХ	0,0731	0,0017	2,26	Соответствует
	Гексан	0,0342	0,0014	3,98	Соответствует
100	Этанол	0,4863	0,0133	2,73	Соответствует
	Ацетон	0,5221	0,0122	2,34	Соответствует
	МХ	0,0578	0,0027	4,59	Соответствует
	Гексан	0,0277	0,0012	4,39	Соответствует
80	Этанол	0,3874	0,0059	1,52	Соответствует
	Ацетон	0,4160	0,0074	1,78	Соответствует
	МХ	0,0497	0,0022	4,45	Соответствует
	Гексан	0,0225	0,0009	4,21	Соответствует
Внутрилабораторная прецизионность (день 2)					
120	Этанол	0,1809	0,0037	2,75	Соответствует
	Ацетон	0,1762	0,0034	1,67	Соответствует
	МХ	0,1777	0,0067	2,30	Соответствует
	Гексан	0,2345	0,0049	4,84	Соответствует

Продолжение Таблицы 37

100	Этанол	0,1541	0,0048	3,88	Соответствует
	Ацетон	0,1466	0,0047	3,30	Соответствует
	МХ	0,1563	0,0031	2,61	Соответствует
	Гексан	0,1987	0,0059	4,38	Соответствует
80	Этанол	0,1165	0,0013	2,41	Соответствует
	Ацетон	0,1227	0,0051	2,07	Соответствует
	МХ	0,1236	0,0035	4,69	Соответствует
	Гексан	0,1670	0,0038	3,57	Соответствует

Полученные результаты подтверждали прецизионность методики количественного определения остаточных органических растворителей.

Аналитическая область

Аналитическая область – интервал между наибольшей и наименьшей концентрациями (количеством) определяемого вещества в образце (включая эти концентрации), для которого показано, что аналитическая методика имеет приемлемый уровень прецизионности, правильности и линейности [9].

Аналитическая область методики для определения остаточных органических растворителей должна быть обеспечена от ПКО до 120-процентного значения, указанного в спецификации.

По результатам определения линейности, правильности и прецизионности, аналитическая область методики определения остаточных органических растворителей Каптоприла была установлена в следующих диапазонах:

Этанол – 0,020 % – 0,60 % (от ПКО до 120 %);

Ацетон – 0,020 % – 0,60 % (от ПКО до 120 %);

МХ – 0,020 % – 0,072 % (от ПКО до 120 %);

Гексан – 0,020 % – 0,035 % (от ПКО до 120 %).

Полученные результаты удовлетворяли требованиям, выдвигаемым для аналитического диапазона методики количественного определения остаточных органических растворителей в исследуемых образцах Каптоприла.

Предел количественного определения

ПКО – наименьшее количество вещества в образце, которое можно количественно определить с соответствующей прецизионностью и правильностью [9].

ПКО определялся по соотношению «сигнал/шум», сравнения измеряемых сигналов, полученных от образцов с известными низкими концентрациями определяемого вещества, с

сигналами, полученными от холостых проб, и установления минимальной концентрации, при которой определяемое вещество может быть достоверно определено количественно [9].

За критерий приемлемости взято отношение "сигнал/шум" не менее 10:1.

Результаты определения ПКО приведены в Таблице 38.

Таблица 38 – ПКО методики определения остаточных органических растворителей исследуемых образцов Каптоприла

Калибровочный образец		Фактическое содержание в образце, %	Отношение «сигнал/шум»	Соответствие критерию приемлемости
Уровень линейности	Примесь			
ПКО	Этанол	0,020	19,4	Соответствует
	Ацетон	0,020	18,2	Соответствует
	МХ	0,020	11,2	Соответствует
	Гексан	0,020	15,6	Соответствует

Таким образом, проведенная валидация методики количественного определения ООР методом ГХ показала, что методика удовлетворяет критериям приемлемости по параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость и внутрिलाбораторная прецизионность), аналитическая область, ПКО.

3.3.2.4. Количественное определение остаточных органических растворителей

С помощью разработанной и валидированной методики было оценено содержание остаточных органических растворителей в исследуемых образцах Каптоприла.

За результат измерения принимали среднее значение не менее шести определений (Таблица 39). Определяли суммарное содержание остаточных органических растворителей в процентах как сумму содержания каждого остаточного органического растворителя, если его содержание было не менее 0,025 %.

Таблица 39 – Содержание остаточных органических растворителей в испытуемых образцах Каптоприла

№ серии	Содержание остаточных органических растворителей ($\pm \sigma$), %
1К	Этанол, ацетон, гексан – Ниже ПКО МХ – $0,022 \pm 0,001$
2К	Ацетон, гексан – Ниже ПКО Этанол – $0,023 \pm 0,001$ МХ – $0,041 \pm 0,002$ Сумма остаточных органических растворителей – 0,064

Продолжение Таблицы 39

ЗК	Этанол, ацетон, гексан – Ниже ПКО МХ – 0,023 ± 0,001
----	---

Метод ГХ подлежит включению в раздел «Остаточные органические растворители» спецификации СО. На основании полученных результатов и требований ГФ РФ XIV издания, ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» были установлены нормы остаточных органических растворителей: этанол – не более 0,5 %; ацетон – не более 0,5 %; МХ – не более 0,06 %; гексан – не более 0,029 %. Сумма остаточных органических растворителей – не более 0,6 %.

3.4. Количественное определение Каптоприла методом материального баланса

Количественное определение проводили регламентированным ГФ РФ XIV методом материального баланса, где содержание основного компонента СО рассчитывается исходя из значений, полученных при определении примесей (неорганические и органические примеси, остаточные органические растворители, вода) [8]. При расчете не учитывали значения установленного показателя «Потеря в массе при высушивании» ввиду отдельного определения и учета в расчете значений показателей «Содержание воды» и «Остаточные органические растворители».

Содержание основного вещества (X,%) в СО в пересчете на сухое вещество вычисляли по формуле:

$$X = 100 - x_{\text{ПП}} - x_{\text{F}} - x_{\text{СЗ}} - x_{\text{В}} - x_{\text{ООР}},$$

где $x_{\text{ПП}}$ – суммарное содержание посторонних примесей, %;

x_{F} – содержание примеси F, %;

$x_{\text{СЗ}}$ – содержание сульфатной золы, %;

$x_{\text{В}}$ – содержание воды, %;

$x_{\text{ООР}}$ – суммарное содержание остаточных органических растворителей, %.

При расчете содержания основного компонента СО значения определяющих показателей (примеси, вода и т.д.) не учитывали в случае, если значение каждого отдельного показателя составляло менее 0,025 %.

Результаты расчета содержания основного компонента СО каждой из испытываемых серий субстанции Каптоприла описаны в Таблице 40.

Таблица 40 – Содержание основного компонента СО Каптоприла методом материального баланса в пересчете на сухое вещество

№ серии	Среднее значение содержания Каптоприла ($\pm \sigma$), %
1К	99,70 \pm 0,002
2К	99,14 \pm 0,003
3К	99,69 \pm 0,002

Исходя из полученных результатов определения содержания основного компонента СО Каптоприла в исследуемых образцах методом материального баланса была установлена следующая норма: не менее 99,0% (в пересчете на сухое вещество). Данная норма в рамках показателя «Содержание основного вещества» подлежит включению в спецификацию СО.

3.5. Нормы и показатели качества стандартного образца Каптоприла

Осуществление полного перечня испытаний исследуемых образцов позволило сформировать конкретные показатели качества и установить соответствующие нормы, которые подлежат включению в нормативную документация на СО. Предлагаемая спецификация контроля качества разработанного СО Каптоприла представлена в Таблице 41 и была учтена при процедуре аттестации СО утвержденного типа ГСО 11697-2021. Показатель «Потеря в массе при высушивании» не был включен в основу предлагаемой спецификации ввиду отдельного определения с последующим нормированием показателей «Содержание воды» и «Остаточные органические растворители».

Таблица 41 – Спецификация СО Каптоприла

Показатель	Метод	Норма
Описание	Визуальный (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.1.0001.18 «Правила пользования фармакопейными статьями»)	Белый или почти белый кристаллический порошок
Растворимость	Визуальный (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость»)	Растворим в воде, легко растворим в метаноле, этаноле и МХ
Температура плавления	Термический анализ капиллярным методом (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.0011.18 «Температура плавления», метод 1)	От 106,0° С до 108,0° С

Продолжение Таблицы 41

Удельное вращение	Поляриметрия (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.0018.15 «Поляриметрия»)	От -131,0° до -128,0° (в пересчете на сухое вещество для 1%-го раствора вещества в этаноле безводном)
Содержание воды	Титриметрия методом К. Фишера (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.3.0002.15 «Определение воды», метод 1)	Не более 0,05%
Сульфатная зола	Гравиметрический (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.2.2.0014.15 «Сульфатная зола»)	Не более 0,1%
Тяжелые металлы	Визуальный (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.2.2.0012.15 «Тяжелые металлы», метод 2)	Не более 0,002%
Прозрачность	Визуальный (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкостей»)	2%-й водный раствор вещества должен быть прозрачным
Цветность	Визуальный (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.0006.15 «Степень окраски жидкостей», метод 2)	Раствор, полученный в испытании «Прозрачность», должен быть бесцветным
Подлинность	ИК-спектроскопия (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.1.0002.15 «Спектрометрия в инфракрасной области»)	ИК-спектр не должен противоречить химической структуре Каптоприла
	ЯМР-спектроскопия (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.1.0007.15 «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса»)	ЯМР-спектры ¹ H и ¹³ C не должны противоречить химической структуре Каптоприла
	Масс-спектрометрия (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.1.0008.15 «Масс- спектрометрия»)	Масс-спектр не должен противоречить химической структуре Каптоприла

Продолжение Таблицы 41

Посторонние примеси	ВЭЖХ (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография»)	Примесь А – не более 1,0 %; Примесь В – не более 0,15 %; Примесь С – не более 0,15 %; Примесь D – не более 0,15 %; Примесь Е – не более 0,15 %; Примесь J – не более 0,2 %; Любая другая единичная примесь – не более 0,10 %; Сумма примесей – не более 1,0 %
Остаточные органические растворители	ГХ (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.2.0004.15 «Газовая хроматография», ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», ГФ РФ изд. XIV, том I, ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители»)	Этанол – не более 0,5 %; Ацетон – не более 0,5 %; Гексан – не более 0,029 %; МХ – не более 0,06 %; Сумма остаточных органических растворителей – не более 0,6 %
Примесь F	ГХ (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.2.0004.15 «Газовая хроматография», ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография»)	Не более 0,1%
Содержание основного вещества	Метод материального баланса (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.1.0007.18 «Стандартные образцы»)	Не менее 99,0% (в пересчете на сухое вещество)

ГЛАВА 4. АТТЕСТАЦИЯ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ ЭНАЛАПРИЛА МАЛЕАТА

4.1. Проведение общефармакопейных испытаний исследуемых образцов Эналаприла малеата

Проведено изучение образцов, предназначенных для создания СО, трех серий субстанции Эналаприла малеата от разных производителей по следующим показателям: описание (внешний вид), растворимость в различных растворителях, прозрачность и цветность, температура плавления, удельное вращение, содержание воды, потеря в массе при высушивании, содержание тяжелых металлов, а также сульфатная зола. Результаты исследований позволили установить соответствующие нормы контроля качества СО.

4.1.1. Внешний вид

Внешний вид всех исследуемых образцов субстанции Эналаприла малеата, предназначенных для создания СО, представлял собой белый или почти белый кристаллический порошок. Использовали визуальный метод определения и давали характеристику испытуемых образцов в соответствии с ГФ РФ XIV [8]. По итогам проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Описание» была установлена норма: белый или почти белый кристаллический порошок. Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

4.1.2. Растворимость

Изучение растворимости исследуемых образцов проводили в соответствии с ГФ РФ XIV [8].

Определение растворимости осуществлялось с использованием следующих растворителей: вода, метанол и этанол. Проанализированные серии субстанции исследуемых образцов Эналаприла малеата, предназначенные для создания СО, умеренно растворимы в воде (от 30 до 100 мл растворителя на 1 г вещества), легко растворимы в метаноле (от 1 до 10 мл растворителя на 1 г вещества), растворимы в этаноле 96% (от 10 до 30 мл растворителя на 1 г вещества).

Предлагается определять растворимость при осуществлении контроля качества СО Эналаприла малеата в следующих растворителях: вода (умеренно растворим), метанол (легко растворим), этанол 96% (растворим). Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

4.1.3. Прозрачность и цветность

Прозрачность и степень мутности (прозрачность), а также степень окраски (цветность) растворов определяли в соответствии с ГФ РФ XIV [8].

Для каждой из трех серий субстанции проводили по шесть испытаний. Для осуществления оценки данных показателей из каждого испытуемого образца Эналаприла малеата был приготовлен 1%-й водный раствор (0,1 г вещества на 10 мл воды).

Все приготовленные растворы СО Эналаприла малеата являлись прозрачными относительно растворителя или не превышали опалесценцию (мутность) относительно свежеприготовленного эталона I, а также являлись бесцветными в рамках проведения испытания на цветность относительно растворителя. При проведении исследований не наблюдалось изменений вышеперечисленных показателей, что может указывать на постоянство состава СО.

По итогам проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Прозрачность» была установлена норма: 1%-й водный раствор вещества (0,1 г в 10 мл воды) должен быть прозрачным.

В результате проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Цветность» была установлена норма: раствор, полученный в испытании «Прозрачность», должен быть бесцветным.

Установленные нормы подлежат включению в спецификацию СО.

4.1.4. Температура плавления

Изучение температуры плавления исследуемых образцов проводили в соответствии с ГФ РФ XIV капиллярным методом [8].

Достаточное количество предварительно высушенных испытуемых образцов препарата подвергалось плавлению в интервале 135 – 155° С.

Скорость подъема температуры составляла 1°С в минуту.

Каждый испытуемый образец субстанции Эналаприла малеата четко и плавно переходил из твердого состояния в жидкое в пределах 2 – 3° С без видимых признаков разложения.

Каждую из трех серий субстанции анализировали в шести повторностях, конечный результат определяли по среднему значению. Результаты испытаний представлены в Таблице 42. По итогам проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Температура плавления» была установлена норма: от 142,0° С до 146,0° С. Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

Таблица 42 – Температура плавления испытуемых образцов Эналаприла малеата

№ серии	Температура плавления, °С
1Э	143,1 – 144,6
2Э	142,7 – 143,5
3Э	143,0 – 144,9

4.1.5. Удельное вращение

Анализ структуры Эналаприла малеата позволил установить наличие трех асимметрических атомов углерода, что может определять оптическую активность вещества. По этой причине рационально проводить определение удельного вращения растворов исследуемых образцов.

Проводили определение и рассчитывали удельное вращение 1%-го раствора исследуемых образцов Эналаприла малеата в метаноле в соответствии с ГФ РФ XIV в пересчете на сухое вещество [8].

Для каждой из трех серий субстанции проводили по шесть испытаний, конечный результат определяли по среднему значению. Результаты тестирования представлены в Таблице 43. По итогам проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Удельное вращение» была установлена норма: от $-41,0^{\circ}$ до $-43,0^{\circ}$ в пересчете на сухое вещество для 1%-го раствора вещества в метаноле. Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

Таблица 43 – Удельное вращение испытуемых образцов Эналаприла малеата

№ серии	Удельное вращение ($\pm \sigma$), °
1Э	$-42,0 \pm 0,3$
2Э	$-41,9 \pm 0,2$
3Э	$-42,3 \pm 0,2$

4.1.6. Содержание воды

В рамках определения чистоты в исследуемых образцах Эналаприла малеата устанавливали содержание воды в соответствии с ГФ РФ XIV на приборе для титрования по методу К. Фишера [8].

Каждую из трех серий субстанции анализировали в шести повторностях, конечный результат определяли по среднему значению. Результаты испытаний представлены в Таблице 44. По итогам проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Содержание

воды» была установлена норма: не более 0,1%. Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

Исследование данного показателя и его дальнейшее включение в перечень норм контроля качества СО Эналаприла малеата обусловлено актуальными требованиями ведущих фармакопей.

Таблица 44 – Содержание воды в испытуемых образцах Эналаприла малеата

№ серии	Содержание воды ($\pm \sigma$), %
1Э	0,019 \pm 0,002
2Э	0,027 \pm 0,001
3Э	0,020 \pm 0,002

4.1.7. Сульфатная зола

В рамках определения чистоты в исследуемых образцах Эналаприла малеата устанавливали содержание сульфатной золы в соответствии с ГФ РФ XIV [8].

Для каждой из трех серий субстанции проводили по шесть испытаний, конечный результат определяли по среднему значению. Результаты исследования представлены в Таблице 45. Для контроля качества СО по показателю «Сульфатная зола» была установлена норма: не более 0,05%. Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

Таблица 45 – Содержание сульфатной золы в испытуемых образцах Эналаприла малеата

№ серии	Содержание сульфатной золы ($\pm \sigma$), %
1Э	0,043 \pm 0,001
2Э	0,046 \pm 0,001
3Э	0,039 \pm 0,002

4.1.8. Потеря в массе при высушивании

В рамках определения чистоты в исследуемых образцах Эналаприла малеата устанавливали потерю в массе гравиметрическим методом в соответствии с ГФ РФ XIV ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании», способ 3 [8]. Высушивание около 1 г вещества (точная навеска) проводили в вакуум-сушильном шкафу на протяжении 3 часов при постоянной температуре 60° С при значении остаточного давления не выше 20 мм. рт. ст.

Каждую из трех серий субстанции анализировали в шести повторностях, конечный результат определяли по среднему значению. Результаты испытаний представлены в Таблице 46.

Таблица 46 – Потеря в массе при высушивании испытуемых образцов Эналаприла малеата

№ серии	Потеря в массе при высушивании ($\pm \sigma$), %
1Э	$0,055 \pm 0,001$
2Э	$0,108 \pm 0,002$
3Э	$0,049 \pm 0,001$

4.1.9. Тяжелые металлы

В рамках определения чистоты в исследуемых образцах Эналаприла малеата устанавливали содержание тяжелых металлов. Испытание проводили на зольном остатке, который был получен после сжигания 1,0 г каждого испытуемого образца, по методу 1 с использованием эталонного раствора 1 в соответствии с ГФ РФ XIV [8].

Исследование проводили в шести повторностях для каждой из трех серий субстанции. Результаты испытаний представлены в Таблице 47. По итогам проведенных испытаний для контроля качества СО по показателю «Тяжелые металлы» была установлена норма: не более 0,001%. Установленная норма подлежит включению в спецификацию СО.

Таблица 47 – Содержание тяжелых металлов в испытуемых образцах Эналаприла малеата

№ серии	Содержание тяжелых металлов, %
1Э	$\leq 0,001$
2Э	$\leq 0,001$
3Э	$\leq 0,001$

4.2. Комплексный подход к оценке спектральных характеристик для проведения идентификации исследуемых образцов Эналаприла малеата

Для осуществления оценки спектральных характеристик исследуемых образцов были выбраны следующие методы: ИК-спектроскопия, Масс-спектрометрия (с конкретным типом ионизации), ЯМР-спектроскопия (^1H , ^{13}C). Совместное применение таких методик, как ИК-, ЯМР-спектроскопия и Масс-спектрометрия, позволило провести комплексную и надежную идентификацию анализируемых образцов и использовать данные методы в последующем контроле качества СО, что несомненно будет гарантировать качество производимой продукции и ее пригодность для выполнения поставленных задач.

4.2.1. ИК-спектроскопия

При изучении спектральных характеристик исследуемых образцов в области от 4000 см^{-1} до 400 см^{-1} применяли ИК-Фурье спектрометр IRAffinity-1S (Shimadzu Corporation, Япония) с программным обеспечением LabSolutions IR. Пробу готовили смешиванием в соотношении 1-3 мг исследуемого образца вещества на 150-200 мг инертного наполнителя (калия бромид) с последующим прессованием в форму диска. Образцы каждой серии анализированы в трех повторностях [35]. Испытания проводили согласно ГФ РФ XIV [8].

Типичный ИК-спектр исследуемых образцов Эналаприла малеата изображен на Рисунке 34.

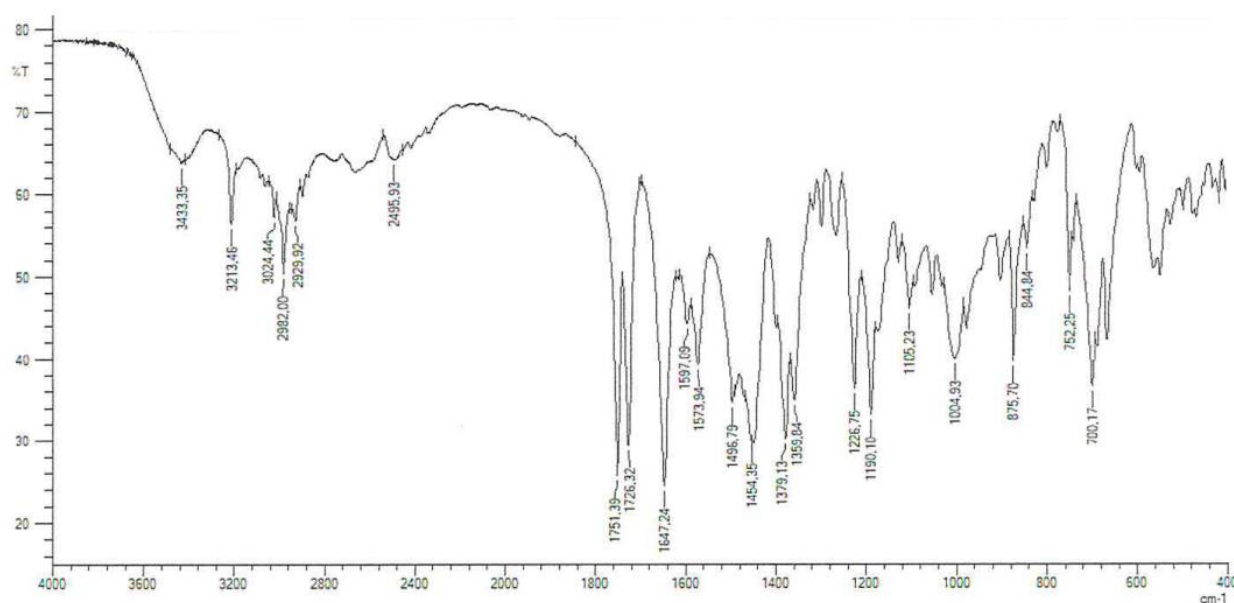


Рисунок 34 – Типичный ИК-спектр исследуемых образцов Эналаприла малеата

Отмечены валентные колебания $C-H$ связей метиленовых, метиновых, а также метильных групп в диапазоне от 2982 см^{-1} до 2930 см^{-1} . Валентные колебания подвижных $N-H$ протонов в соединении соотносились с полосой поглощения в области 3435 см^{-1} . Валентные колебания $C-H$ связей в ароматическом кольце вещества соотносились с полосами поглощения, которые находятся в диапазоне от 3213 см^{-1} до 3024 см^{-1} . Присутствие валентных колебаний $-OH$ связей в карбоксильных группах ($-COOH$) обуславливало широкую полосу поглощения в области от 3435 см^{-1} до 2498 см^{-1} . Деформационные колебания $-OH$ связей при карбоксильных группах ($-COOH$) соотносились с широкой полосой поглощения в области 1005 см^{-1} . Валентные колебания $C=O$ связей сложноэфирной $-COOEt$ и карбоксильной $-COOH$ групп соотносились с полосами поглощения при 1751 см^{-1} и 1726 см^{-1} соответственно. Полосы поглощения в области 1227 см^{-1} и 1190 см^{-1} соотносились соответственно с валентными колебаниями $C(=O)-O$ и $O-C-C$ связей характерными для сложноэфирной группы $-COOEt$. Полоса поглощения около 1647 см^{-1} описывала валентные колебания $C=O$ амидной связи. Валентные колебания двойной связи

(-C=C-) в структуре малеиновой кислоты соотносились с полосой поглощения при 1574 см^{-1} . Полосы поглощения в области 1597 см^{-1} и 1360 см^{-1} связаны с валентными колебаниями связей ароматических фрагментов $C_{Ar}-C_{Ar}$. Полоса поглощения при 1497 см^{-1} соотносилась с деформационными симметричными колебаниями $C-H$ связей метиленовых групп. Деформационными антисимметричными и симметричными колебаниями $C-H$ связей метильных групп соотносились с полосами поглощения в области 1454 см^{-1} и 1379 см^{-1} . Внеплоскостные деформационные колебания $C-H$ связей ароматического кольца соотносились с полосами поглощения в диапазоне от 876 см^{-1} до 845 см^{-1} . Область около 752 см^{-1} соотносилась с плоскостными деформационными колебаниями $C-H$ связей метиленовых групп [35].

В Таблице 48 показано соотнесение значений полос поглощения ИК-спектра для исследуемых образцов.

Все снятые ИК-спектры исследуемых образцов подтверждали химическое строение Эналаприла малеата. Метод ИК-спектроскопии подлежит включению в раздел «Подлинность» спецификации СО. ИК-спектр СО Эналаприла малеата должен совпадать с предложенным ИК-спектром и не должен противоречить химической структуре Эналаприла малеата [35].

Таблица 48 – Отнесение полос поглощения в ИК-спектрах исследуемых образцов Эналаприла малеата

Максимумы полос поглощения валентных (n), внеплоскостных деформационных (w), деформационных (d) (d_s - симметричных, d_{as} - антисимметричных), плоскостных деформационных (r) колебаний, см^{-1}
3435 (nN-H, -NH), 3213-3024 (nC-H, -CH _{Ar}), 2982-2930 (nC-H, -CH ₃ , -CH ₂ , -CH), 3435-2498 (nO-H, -COOH), 1751 (nC=O, -COOEt), 1726 (nC=O, -COOH), 1647 (nC=O, NC=O) 1574 (nC=C, -HC=CH-), 1597 и 1360 (nC-C, C _{Ar} -C _{Ar}), 1497 (d_s C-H, -CH ₂), 1454 (d_{as} C-H, -CH ₃), 1379 (d_s C-H, -CH ₃), 1227 (nC(=O)-O, -COOEt), 1190 (nO-C-C, -COOEt), 1105 (nC-N, -C-N-), 1005 (dO-H, -COOH), 876-845 (wC-H, -CH _{Ar}), 752 (rC-H, -CH ₂), 700 (wC-H, -HC=CH-)

4.2.2 ЯМР-спектроскопия

Для анализа методом ЯМР-спектроскопии готовили рабочие растворы с концентрацией около 50 ммоль/л путем растворения исследуемого образца Эналаприла малеата массой около 25 мг в 1 мл дейтерированного диметилсульфоксида. Растворенный образец помещали в стеклянную ампулу для дальнейшего анализа.

Снятие и обработка ^1H и ^{13}C спектров испытуемых растворов проводилось на спектрометре Bruker AVANCE III 400MHz Ultra Shield Plus при помощи программного обеспечения TopSpin. ЯМР-спектр ^1H снимали на частоте 400 МГц, в то время как ЯМР-спектр ^{13}C снимали на частоте 100 МГц [35].

Исследованию подвергалась каждая серия субстанции в количестве трех образцов. Анализ осуществляли согласно основным принципам изложенным в ГФ РФ XIV [8].

Проводилось соотнесение полученных сигналов ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров (Таблица 49) со структурой исследуемого образца согласно порядковой нумерации атомов в молекуле (Рисунок 35).

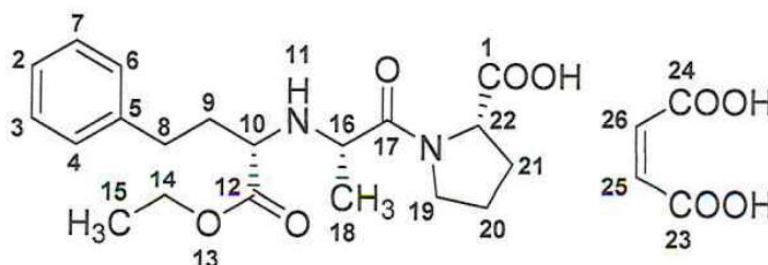


Рисунок 35 – Номерное отнесение атомов в молекуле Эналаприла малеата

Довольно непростая картина ^1H ЯМР-спектра (Рисунок 36) определялась присутствием трех стереогенных центров в веществе. Данным обстоятельством определяется диастереотопное состояние протонов, которые относятся к насыщенной углеродной цепи и циклу. Дополнительно, ввиду затрудненного вращения рядом с амидной связью $OC17-N$, в растворе образца выявлялись два заторможенных конформера, которые находились, делая вывод по относительным интегральным интенсивностям сигналов, в соотношении 3:1 или 0,75:0,25.

Группа из двух мультиплетов в диапазоне 7,18 - 7,34 м.д. со значениями относительных интегральных интенсивностей 3 и 2 соотносилась с протонами, располагающимися в ароматическом кольце вещества.

Отдельно расположенный синглет со значением 6,09 м.д. четко относился к CH группам в структуре малеиновой кислоты. Проявление протонов метильных групп при $-CH_3$ 15 и $-CH_3$ 18 на полученном спектре характеризовалось триплетом со значением 1,24 м.д. и парой дублетов со значениями 1,35 м.д. и 1,40 м.д.

На основании информации о химических сдвигах, а также структуре мультиплетов, были надежно сопоставлены почти все сигналы из полученного спектра с конкретными атомами в веществе.

Стоит отметить, что подвижные протоны при NH 11, $COOH$ 1 Эналаприла, а также протоны карбоксильных групп в структуре малеиновой кислоты, усреднялись с протонами воды, которая находилась в растворителе (дейтерированном диметилсульфоксиде) в качестве примеси, и размывались в достаточно широкий сигнал, который почти не отличался от нулевой линии [35].

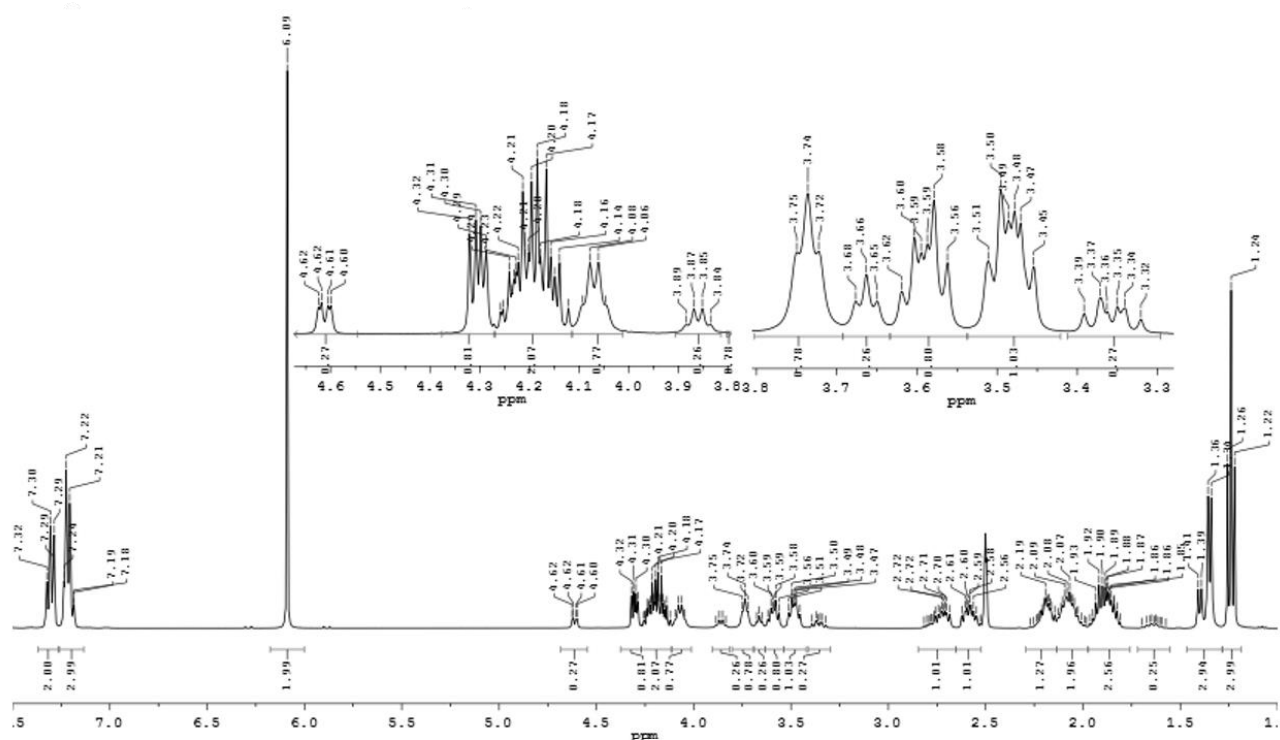


Рисунок 36 – ^1H ЯМР-спектр анализируемого образца Эналаприла малеата

При рассмотрении ^{13}C ЯМР-спектра, который представлен на Рисунке 37, описаны лишь сигналы основного конформера.

Количество выявленных сигналов в ^{13}C ЯМР-спектре около двух раз превосходило число магнитно-неэквивалентных атомов углерода вещества.

Рассматривая полученный спектр, можно обнаружить, что все сигналы делились на две группы: основные (высокое отношение сигнала к шуму, интенсивные) и минорные. Вместе с тем, как в случае с ^1H ЯМР- спектром минорные сигналы сопутствовали именно сигналам, которые соотносились с алифатической частью молекулы, в свою очередь, сигналы, четко относящиеся к ароматическому кольцу, а также малеиновой кислоте, не подвергались «двоению».

Данная картина определялась присутствием в анализируемом растворе двух заторможенным конформеров в результате затрудненного вращения рядом со стерически загруженной амидной связью *OC17-N*

Структура малеиновой кислоты в части атомов углерода с двойной связью ($-\text{CH}=\text{CH}-$) и присутствием двух карбоксильных групп ($2\times\text{COO}$) соотносилась с двумя интенсивными пиками со значениями 132,7 м.д. и 166,4 м.д. соответственно. Сигналы со значениями 169,4 м.д., 170,9 м.д. и 172,3 м.д. можно соотнести с атомами углерода *C1*, *C12* и *C17* при карбоксильных группах. Пики сигналов со значениями 140,5 м.д. (*C5*), 128,0 м.д. (CH-Ar), 127,9 м.д. (CH-Ar) и 125,7 м.д. (*C2*) соотносились с фенильным кольцом молекулы. Сигналы углеродов метильных групп вещества были определены при значениях 13,6 м.д. и 16,1 м.д..

Стоит отметить, что оставшиеся несоотнесенные атомы углерода не получилось точно соотнести с другими сигналами на полученном спектре, но количество сигналов было соразмерно несоотнесенному числу магнитно-неэквивалентных атомов углерода, и показатели химических сдвигов не говорили о противоречии химической структуре исследуемого вещества (Таблица 49) [35].

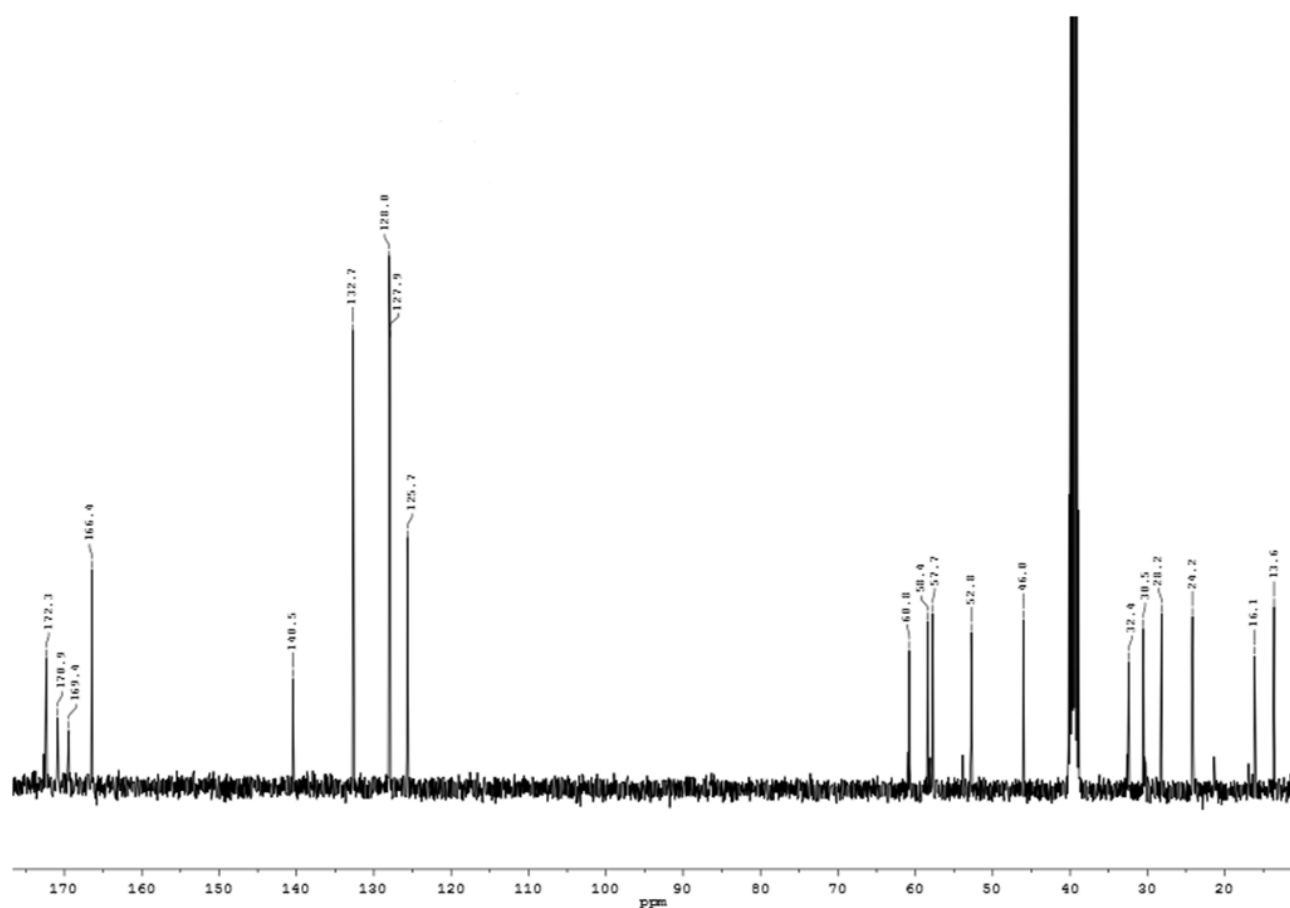


Рисунок 37 – ^{13}C ЯМР-спектр анализируемого образца Эналаприла малеата

Таблица 49 – Описание и отнесение сигналов в ЯМР-спектрах ^1H и ^{13}C исследуемых образцов Эналаприла малеата

Наименование ЯМР-спектра Эналаприла малеата	Химический сдвиг (d, м.д.) с мультиплетностью в виде дублета (д), дублета дублетов (дд), дублета триплетов (дт), квартета (к) мультиплета (м), синглета (с), т-триплета (т), КССВ (J, Гц)
^1H	1,24 т (3H, протоны при C15, J 7,1 Гц), 1,37 и 1,40 2хд (3H, протоны при C18, J 6,8 Гц), 1,57-1,71, 1,80-1,97, 1,97-2,14, 2,14-2,28 м (6H, протоны при C9, C20, C21), 2,52-2,63, 2,66-2,83 м (2H, протоны при C8), 3,36, 3,48, 3,59 дт (2H, протоны при C19, J 11,8, 8,1; 9,5, 6,5; 10,0, 6,5 Гц), 3,66, 3,74 т

Продолжение Таблицы 49

	(¹ H, протон при C10, J 5,3; 5,5 Гц), 3,86, 4,07 к (¹ H, протон при C16, J 6,5; 5,9 Гц), 4,11-4,27 м (2H, протоны при C14), 4,30, 4,61 дд (¹ H, протон при C22, J 8,6, 4,8; 7,7, 2,4 Гц), 6,09 с (2H, протоны при C25 и C26), 7,18-7,26 м (3H, протоны при C2, C4, C6), 7,27-7,34 м (2H, протоны при C3 и C7)
¹³ C	13,6 (C15), 16,1 (C18), 24,2 (C8), 28,2 (C9), 30,5 (C20), 32,4 (C21), 46,0 (C19), 52,8 (C16), 57,7 (C10), 58,4 (C14), 60,8 (C22), 125,7 (C2), 127,9 и 128,0 (C3,C4,C6,C7), 132,7 (C25 и C26), 140,5 (C5), 166,4 (C23 и C24), 169,4 (C1), 170,9 (C12), 172,3 (C17)

Все полученные ¹H и ¹³C ЯМР-спектры исследуемых образцов подтверждали химическое строение Эналаприла малеата. Метод ЯМР-спектроскопии подлежит включению в раздел «Подлинность» спецификации СО. Положение и мультиплетность сигналов ЯМР-спектров ¹H и ¹³C СО Эналаприла малеата должны совпадать с предложенными ЯМР-спектрами ¹H и ¹³C и не должны противоречить химической структуре Эналаприла малеата [35].

4.2.3 Масс-спектрометрия

Проведение масс-спектрометрического анализа растворов с рабочими концентрациями 0,001 мг/мл осуществляли на жидкостном хроматографе Shimadzu Nexera с использованием масс-селективного детектора Shimadzu LCMS-8050. Для образования ионов с отрицательным и положительным зарядом применялась ионизация электрораспылением с нагреванием (HESI). Исследованию подвергалась каждая серия субстанции в количестве трех повторностях [37].

В Таблицах 50 и 51 описаны условия хроматографирования и детектирования при проведении идентификации исследуемых образцов Эналаприла малеата. Информация о градиентной программе элюирования представлена в Таблице 52 [37].

Анализ осуществляли согласно основным принципам изложенным в ГФ РФ XIV [8].

Таблица 50 – Условия хроматографирования для растворов исследуемых образцов Эналаприла малеата

Параметр	Условия
Прибор	Жидкостной хроматограф высокого давления
Колонка	2,5 мкм, 2,1 × 100 мм, XBridge BEH C18, (Waters, США)
Температура колонки	40 °С
Подвижная фаза	Смесь растворов А и Б
Скорость потока	0,3 мл/мин

Продолжение Таблицы 50

Объем анализируемой пробы	1,0 мкл
Тип элюирования	Градиентный

Таблица 51 – Условия детектирования для исследуемых образцов Эналаприла малеата

Параметр	Условия
Тип детектора	Масс-селективный
Тип ионизации	HESI
Температура интерфейса	300 °C
Режим сканирования	Полный ионный ток
Скорость сканирования	0,1 с
Диапазон сканирования	100-1000 m/z

Таблица 52 – Описание градиентной программы элюирования в масс-спектрометрическом анализе СО Эналаприла малеата

Ступень, №	Время, мин	Раствор А, %	Раствор Б, %	Режим
1	0	90	10	Изократический (Предварительное уравнивание колонки)
2	2	90	10	Изократический
3	11	10	90	Линейный градиент
4	13	10	90	Изократический
5	14	90	10	Линейный градиент
6	17	90	10	Изократический (Уравнивание колонки)

ПФ состояла из смеси раствора А и Б. Раствор А готовили, помещая 1,0 мл муравьиной кислоты в мерную колбу вместимостью 1 л, предварительно наполненную небольшим количеством воды I типа. Конечный объем раствора доводили водой I типа до метки, затем фильтровали с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм и осуществляли дегазацию ультразвуком. Для приготовления раствора Б фильтровали ацетонитрил с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм с последующей дегазацией ультразвуком. Растворитель представлял собой смесь ацетонитрила и воды I типа в соотношении к объемам 5:95.

Приготовление растворов исследуемых образцов для снятия масс-спектров осуществлялось следующим образом: около 0,005 г испытуемого образца растворяли в растворителе в мерной колбе вместимостью 50 мл. Конечный объем раствора доводили растворителем до метки и

фильтровали с помощью мембранного фильтра PTFE 0,45 мкм. Отбирали 1,0 мл полученного раствора в мерной колбу вместимостью 100 мл, проводили смешивание и доведение до метки растворителем [37].

При обработке полученного масс-спектра, снятого по типу положительной ионизации (HESI⁺), был определен основной пик молекулярного иона по отношению массы к заряду (m/z): $[M+H]^+ = 377 m/z$ (Рисунок 38). Полученное значение оказалось аналогичным теоретически рассчитанному. Фрагментация основного молекулярного иона на тандемном спектре показывала присутствие следующих ионов: $303 m/z$ ($C_{17}H_{23}N_2O_3^+$), $234 m/z$ ($C_{14}H_{20}NO_2^+$), $160 m/z$ ($C_{11}H_{14}N^+$), $134 m/z$ ($C_9H_{12}N^+$), $130 m/z$ ($C_9H_{10}N^+$), $117 m/z$ ($C_9H_9^+$) и $91 m/z$ ($C_7H_7^+$) (Рисунок 39). Согласно полученным результатам была предложена вероятная схема процесса фрагментации соединения (Рисунок 40) [37].

При обработке полученного масс-спектра, снятого по типу отрицательной ионизации (HESI⁻), был определен основной пик молекулярного иона по отношению массы к заряду (m/z): $[M-H]^- = 375 m/z$ (Рисунок 41). Полученное значение оказалось аналогичным теоретически рассчитанному. Фрагментация основного молекулярного иона на тандемном спектре показывала присутствие следующих ионов: $257 m/z$ ($C_{16}H_{21}N_2O_3^-$), $186 m/z$ ($C_{12}H_{12}NO^-$), $170 m/z$ ($C_{12}H_{12}N^-$), $126 m/z$ ($C_7H_{12}NO^-$), $114 m/z$ ($C_5H_8NO_2^-$) и $91 m/z$ ($C_7H_7^-$) (Рисунок 42). Согласно полученным результатам была предложена вероятная схема процесса фрагментации соединения (Рисунок 43) [37].

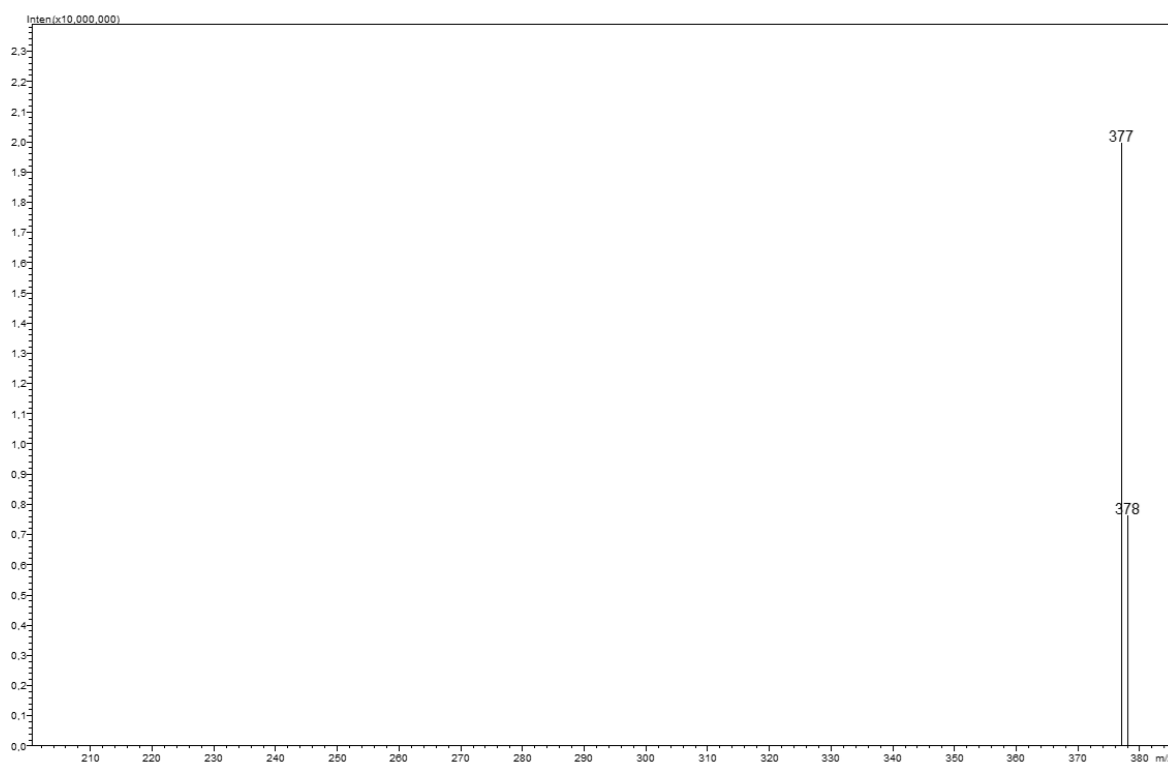


Рисунок 38 – Масс-спектр анализируемого образца Эналаприла малеата (ВЭЖХ-МС, HESI⁺)

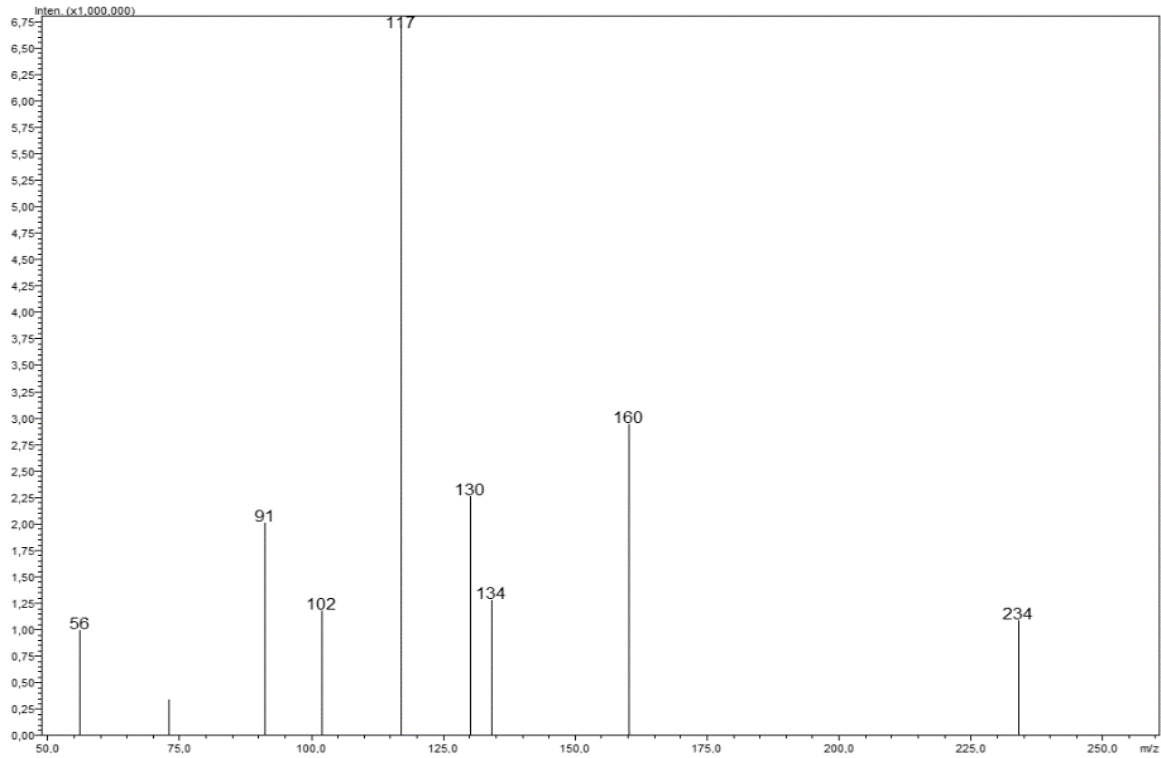


Рисунок 39 – Фрагментации молекулярного иона $[M+H]^+ = 377 \text{ m/z}$ анализируемого образца Эналаприла малеата (ВЭЖХ-МС, HESI⁺)

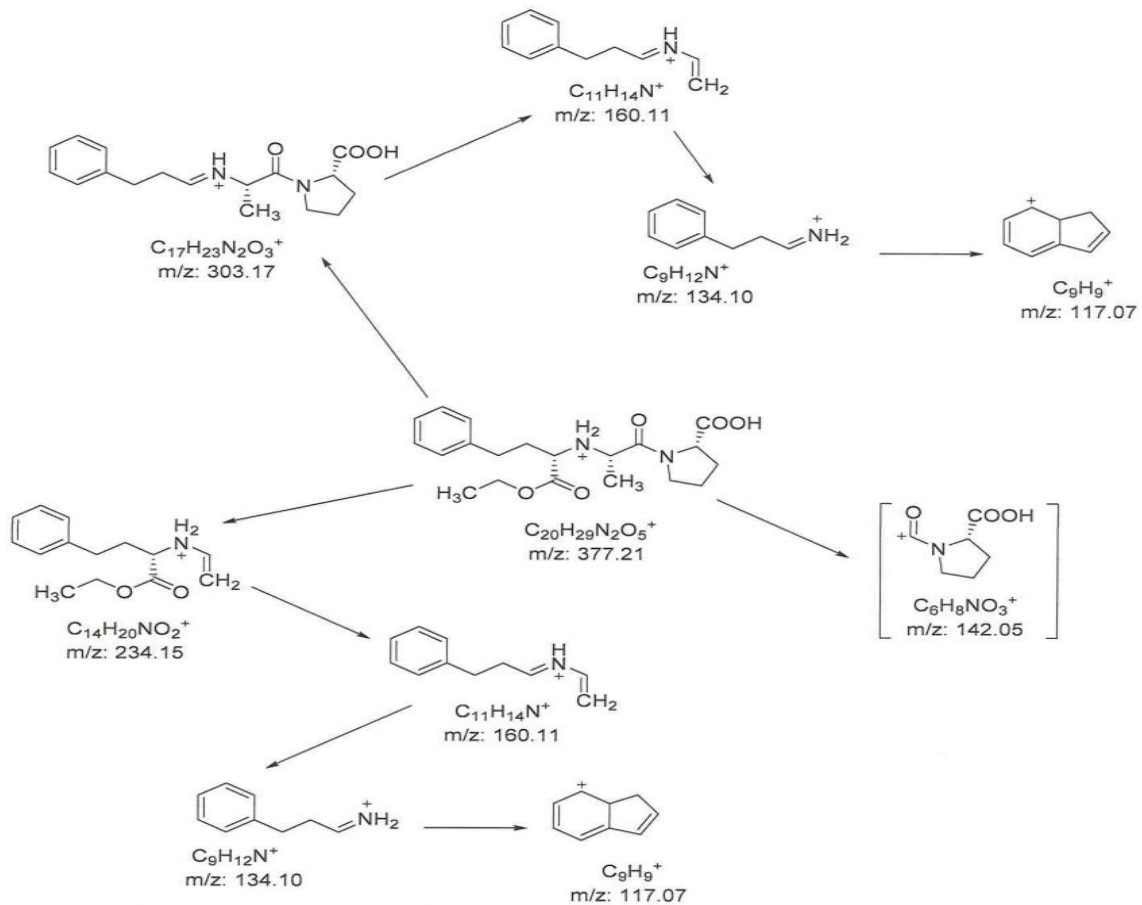


Рисунок 40 – Модель фрагментации основного молекулярного иона $[M+H]^+ = 377 \text{ m/z}$ анализируемого образца Эналаприла малеата (ВЭЖХ-МС, HESI⁺)

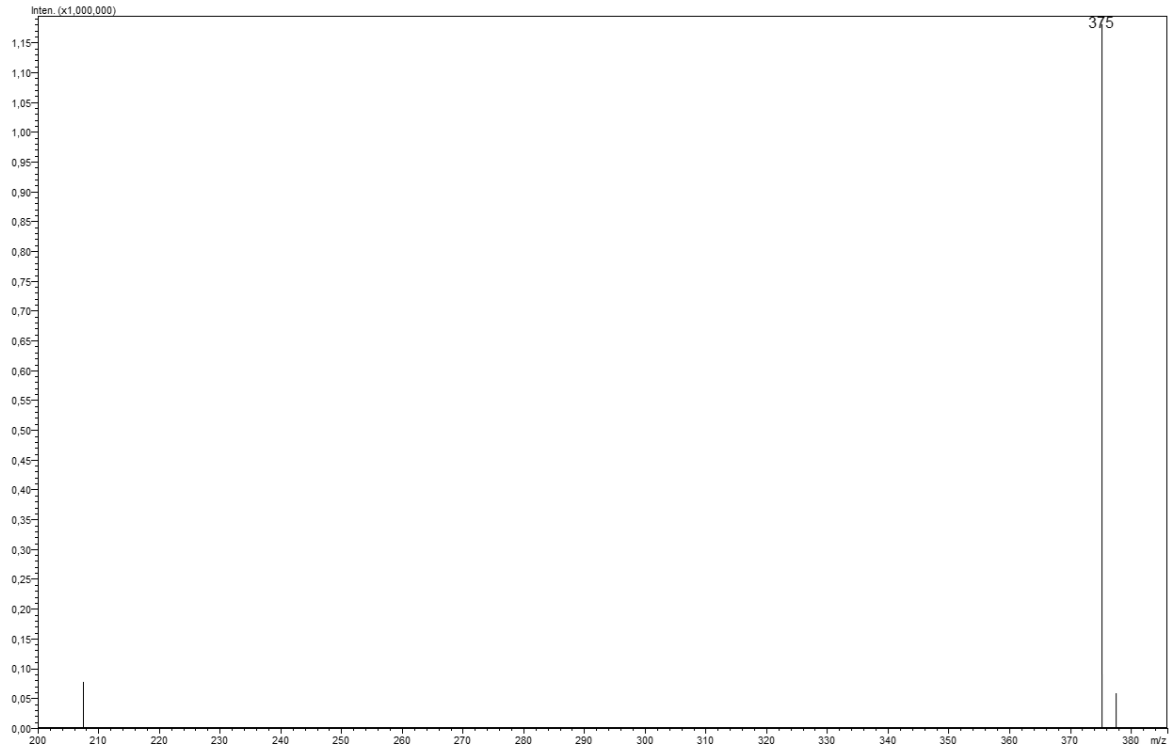


Рисунок 41 – Масс-спектр анализируемого образца Эналаприла малеата (ВЭЖХ-МС, HESI⁻)

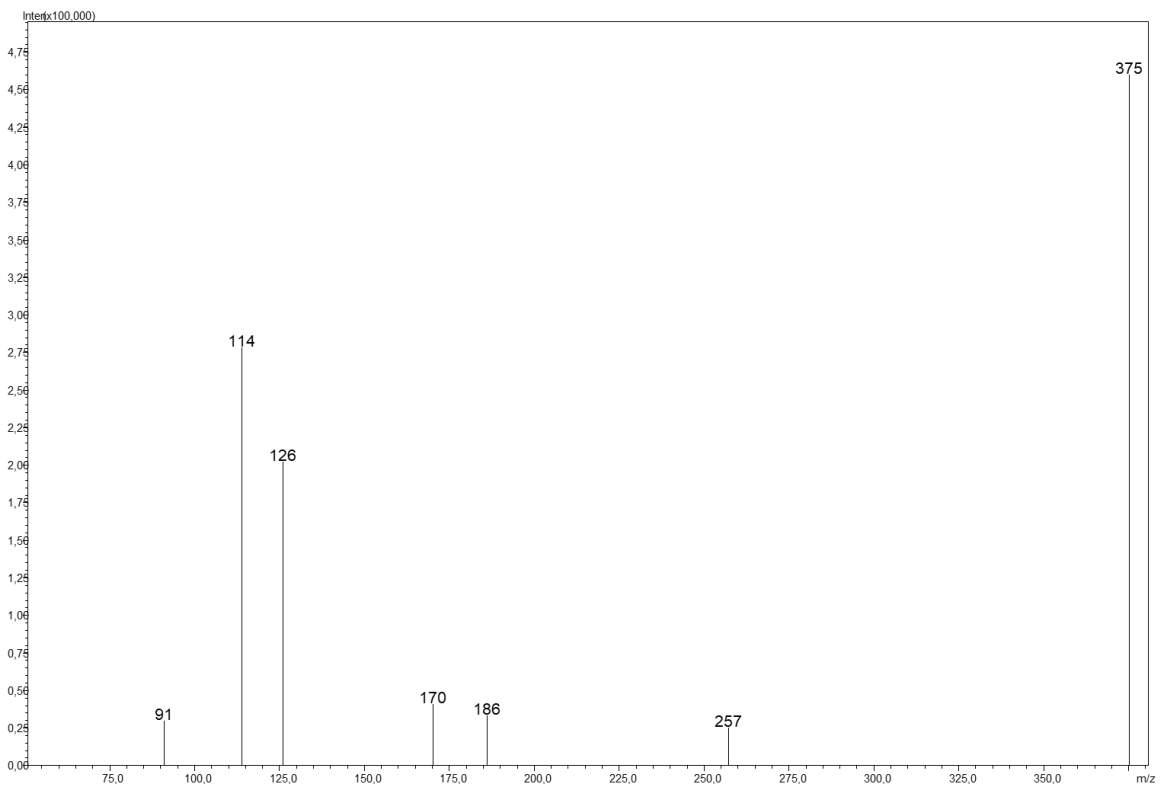


Рисунок 42 – Фрагментации молекулярного иона $[M-H]^- = 375 \text{ m/z}$ анализируемого образца Эналаприла малеата (ВЭЖХ-МС, HESI⁻)

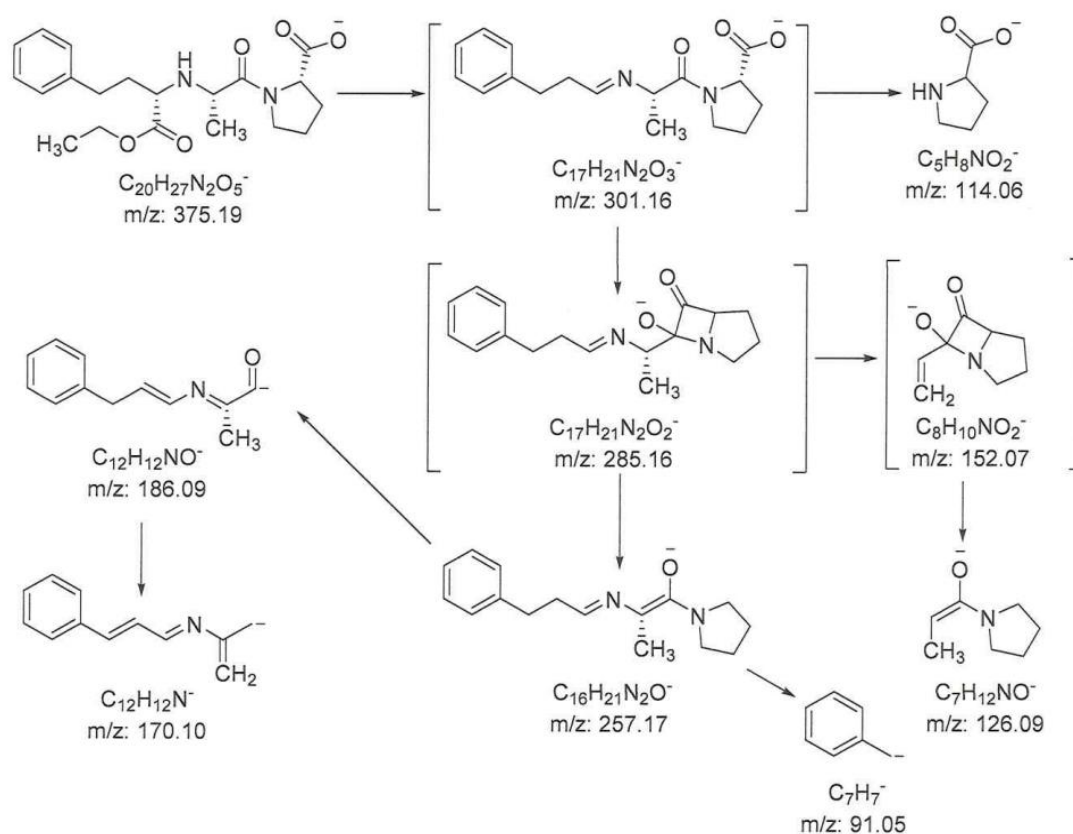


Рисунок 43 – Вероятная схема фрагментации основного молекулярного иона $[M-H]^- = 375$ m/z анализируемого образца Эналаприла малеата (ВЭЖХ-МС, HESI)

Все полученные масс-спектры исследуемых образцов подтверждали химическое строение Эналаприла малеата. Метод масс-спектрометрии подлежит включению в раздел «Подлинность» спецификации СО. Значения сигналов масс-спектров СО Эналаприла малеата должны совпадать с предложенными масс-спектрами и не должны противоречить химической структуре Эналаприла малеата [37].

4.3. Применение хроматографических методов в анализе исследуемых образцов Эналаприла малеата

Хроматографические исследования разрабатываемых СО Эналаприла малеата применялись при определении примесей в исследуемых образцах методом ВЭЖХ, а также остаточных органических растворителей методом ГХ.

4.3.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе исследуемых образцов Эналаприла малеата

Среди ключевых подходов, которые применяют к аттестации СО в рамках определения чистоты, находится установление содержания посторонних примесей, основными путями образования которых являются процессы синтеза и/или деструкции соответствующих СО.

4.3.1.1. Разработка хроматографической методики определения посторонних примесей

Основываясь на результатах анализа данных ранее описанных методик, имеющих аналогичное или смежное применение, была разработана методика для определения предполагаемых посторонних примесей (Таблица 53) с использованием метода ВЭЖХ.

Разделение компонентов растворов исследуемых образцов Эналаприла малеата проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu Nexera с использованием детектора UV/VIS SPD-40.

Условия и последовательность хроматографирования исследуемых образцов представлены в Таблице 54 и Таблице 55 соответственно. Информация о градиентной программе элюирования представлена в Таблице 56.

Таблица 53 – Описание предполагаемых примесей СО Эналаприла малеата

Структурная формула	Кодировка примеси	Химическое наименование
	Примесь А	(2S)-1-[(2S)-2-[[[(1R)-1-(этоксикарбонил)-3-фенилпропил]амино]пропаноил]пироллидин-2-карбоновая кислота
	Примесь С	(2S)-1-[(2S)-2-[[[(1S)-1-карбокси-3-фенилпропил]амино]пропаноил]пироллидин-2-карбоновая кислота
	Примесь G	(2S)-2-[[[(1S)-3-циклогексил-1-(этоксикарбонил)пропил]амино]пропановая кислота
	Примесь H	(2S)-1-[(2S)-2-[[[(1S)-3-циклогексил-1-(этоксикарбонил)пропил]амино]пропаноил]пироллидин-2-карбоновая кислота

Таблица 54 – Условия хроматографирования посторонних примесей методом ВЭЖХ

Параметр	Условие
Прибор	Жидкостной хроматограф высокого давления
Колонка	5 мкм, 4,1 × 150 мм, Hamilton PRP-1 C18, (Phenomenex, США)
Тип детектора	УФ
Длина волны	215 нм
Температура колонки	70 °С
Подвижная фаза	Смесь растворов А и Б
Тип элюирования	Градиентный
Скорость потока	1,0 мл/мин
Объем анализируемой пробы	50 мкл

Таблица 55 – Последовательность хроматографирования при определении посторонних примесей методом ВЭЖХ

№	Наименование раствора	Количество вколов	Примечание
1	Холостая проба	Не менее 2	Уравновешивание хроматографической системы
2	Контрольный раствор	1	Проверка пригодности хроматографической системы/идентификация примесей
3	Раствор сравнения D (1)	1	
4	Раствор сравнения А	Не менее 5	
5	Раствор сравнения В	1	
6	Раствор сравнения С	1	
7	Холостая проба	Не менее 1	Контроль массопереноса
8	Раствор сравнения А (1, 2, 3 и т.д.)	1	Определение примесей (за исключением примеси G)
9	Испытуемый раствор А (1, 2, 3 и т.д.)	1	
10	Раствор сравнения D (1)	1	Определение примеси G
11	Раствор сравнения D (2)	1	
12	Испытуемый раствор В (1, 2, 3 и т.д.)	1	

Таблица 56 – Описание градиентной программы элюирования в определении посторонних примесей СО Эналаприла малеата методом ВЭЖХ

Степень, №	Время, мин	Раствор А, %	Раствор Б, %	Режим
1	0	95	5	Изократический (Предварительное уравновешивание колонки)
2	3	95	5	Изократический
3	23	40	60	Линейный градиент

Продолжение Таблицы 56

4	30	40	60	Изократический
5	31	95	5	Линейный градиент
6	40	95	5	Изократический (Уравновешивание колонки)

Для приготовления раствора А осуществляли фильтрацию ацетонитрила через мембранный фильтр 0,45 мкм (PTFE) с последующим смешиванием с буферным раствором Б в соотношении объемов 5:95. После проведения смешивания компонентов раствора А проводили дегазацию раствора с помощью ультразвука.

Для приготовления буферного раствора Б отбирали навеску натрия дигидрофосфата моногидрат массой 2,8 г в мерную колбу вместимостью 1 л. Проводили предварительное растворение вещества водой I типа объемом 950 мл. После проведения предварительного растворения доводили рН полученного раствора до значения $6,8 \pm 0,1$ с использованием 1М натрия гидроксида, с последующим доведением конечного объема раствора водой I типа до метки, перемешивали и фильтровали полученный раствор через мембранный фильтр 0,45 мкм (Supor PES).

Раствор Б готовили следующим образом: предварительно отфильтрованный через мембранный фильтр 0,45 мкм (PTFE) ацетонитрил смешивали с буферным раствором Б в соотношении объемов 66:34 с последующей дегазацией ультразвуком.

Растворитель готовили путем смешивания предварительно отфильтрованного через мембранный фильтр 0,45 мкм (PTFE) ацетонитрила с буферным раствором А в соотношении объемов 5:95.

Для приготовления буферного раствора А отбирали навеску натрия дигидрофосфата моногидрат массой 2,8 г в мерную колбу вместимостью 1 л. Проводили предварительное растворение вещества водой I типа объемом 950 мл. После проведения предварительного растворения доводили рН полученного раствора до значения $2,5 \pm 0,1$ с использованием фосфорной кислоты концентрированной. Конечный объем полученного раствора доводили водой I типа до метки, осуществляли перемешивание раствора с последующим фильтрованием через мембранный фильтр 0,45 мкм (Supor PES).

Для получения необходимого объема холостой пробы осуществляли фильтрацию приготовленного растворителя через мембранный фильтр 0,45 мкм (PTFE).

Для приготовления испытуемого раствора А отбирали около 0,05 г (точная навеска) анализируемого образца в мерную колбу вместимостью 50 мл. В колбу добавляли небольшой объем растворителя и проводили растворение навески. После полного растворения твердого

вещества доводили конечный объем до метки растворителем, осуществляли фильтрование с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм (RC). Для осуществления анализа испытуемый раствор готовили не менее чем в шести повторностях, где для каждого раствора готовили раствор сравнения А.

Для приготовления раствора сравнения А отбирали аликвоту испытуемого раствора А в объеме 1,0 мл в мерную колбу вместимостью 100 мл. Осуществляли доведение объема раствора до метки с помощью растворителя, проводили перемешивание. Из полученного раствора отбирали аликвоту объемом 1,0 мл и помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл. Осуществляли доведение объема до метки с помощью растворителя, проводили перемешивание.

Для приготовления испытуемого раствора В отбирали около 0,1 г (точная навеска) анализируемого образца в мерную колбу вместимостью 20 мл. В колбу добавляли небольшой объем растворителя и проводили растворение навески. После полного растворения твердого вещества доводили конечный объем до метки растворителем, осуществляли фильтрование с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм (RC). Для осуществления анализа испытуемый раствор готовили не менее чем в шести повторностях.

Для приготовления раствора сравнения В отбирали навеску СО Эналаприла для проверки пригодности хроматографической системы (EP CRS) около 0,005 г (точная навеска) в мерную колбу вместимостью 5 мл. В колбу добавляли небольшой объем растворителя и проводили растворение навески. Конечный объем доводили до метки растворителем, осуществляли фильтрование с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм (RC).

Для приготовления раствора сравнения С содержимое флакона (0,024 мг) СО смеси примесей А (содержит примеси С и Н) (EP CRS) растворяли в 1 мл растворителя с проведением последующего фильтрования с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм (RC).

Для приготовления раствора сравнения D отбирали навеску СО G (EP CRS) около 0,002 г (точная навеска) в мерную колбу вместимостью 10 мл. В колбу добавляли небольшой объем растворителя и проводили растворение навески. После полного растворения твердого вещества доводили конечный объем до метки растворителем. Из полученного раствора отбирали аликвоту объемом 1,0 мл в мерную колбу вместимостью 20 мл. Проводили доведение конечного объема раствора с помощью растворителя, осуществляли перемешивание с последующим фильтрованием с помощью мембранного фильтра 0,45 мкм (RC). Раствор готовили не менее чем в двух повторностях (раствор сравнения D (1) и раствор сравнения D (2)).

Контрольный раствор готовили следующим образом: раствор сравнения А объемом 2,5 мл помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили конечный объем до метки растворителем.

Срок годности испытуемого, контрольного раствора и растворов сравнения составлял не более 24 ч в условиях хранения при температуре не выше 10 °С, исключая возможность замораживания.

Регистрировали и обрабатывали данные хроматограмм, полученных в условиях разработанной и валидированной методики. Идентификацию примесей проводили по хроматограммам растворов сравнения: идентификация примеси А в испытуемом растворе А проводилась по хроматограмме раствора сравнения В, примесей Н и С в испытуемом растворе А по хроматограмме раствора сравнения С, примеси G в испытуемом растворе В проводят по хроматограмме раствора сравнения D.

Оценку пригодности хроматографической системы выполняли по следующим критериям:

1. Отношение сигнал/шум (S/N), которое рассчитывалось по пику основного вещества, на хроматограмме контрольного раствора – не менее 20;
2. Отношение максимум/минимум между пиками Эналаприла и примеси А на хроматограмме раствора сравнения В – не менее 10;
3. Отношение сигнал/шум (S/N), которое рассчитывалось по пику примеси G на хроматограмме раствора сравнения D (1) – не менее 40;
4. Относительное стандартное отклонение значений времен удерживания пика основного вещества – не более 2 %, площади – не более 5 % ($n \geq 5$).

При условии выполнения вышеперечисленных критериев хроматографическая система считалась пригодной.

Допускалось уменьшение вводимого объема пробы для улучшения формы пика основного вещества и обеспечения соответствия требованиям пригодности хроматографической системы, если чувствительность применяемой хроматографической системы и прецизионность системы в условиях повторяемости остаются удовлетворительными.

Определение содержания примеси А (примеси С, Н, любая другая единичная примесь) в испытуемом образце (X, %), рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{S_x \cdot a_x \cdot 50 \cdot 1,0 \cdot 1,0 \cdot 100}{S_0 \cdot a_x \cdot 50 \cdot 100 \cdot 10} = \frac{S_x \cdot 0,1}{S_0},$$

где S_x – площадь пика примеси А (примеси С, Н, любая другая единичная примесь) на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика основного вещества на хроматограмме раствора сравнения А;

a_x – навеска испытуемого образца для приготовления испытуемого раствора, г.

Определение содержания примеси G в испытуемом образце (X, %), рассчитывали по следующей формуле:

$$X = \frac{S_x \cdot a_{rs} \cdot 1,0 \cdot 20 \cdot 100}{S_0 \cdot a_x \cdot 10 \cdot 20} = \frac{S_x \cdot a_{rs} \cdot 10}{S_0 \cdot a_x},$$

где S_x – площадь пика примеси G на хроматограмме испытуемого раствора B;

S_0 – площадь пика примеси G на хроматограмме раствора сравнения D;

a_x – навеска испытуемого образца для приготовления испытуемого раствора B, г;

a_{rs} – навеска СО примеси G для приготовления раствора сравнения D, г.

Не учитывали пики, совпадающие с пиками, которые были получены на хроматограмме холостой пробы, пики, площадь которых была менее площади пика основного вещества, выявленного на хроматограмме контрольного раствора (менее 0,025 %), а также пик малеиновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора A.

Проведена валидация методики согласно необходимым параметрам [9].

4.3.1.2. Валидация хроматографической методики определения посторонних примесей

Валидацию методики проводили в соответствии с ГФ РФ XIV, ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик [9].

В зависимости от метода количественного определения примеси (по количественному содержанию относительно СО или по предельному содержанию относительно основного вещества), был составлен план определяемых параметров валидации для каждой примеси.

Параметры валидации для каждой определяемой примеси приведены в Таблице 57.

Таблица 57 – Параметры валидации методики определения посторонних примесей Эналаприла малеата

Параметр валидации	Определяемое вещество			
	Примесь А	Примесь С	Примесь G	Примесь Н
Правильность			+	
Прецизионность				
• Повторяемость			+	
• Промежуточная прецизионность			+	
Специфичность	+	+	+	+
Предел обнаружения	+	+		+
Предел количественного определения			+	

Продолжение Таблицы 57

Линейность			+	
Аналитическая область			+	

Специфичность

При оценке специфичности исключают влияние прочих примесей и веществ на хроматографическое разделение и детектирование анализируемых веществ [9].

Для оценки специфичности рассчитывали параметры пригодности хроматографической системы согласно указаниям раздела 4.3.1.1.

Результаты проверки пригодности хроматографической системы приведены в Таблице 58.

Для проверки специфичности готовились модельные смеси испытуемого раствора с добавлением стандартных растворов С и D. Наличие основного вещества СО Эналаприла в растворах сравнения не повлияло на параметры хроматографического разделения и количественное определение посторонних примесей.

Таблица 58 – Результаты проверки пригодности хроматографической системы методики определения посторонних примесей исследуемых образцов Эналаприла малеата

Критерий пригодности	Полученное значение	Соответствие критерию пригодности
Отношение сигнал/шум (S/N), которое рассчитывалось по пику основного вещества, на хроматограмме контрольного раствора составляло не менее 20	48,3	Соответствует
Отношение максимум/минимум между пиками Эналаприла и примеси А на хроматограмме раствора сравнения В составляло не менее 10	2034	Соответствует
Отношение сигнал/шум (S/N), которое рассчитывалось по пику примеси G на хроматограмме раствора сравнения D (1): составляло не менее 40	89,4	Соответствует
Относительное стандартное отклонение значений времен удерживания пика основного вещества – не более 2 % ($n \geq 5$)	$0,85 \pm 0,17$ ($n=6$)	Соответствует
Относительное стандартное отклонение значений площади пика основного вещества – не более 5 % ($n \geq 5$)	$3,14 \pm 1,12$ ($n=6$)	Соответствует

Полученные результаты подтверждали специфичность методики количественного определения посторонних примесей Эналаприла А, С, G и H.

Линейность

Линейность методики для определения посторонних примесей в СО Эналаприла должна быть обеспечена от ПКО примеси до 120-процентного значения, указанного в спецификации (см. раздел «Аналитическая область»).

В рамках валидации проводили анализ калибровочных образцов, соответствующих калибровочным уровням, указанным в Таблице 59, путем разведения матричного раствора, методика приготовления которого приведена ниже. Разведение производилось растворителем, приготовленным по рецептуре ниже.

Растворитель готовили путем смешивания предварительно отфильтрованного через мембранный фильтр 0,45 мкм (PTFE) ацетонитрила с буферным раствором А в соотношении объемов 5:95.

Для приготовления буферного раствора А отбирали навеску натрия дигидрофосфата моногидрат массой 2,8 г в мерную колбу вместимостью 1 л. Проводили предварительное растворение вещества водой I типа объемом 950 мл. После проведения предварительного растворения доводили рН полученного раствора до значения $2,5 \pm 0,1$ с использованием фосфорной кислоты концентрированной. Конечный объем полученного раствора доводили водой I типа до метки, осуществляли перемешивание раствора с последующим фильтрованием через мембранный фильтр 0,45 мкм (Supor PES).

Для приготовления матричного раствора в мерную колбу вместимостью 50 мл добавляли 1 мл раствора сравнения В (содержащего СО Эналаприла для проверки пригодности хроматографической системы (EP CRS)), доводя объем колбы растворителем до метки с перемешиванием, получая матричный раствор с концентрацией Эналаприла малеата 20 мкг/мл.

Таблица 59 – Калибровочные уровни методики определения посторонних примесей в исследуемых образцах Эналаприла малеата

Калибровочный образец		Содержание примеси, %	Концентрация примеси, мкг/мл	Объем матричного раствора сравнения А	Общий объем калибровочного образца
Уровень линейности	Примесь				
120	G	0,24	2,4	6,0	50
110	G	0,22	2,2	5,5	50
100	G	0,2	2,0	5,0	50
90	G	0,18	1,8	4,5	50
80	G	0,16	1,6	4,0	50
ПКО	G	0,032	0,32	0,8	50

По полученным значениям были построены калибровочные графики в, где ось у - площадь пика примеси, ось х - концентрации примеси в калибровочном образце. График приведен на Рисунке 44 совместно с уравнением калибровочной кривой и коэффициентом корреляции.

Линейность методики подтверждалась, если коэффициент корреляции (R^2) составлял не менее 0,99.

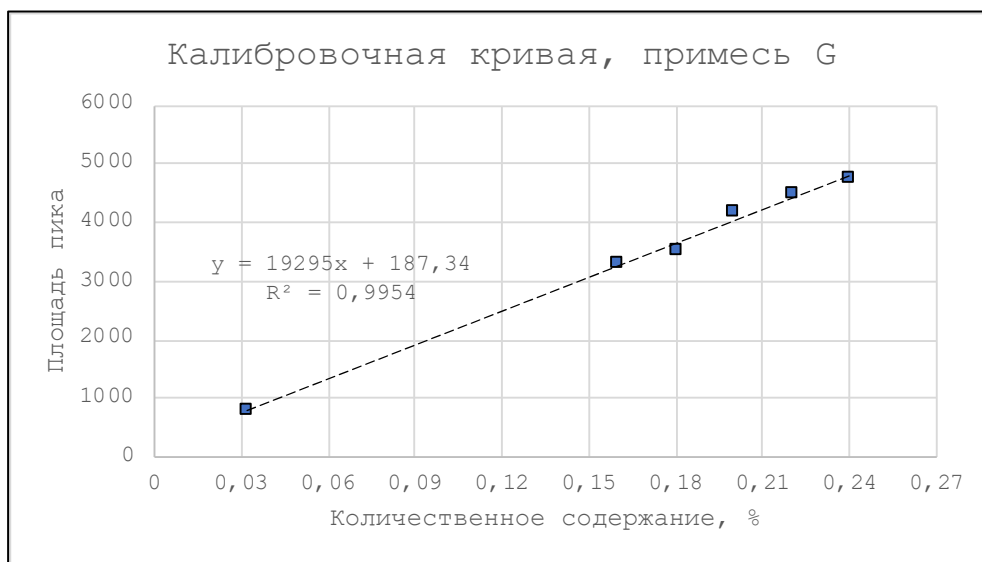


Рисунок 44 – Калибровочный график линейности для примеси G

Получен коэффициент корреляции (R^2) для примеси G – 0,9954. Полученный результат подтверждал линейность методики количественного определения посторонних примесей Эналаприла:

Примесь G – в диапазоне процентного содержания 0,032 % – 0,240 %.

Правильность

Правильность методики определялась для трех калибровочных образцов (80, 100 и 120), каждый из которых был проанализирован 3 раза. По результатам анализа определялось среднее значение расчетного содержания примеси в образце и относительная стандартная погрешность (RSE, %).

Правильность подтверждалась, если значение RSE составляло не более 5% для каждого уровня концентрации.

Полученные результаты определения правильности приведены в Таблице 60.

Таблица 60 – Правильность методики количественного определения посторонних примесей в исследуемых образцах Эналаприла малеата

Калибровочный образец		Фактическое содержание в образце, %	Среднее значение расчетного содержания, % (n = 3)	RSE, % (n = 3)	Соответствие критерию приемлемости
Уровень линейности	Примесь				
120	G	0,24	0,2478	3,26	Соответствует
100	G	0,20	0,1952	-2,40	Соответствует
80	G	0,16	0,1567	-2,08	Соответствует

Полученные результаты подтверждали правильность методики количественного определения посторонних примесей Эналаприла (примеси G).

Прецизионность

Прецизионность методики определялась для трех калибровочных образцов (80, 100 и 120). Для подтверждения прецизионности было проведено два исследования:

Повторяемость в рамках одного дня (n = 3);

Внутрилабораторная прецизионность на следующий день после определения повторяемости (n = 3).

По результатам анализа определялось среднее значение расчетного содержания примеси в образце, стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение (RSD, %).

Правильность подтверждалась, если значение RSD составляло не более 5% для каждого уровня концентрации.

Полученные результаты определения прецизионности приведены в Таблице 61.

Таблица 61 – Прецизионность методики количественного определения посторонних примесей в исследуемых образцах Эналаприла малеата

Калибровочный образец		Среднее значение, % (n = 3)	Стандартное отклонение, % (n = 3)	RSD, % (n = 3)	Соответствие критерию приемлемости
Уровень линейности	Примесь				
Повторяемость (день 1)					
120	G	0,2478	0,0065	2,61	Соответствует
100	G	0,1952	0,0044	2,26	Соответствует
80	G	0,1567	0,0049	3,10	Соответствует
Внутрилабораторная прецизионность (день 2)					
120	G	0,2495	0,0062	2,49	Соответствует
100	G	0,1965	0,0069	3,49	Соответствует
80	G	0,1577	0,0064	4,07	Соответствует

Полученные результаты подтверждали прецизионность методики количественного определения посторонних примесей Эналаприла (примеси G).

Аналитическая область

Аналитическая область – интервал между наибольшей и наименьшей концентрациями (количеством) определяемого вещества в образце (включая эти концентрации), для которого показано, что аналитическая методика имеет приемлемый уровень прецизионности, правильности и линейности [9].

Аналитическая область методики для определения посторонних примесей должна быть обеспечена от ПКО примеси до 120-процентного значения, указанного в спецификации.

По результатам определения линейности, правильности и прецизионности, аналитическая область методики определения посторонних примесей Эналаприла была установлена в следующих диапазонах:

Примесь G – 0,032 % – 0,240 % (от ПКО до 120 %).

Полученные результаты удовлетворяли требованиям, выдвигаемым для аналитического диапазона методики количественного определения посторонних примесей Эналаприла (примеси G).

Предел количественного определения

ПКО – наименьшее количество вещества в образце, которое можно количественно определить с соответствующей прецизионностью и правильностью [9].

ПКО определялся по соотношению «сигнал/шум», сравнения измеряемых сигналов, полученных от образцов с известными низкими концентрациями определяемого вещества, с сигналами, полученными от холостых проб, и установления минимальной концентрации, при которой определяемое вещество может быть достоверно определено количественно [9].

За критерий приемлемости взято отношение "сигнал/шум" не менее 10:1.

Результаты определения предела количественного определения приведены в **Таблице 62**.

Таблица 62 – ПКО методики определения посторонних примесей исследуемых образцов Эналаприла малеата

Калибровочный образец		Фактическое содержание в образце, %	Отношение «сигнал/шум»	Соответствие критерию приемлемости
Уровень линейности	Примесь			
ПКО	G	0,032	19,4	Соответствует

Предел обнаружения

ПО – наименьшее количество определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено, но необязательно точно количественно определено [9].

ПО определялся по соотношению «сигнал/шум», сравнения измеряемых сигналов, полученных от образцов с известными низкими концентрациями определяемого вещества, с сигналами, полученными от холостых проб, и установления минимальной концентрации, при которой определяемое вещество может быть достоверно обнаружено [9].

За критерий приемлемости взято отношение "сигнал/шум" от 3:1 до 2:1.

Образцы для определения предела обнаружения посторонних примесей А, С и Н Эналаприла готовились путем последовательного разведения раствора сравнения С растворителем до достижения установленного соотношения «сигнал/шум» для пиков примесей на хроматограмме.

Результаты определения предела количественного определения приведены в Таблице 63.

Таблица 63 – ПО методики определения посторонних примесей исследуемых образцов Эналаприла малеата

Калибровочный образец		Фактическое содержание в образце, %	Отношение «сигнал/шум»	Соответствие критерию приемлемости
Уровень концентрации	Примесь			
ПО	А	0,020	2,3	Соответствует
	С	0,015	2,1	Соответствует
	Н	0,015	2,8	Соответствует

Таким образом, проведенная валидация методики количественного определения посторонних примесей Эналаприла методом ВЭЖХ показала, что методика удовлетворяет критериям приемлемости по параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (повторяемость и внутрилабораторная прецизионность), аналитическая область, ПКО, ПО.

4.3.1.3. Количественное определение посторонних примесей

Результаты количественного определения посторонних примесей в исследуемых образцах Эналаприла малеата, полученные с помощью разработанной и валидированной методики, приведены в Таблице 64. Рассчитывали содержание каждого из примесных веществ, как описано выше.

Общее содержание примесей вычисляли, как сумму содержания каждой примеси. Итоговым значением являлся средний показатель не менее шести определений.

Таблица 64 – Содержание посторонних примесей в испытуемых образцах Эналаприла малеата

№ серии	Содержание посторонних примесей ($\pm \sigma$), %
1Э	Примесь А – Ниже ПО Примесь G – Ниже ПКО Примесь С – $0,089 \pm 0,002$ Примесь Н – $0,091 \pm 0,001$ Любая другая единичная примесь – $0,033 \pm 0,001$ Сумма примесей – 0,213
2Э	Примесь А – $0,245 \pm 0,005$ Примесь G – $0,184 \pm 0,005$ Примесь С – $0,086 \pm 0,002$ Примесь Н – $0,153 \pm 0,004$ Любая другая единичная примесь – $0,041 \pm 0,001$ Сумма примесей – 0,709
3Э	Примесь А – Ниже ПО Примесь G – Ниже ПКО Примесь С – $0,095 \pm 0,001$ Примесь Н – $0,097 \pm 0,002$ Любая другая единичная примесь – $0,057 \pm 0,001$ Сумма примесей – 0,249

Метод ВЭЖХ подлежит включению в раздел «Посторонние примеси» спецификации СО. Были установлены нормы посторонних примесей: примесь А – не более 0,5 %; примесь Н – не более 0,3 %; примесь С – не более 0,2 %, примесь G – не более 0,2 %. Любая другая единичная примесь должна быть не более 0,1 %, а сумма примесей должна составлять не более 1,0 %.

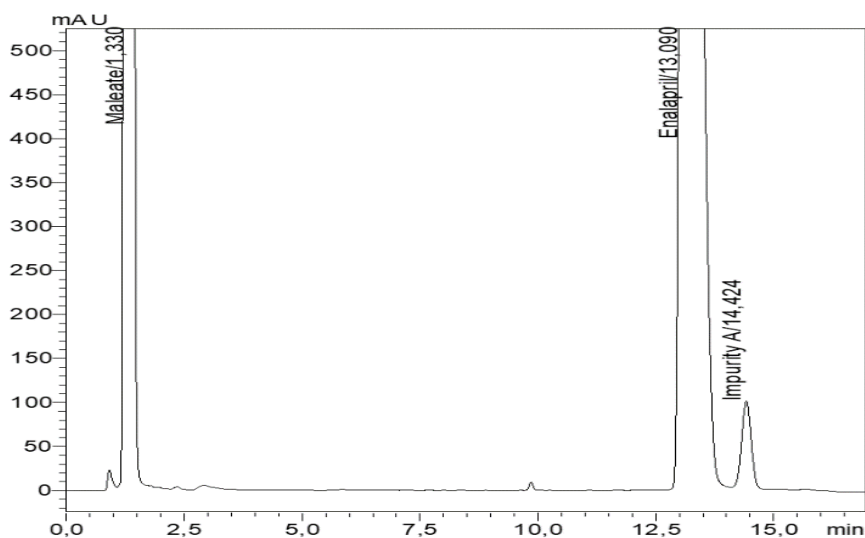


Рисунок 45 – Хроматограмма раствора сравнения В

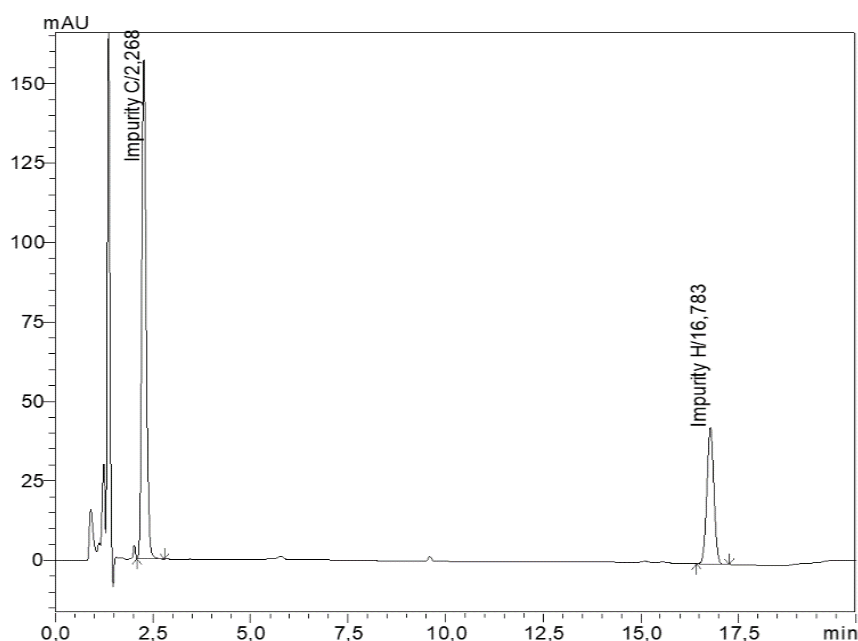


Рисунок 46 – Хроматограмма раствора сравнения С

Относительное время удерживания (t_r), полученное в условиях хроматографии поправочные коэффициенты (k_i) представлены в Таблице 65 и основываются на результатах хроматографического анализа в условиях разработанной и валидированной методики определения посторонних примесей Эналаприла малеата.

Таблица 65 – Относительное время удерживания и поправочные коэффициенты для определяемых посторонних примесей Эналаприла малеата

Наименование компонента	Относительное время удерживания (t_r)	Поправочный коэффициент (k_i)
Примесь С	Около 0,1	1,0
Эналаприл	1	1,0
Примесь А	Около 1,1	1,0
Примесь G	Около 1,2	1,0
Примесь Н	Около 1,3	1,1

4.3.2. Газовая хроматография в анализе исследуемых образцов Эналаприла малеата

Метод ГХ использовался в качестве классического метода определения остаточных органических растворителей в исследуемых образцах Эналаприла малеата.

4.3.2.1. Разработка и валидация хроматографической методики определения остаточных органических растворителей

Контроль остаточных органических растворителей (этанол, ацетон, МХ, гексан) в исследуемых образцах Эналаприла малеата осуществлялся согласно разработанной методике, которая описана в разделе 3.3.2.2. настоящей диссертационной работы. Валидацию методики проведена в соответствии с ГФ РФ XIV, ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик [9] и описана в разделе 3.3.2.3. настоящей диссертационной работы.

4.3.2.2. Количественное определение остаточных органических растворителей

В рамках определения содержания остаточных органических растворителей в исследуемых образцах Эналаприла малеата за результат измерения принимали среднее значение не менее шести определений (Таблица 66). Определяли суммарное содержание остаточных органических растворителей в процентах как сумму содержания каждого остаточного органического растворителя, если его содержание было не менее 0,025 %.

Таблица 66 – Содержание остаточных органических растворителей в испытуемых образцах Эналаприла малеата

№ серии	Содержание остаточных органических растворителей ($\pm \sigma$), %
1Э	МХ, ацетон, гексан – Ниже ПКО Этанол – $0,036 \pm 0,002$
2Э	МХ, гексан – Ниже ПКО Ацетон – $0,030 \pm 0,003$ Этанол – $0,051 \pm 0,002$ Сумма остаточных органических растворителей – 0,081
3Э	МХ, ацетон, гексан – Ниже ПКО Этанол – $0,029 \pm 0,002$

Метод ГХ подлежит включению в раздел «Остаточные органические растворители» спецификации СО. Были установлены нормы остаточных органических растворителей: этанол – не более 0,5 %; ацетон – не более 0,5 %; МХ – не более 0,06 %; гексан – не более 0,029 %. Сумма остаточных органических растворителей – не более 0,6 %.

4.4. Количественное определение Эналаприла малеата методом материального баланса

Количественное определение проводили регламентированным ГФ РФ XIV методом материального баланса, где содержание основного компонента СО рассчитывали исходя из значений, полученных при определении примесей (неорганические и органические примеси, остаточные органические растворители, вода) [8]. При расчете не учитывали значения установленного показателя «Потеря в массе при высушивании» ввиду отдельного определения и учета в расчете значений показателей «Содержание воды» и «Остаточные органические растворители».

Содержание основного вещества (X, %) в СО в пересчете на сухое вещество вычисляли по формуле:

$$X = 100 - x_{\text{ПП}} - x_{\text{СЗ}} - x_{\text{В}} - x_{\text{ООР}},$$

где $x_{\text{ПП}}$ – суммарное содержание посторонних примесей, %;

$x_{\text{СЗ}}$ – содержание сульфатной золы, %;

$x_{\text{В}}$ – содержание воды, %;

$x_{\text{ООР}}$ – суммарное содержание остаточных органических растворителей, %.

При расчете содержания основного компонента СО значения определяющих показателей (примеси, вода и т.д.) не учитывали в случае, если значение каждого отдельного показателя составляло менее 0,025 %.

Результаты расчета содержания основного компонента СО каждой из испытуемых серий субстанции Эналаприла малеата представлены в Таблице 67.

Таблица 67 – Результаты определения содержания основного компонента СО Эналаприла малеата методом материального баланса в пересчете на сухое вещество

№ серии	Среднее значение содержания Эналаприла малеата ($\pm \sigma$), %
1Э	99,71 \pm 0,002
2Э	99,14 \pm 0,003
3Э	99,68 \pm 0,003

Исходя из полученных результатов определения содержания основного компонента СО Эналаприла малеата в исследуемых образцах методом материального баланса была установлена следующая норма: не менее 99,0% (в пересчете на сухое вещество). Данная норма в рамках показателя «Содержание основного вещества» подлежит включению в спецификацию СО.

4.5. Нормы и показатели качества стандартного образца Эналаприла малеата

Осуществление полного перечня испытаний исследуемых образцов позволило сформировать конкретные показатели качества и установить соответствующие нормы, которые подлежат включению в нормативную документация на СО. Предлагаемая спецификация контроля качества разработанного СО Эналаприла малеата представлена в Таблице 68 и была учтена при процедуре аттестации СО утвержденного типа ГСО 11691-2021. Показатель «Потеря в массе при высушивании» не был включен в основу предлагаемой спецификации ввиду отдельного определения с последующим нормированием показателей «Содержание воды» и «Остаточные органические растворители».

Таблица 68 – Спецификация СО Эналаприла малеата

Показатель	Метод	Норма
Описание	Визуальный (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.1.0001.18 «Правила пользования фармакопейными статьями»)	Белый или почти белый кристаллический порошок
Растворимость	Визуальный (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.0005.15 «Растворимость»)	Умеренно растворим в воде, легко растворим в метаноле, растворим в этаноле 96%
Температура плавления	Термический анализ капиллярным методом (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.0011.18 «Температура плавления», метод 1)	От 142,0° С до 146,0° С
Удельное вращение	Поляриметрия (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.0018.15 «Поляриметрия»)	От -41,0° до -43,0° (в пересчете на сухое вещество для 1%-го раствора вещества в метаноле)
Содержание воды	Титриметрия методом К. Фишера (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.3.0002.15 «Определение воды», метод 1)	Не более 0,1%
Сульфатная зола	Гравиметрический (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.2.2.0014.15 «Сульфатная зола»)	Не более 0,05%

Продолжение Таблицы 68

Тяжелые металлы	Визуальный (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.2.2.0012.15 «Тяжелые металлы», метод 1)	Не более 0,001%
Прозрачность	Визуальный (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.0007.15 «Прозрачность и степень мутности жидкостей»)	1%-й водный раствор вещества должен быть прозрачным
Цветность	Визуальный (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.0006.15 «Степень окраски жидкостей», метод 2)	Раствор, полученный в испытании «Прозрачность», должен быть бесцветным
Подлинность	ИК-спектроскопия (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.1.0002.15 «Спектрометрия в инфракрасной области»)	ИК-спектр не должен противоречить химической структуре Эналаприла малеата
	ЯМР-спектроскопия (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.1.0007.15 «Спектроскопия ядерного магнитного резонанса»)	ЯМР-спектры ^1H и ^{13}C не должны противоречить химической структуре Эналаприла малеата
	Масс-спектрометрия (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.1.0008.15 «Масс- спектрометрия»)	Масс-спектр не должен противоречить химической структуре Эналаприла малеата
Посторонние примеси	ВЭЖХ (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография»)	Примесь А – не более 0,5 %; Примесь Н – не более 0,3 %; Примесь С – не более 0,2 %; Примесь G – не более 0,2 %; Любая другая единичная примесь – не более 0,1 %; Сумма примесей – не более 1,0 %.

Продолжение Таблицы 68

Остаточные органические растворители	ГХ (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.2.0004.15 «Газовая хроматография», ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», ГФ РФ изд. XIV, том I, ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители»)	Этанол – не более 0,5 %; Ацетон – не более 0,5 %; Гексан – не более 0,029 %; МХ – не более 0,06 %; Сумма остаточных органических растворителей – не более 0,6 %
Содержание основного вещества	Метод материального баланса (ГФ РФ, изд. XIV, том I, ОФС.1.1.0007.18 «Стандартные образцы»)	Не менее 99,0% (в пересчете на сухое вещество)

ВЫВОДЫ

1. Изучено актуальное состояние и выявлены возможности совершенствования системы обеспечения качества ЛС группы иАПФ с применением СО на территории РФ и за рубежом;

2. Проведен комплексный анализ разработанных СО Каптоприла и Эналаприла малеата методами ИК-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии (^1H и ^{13}C) и Масс-спектрометрии, по результатам которого установлено их соответствие химической структуры химическим структурам Каптоприла и Эналаприла малеата. Обоснована необходимость включения перечисленных методов в раздел «Подлинность» нормативной документации на каждый разработанный СО для осуществления надежной идентификации;

3. Проведен ряд общих фармакопейных исследований, позволяющих контролировать качество СО Каптоприла и Эналаприла малеата. Установлены нормы для показателей, включенных в нормативную документацию СО: описание, растворимость, прозрачность, цветность, температура плавления, удельное вращение, содержание воды, содержание тяжелых металлов, сульфатная зола;

4. Разработаны и валидированы хроматографические методики для анализа СО Каптоприла и Эналаприла малеата по показателю «Посторонние примеси» с помощью метода ВЭЖХ. Проведено определение примесей и установлены нормы для включения в нормативную документацию на СО Каптоприла: примесь А – не более 1,0 %; примесь В,С,Д,Е – каждой примеси не более 0,15 %; примесь J – не более 0,2 %; любая другая единичная примесь – не более 0,10 %; сумма примесей – не более 1,0 %; на СО Эналаприла: примесь А – не более 0,5 %; примесь Н – не более 0,3 %; примесь С,Г – каждой примеси не более 0,2 %; любая другая единичная примесь – не более 0,1 %; сумма примесей – не более 1,0 %;

5. Разработана и валидирована хроматографическая методика для анализа СО Каптоприла и Эналаприла малеата по показателю «Остаточные органические растворители» с помощью метода ГХ. Проведено определение остаточных органических растворителей при разработке СО Каптоприла и Эналаприла малеата и установлены нормы остаточных органических растворителей для включения в нормативную документацию на каждый СО: этанол – не более 0,5%; ацетон – не более 0,5%; гексан – не более 0,029 %; МХ – не более 0,06 %; сумма остаточных органических растворителей – не более 0,6 %;

6. Проведено количественное определение СО Каптоприла и Эналаприла малеата в соответствии с принципом материального баланса. Установлены нормы по показателю «Содержание основного вещества» для разработанных СО – не менее 99,0% (в пересчете на сухое вещество);

7. Созданы нормативные документы (спецификации) для аттестованных СО Каптоприла и Эналаприла малеата.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты исследований целесообразно применять при производстве СО Каптоприла и Эналаприла малеата, в контроле качества одноименных АФС, а также лекарственных препаратов, содержащих исследуемые вещества как в виде монокомпонентов, так и в виде комбинаций с другими веществами.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Представленный подход для аттестации исследуемых образцов позволяет применить его к соединениям, отличающимся по химическому строению от Каптоприла и Эналаприла малеата, что, в свою очередь, позволит нарастить национальный перечень наименований СО и заменить аналогичные зарубежные СО на отечественном фармацевтическом рынке. Представленный способ аттестации СО может применяться не только к АФС, но и к соответствующим примесным соединениям субстанций. Возможность включения результатов проведенного исследования в нормативную документацию АФС, а также лекарственных препаратов, содержащих Каптоприл и Эналаприла малеат, позволит эффективно контролировать качество соответствующих объектов анализа.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АТ I – ангиотензин I
АТ II – ангиотензин II
ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия
АГ – артериальная гипертензия
АД – артериальное давление
АПФ – ангиотензинпревращающий фермент
АСО – аттестованный стандартный образец
АФС – активная фармацевтическая субстанция
АЭС – атомно-эмиссионная спектроскопия
ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография
ГФ – Государственная Фармакопея
ГХ – газовая хроматография
ДМСО – диметилсульфоксид
иАПФ – ингибитор ангиотензинпревращающего фермента
ИК – инфракрасная(-ый)
КССВ – константа спин-спинового взаимодействия
ЛС – лекарственное средство
ЛФ – лекарственная форма
МС – масс-спектрометрия
МХ – метиленхлорид
НФ – неподвижная фаза
ОФС – общая фармакопейная статья
ПКО – предел количественного определения
ПМР-спектроскопия – спектроскопия протонного магнитного резонанса
ПО – предел обнаружения
ПФ – подвижная фаза
РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система
РАМН – Российская академия медицинских наук
РФ – Российская Федерация
СО – стандартный образец
ССО – сертифицированный стандартный образец

СССР – Союз Советских Социалистических Республик

США – Соединенные Штаты Америки

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ – ультрафиолет(-овый)

ФЗ – Федеральный закон

ФСО – Фармакопейный стандартный образец

ЯМР-спектр – спектр ядерного магнитного резонанса

ЯМР-спектроскопия – спектроскопия ядерного магнитного резонанса

EDQM – Европейский директорат по контролю качества лекарственных средств и здравоохранению

EP CRS – стандартный образец химического вещества Европейской Фармакопеи

σ – среднеквадратичное (стандартное) отклонение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арзамасцев А.П. Стандартные образцы лекарственных веществ / А.П. Арзамасцев, П.Л. Сенов. – Москва: Медицина, 1978. – 248 с.
2. Батырова Ф.К. Совершенствование методов химического анализа лекарственных препаратов производных пролина на примере каптоприла / Ф.К. Батырова, Н.А. Саламова // Международный студенческий научный вестник – 2016. – №3–3. – С. 446.
3. Бокарев И.Н. Артериальная гипертония: современное состояние проблемы / И.Н. Бокарев, П.А. Дулин, Ю.В. Овчинников [и др.] // Клиническая медицина. – 2017. Т.95. – №7. – С. 581 – 585.
4. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.who.int/> (дата обращения: 01.09.2022).
5. Гегечкори В.И. Методика идентификации материала стандартного образца состава азитромицина с использованием спектральных методов / В.И. Гегечкори, Н.А. Шульга, О.Ю. Щепочкина [и др.] // Эталоны. Стандартные образцы. – 2021. – Т.17. – №3. – С. 21 – 34.
6. Гегечкори В.И. Применение спектральных методов при разработке стандартных образцов для лекарственных средств пептидной структуры/ В.И. Гегечкори, О.Ю. Щепочкина, Л.Н. Грушевская [и др.] // Фармация. – 2016. – Т.63. – №1. – С. 3 – 6.
7. Гегечкори В.И. Применение спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C в анализе стандартных образцов для лекарственных средств пептидной структуры Дилепт и ГБ–115 / В.И. Гегечкори, В.А. Кокорекин, О.Ю. Щепочкина [и др.] // Биофармацевтический журнал. – 2016. – Т.8. – №3. – С. 21 – 27.
8. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV Издание [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения: 01.09.2022).
9. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV Издание, Том I, ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14>.
10. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV Издание, Том III, ФС.2.1.0045.15. Эналаприла малеат [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения: 01.09.2022).
11. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV Издание, Том III, ФС.2.1.0106.18. Каптоприл [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacopea14> (дата обращения: 01.09.2022).
12. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://grls.rosminzdrav.ru/> (дата обращения: 01.09.2022).

13. Евдокимова А.Г. Эффективность применения каптоприла в клинической практике / А.Г. Евдокимова, Е.В. Коваленко, Л.И. Маркова // Русский Медицинский Журнал. – 2018. – Т.26. – №11. – С. 65 – 70.
14. Кайтель С. Структура и функции Европейского директората по качеству лекарственных средств и здравоохранению (EDQM) // Вестник Росздравнадзора. – 2010. – №6. – С. 12 – 15.
15. Каталог стандартных образцов Европейской фармакопеи [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.edqm.eu/en/reference-standards> (дата обращения: 01.09.2022).
16. Каталог стандартных образцов Фармакопеи Великобритании [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.pharmacopeia.com/Catalogue/Products> (дата обращения: 01.09.2022).
17. Каталог стандартных образцов Фармакопеи США [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://store.usp.org/all-reference-standards/category/USP-1010> (дата обращения: 01.09.2022).
18. Компанцева Е.В. Прогнозирование и экспериментальное определение примесей и продуктов деструкции в фармацевтической композиции гипотензивного действия / Е.В. Компанцева, А.В. Бабьяк, Ю.В. Мудрецова [и др.] // Фармация и фармакология. – 2013. – №1(1). – С. 18 – 23.
19. Леонтьева И.В. Проблема артериальной гипертензии у детей и подростков. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2006. – Т.51. – №5. – С. 7 – 18.
20. Международный совет по гармонизации технических требований к фармацевтическим препаратам для человека [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (дата обращения: 01.09.2022).
21. Мельникова О.А. Аминокислоты алифатического ряда: Методические указания и материалы по фармацевтической химии / О.А. Мельникова, А.Ю. Петров, А.В. Хафизова. – Екатеринбург: УГМА, 2012. – 106 с.
22. Миронов А.Н. Стандартные образцы в практике зарубежного и отечественного фармацевтического анализа / А.Н. Миронов, И.В. Сакаева, Е.И. Саканян // Ведомости НЦЭСМП. – 2012. – №3. – С. 56 – 60.
23. Об обеспечении единства измерений: Федеральный закон от 26.06.2008 №102-ФЗ (ред. от 26.06.2008) [Электронный ресурс]. – URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_77904/ (дата обращения: 01.09.2022).
24. Онучак Л.А. Колоночная и тонкослойная жидкостная хроматография гипотензивных лекарственных средств каптоприл, карведилол, бисопролол, атенолол и амлодипин / Л.А. Онучак, М.В. Васильева, Е.В. Кудашкина [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2012. – Т.12. – №3. – С. 355 – 362.

25. Открытая база данных (PubChem) [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 01.09.2022).
26. Романенко В.В. Ингибиторы АПФ – препараты первой линии в лечении сердечно–сосудистых заболеваний / В.В. Романенко, З.В. Романенко // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. – 2014. – №3(9). – С. 5 – 25.
27. Романов Б.К. Средства, снижающие активность ренин–ангиотензин–альдостероновой системы. / Б.К. Романов, Н.Г. Преферанская, В.Н. Чубарев // Российский медицинский журнал. – 2012. – Т.18. – №3. – С. 44 – 49.
28. Российское кардиологическое общество, Клинические рекомендации: Артериальная гипертензия у взрослых. Коды по МКБ 10: 110/111/112/113/115. Возрастная группа: взрослые. 2020 г. [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_346170/8efd5f17af55cb35a770f73937590c642437b7eb/ (дата обращения: 01.09.2022).
29. Справочник лекарственных средств (Vidal) [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.vidal.ru/> (дата обращения: 01.09.2022).
30. Стрюк Р.И. Диагностика и лечение сердечно–сосудистых заболеваний при беременности. Национальные рекомендации // Р.И. Стрюк, Ю.А. Бунин, В.М. Гурьева [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2018. – Т. 23. – № 3. – С. 91 – 134.
31. Стуров. Н.В. Применение эналаприла при артериальной гипертензии и хронической сердечной недостаточности: патофизиологическое обоснование и доказательная база // Трудный пациент. – 2011. – Т.9. – №5. – С. 13 – 16.
32. Тринеева О.В. Методы контроля качества аминокислот в фармацевтическом анализе // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – №2(11). – С. 120 – 140.
33. Хабарова О.В. Спектрофотометрическое определение каптоприла по реакции образования комплексного соединения 1,10–фенантролина и меди (I) / О.В. Хабарова, К.А. Серова, М.В. Мажитова // Астраханский медицинский журнал. – 2017. – Т. 12. – №1. – С 64 – 72.
34. Чазова И.Е. Клинические рекомендации: диагностика и лечение артериальной гипертензии. Системные гипертензии / И.Е. Чазова, Ю.В. Жернакова [и др.] // Системные гипертензии. – 2019. – Т.6. – №1. – С. 6 – 31.
35. Чепило Д.А. Комплексный подход к определению подлинности при разработке стандартных образцов лекарственных препаратов ингибиторов АПФ / Д.А. Чепило, В.И. Гегечкори, О.Ю. Щепочкина [и др.] // Химико–фармацевтический журнал. – 2022. – Т.56. – №4. – С. 41 – 47.

36. Чепило Д.А. Контроль качества стандартных образцов препаратов группы ингибиторов АПФ по показателю посторонние примеси / Д.А. Чепило, В.И. Гегечкори, Д.И. Саранчук [и др.] // *Естественные и технические науки*. – 2022. – №8 (171). – С. 86 – 93.
37. Чепило Д.А. Применение метода хромато-масс-спектрометрии для идентификации стандартных образцов лекарственных препаратов ингибиторов АПФ / Д.А. Чепило, В.И. Гегечкори, О.Ю. Щепочкина [и др.] // *Фармация*. – 2022. – Т.71. – №3. – С. 34 – 41.
38. Шальнова С.А. Артериальная гипертензия: распространенность, осведомленность, прием антигипертензивных препаратов и эффективность лечения среди населения российской федерации / С.А. Шальнова, Ю.А. Баланова, В.В. Константинов // *Российский кардиологический журнал*. – 2006. – Т. 11. - № 4. – С. 45 – 51.
39. Щепочкина О.Ю. Современные подходы к разработке стандартных образцов лекарственных средств / О.Ю. Щепочкина, В.И. Гегечкори, В.И. Прокофьева [и др.] // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2020. – Т. 54. – №7. – С. 49 – 54.
40. Aktas E.S. A new spectrofluorimetric method for the determination of lisinopril in tablets / E.S. Aktas, L. Ersoy, O. Sagirli // *Il Farmaco*. – 2003. – Vol.58. – №2. – P. 165 – 168.
41. Ayad M.M. Spectrophotometric methods for determination of enalapril and timolol in bulk and in drug formulations / M.M. Ayad, A. Shalaby, H. E. Abdellatef [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2003. – Vol.375. – P. 556 – 560.
42. Bartroli J. Synthesis of 3h-labelled enalapril maleate / J. Bartroli, J. Ramis, A. Marin [et al.] // *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. – 1986. – Vol.23. – №7. – P. 771 – 776.
43. Basavaiah K. Titrimetric assay of lisinopril in aqueous and non-aqueous media / K. Basavaiah, K. Tharpa, K. B. Vinay // *Eclética Química Journal*. – 2010. – Vol.35. – №2. – P. 7 – 14.
44. Berrington de Gonzalez A. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults / A. Berrington de Gonzalez, P. Hartge, J.R. Cerhan [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2010. – Vol.363. – №23. – P. 2211 – 2219.
45. Bhardwaj S.P. Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating assay method / S.P. Bhardwaj, S.Singh // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2008. – Vol.46. – №1. – P.113 – 120.
46. Bishop C.A. High-Performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. XXI. The application of preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography for the purification of a syntactic underivatived peptides / C.A. Bishop, D.R.K. Harding, L.J. Meyer [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 1980. – Vol.195. – P. 181 – 186.
47. Bonazzi D. Analysis of ACE inhibitors in pharmaceutical dosage forms by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC) / D. Bonazzi, R. Gotti, V. Andrisano [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 1997. – Vol.16. – №3. – P. 431 – 438.

48. Borch R.F. Cyanohydridoborate Anion as a Selective Reducing Agent / R.F. Borch, M.D. Bernstein, H.D. Durst // *Journal of the American Chemical Society*. – 1971. – Vol.93. – №12. – P. 2897 – 2904.
49. *British Pharmacopoeia 2016*. // Stationary Office / London, Great Britain – 2016.
50. Burckhardt B.B. Sample Preparation and Extraction in Small Sample Volumes Suitable for Pediatric Clinical Studies: Challenges, Advances, and Experiences of a Bioanalytical HPLC–MS/MS Method Validation Using Enalapril and Enalaprilat / B.B. Burckhardt, S. Laeer // *International Journal of Analytical Chemistry*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1 – 11.
51. Burgos de Azevedo M. New formulation of an old drug in hypertension treatment: the sustained release of captopril from cyclodextrin nanoparticles / M. Burgos de Azevedo, L. Tasic, J. Fattori [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2011. – Vol.6. – P. 1005 – 1016.
52. Carje A.G. HPLC–UV method approach for the analysis and impurity profiling of captopril / A.G. Carje, A. Balint, V. Ion [et al.] // *Studia Universitatis Babeş–Bolyai. Chemia*. – 2019. – Vol.1. – №64(2). – P. 231 – 242.
53. Casas M. Physicochemical stability of captopril and enalapril extemporaneous formulations for pediatric patients / M. Casas, J. Álvarez, M.J. Lucero // *Pharmaceutical Development and Technology*. – 2015. – Vol.20. – №3. – P. 271 – 278.
54. Chirumamilla R.R. Captopril and its synthesis from chiral intermediates / R.R. Chirumamilla, R. Marchant, P. Nigam // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2001. – Vol.76. – №2. – P. 123 – 127.
55. Corrao G. Reduced discontinuation of antihypertensive treatment by two–drug combination as first step. Evidence from daily life practice / G. Corrao, A. Parodi, A. Zambon [et al.] // *Journal of hypertension*. – 2010. – Vol.28. – №7. – P. 1584 – 1590.
56. Dayyih W.A. A Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Evaluation of Two Brands of Enalapril 20 mg Tablets in Healthy Human Volunteers / W.A. Dayyih, M. Hamad, A.A. Awwad [et al.] // *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1 – 8.
57. Dickinson H.O. Lifestyle interventions to reduce raised blood pressure: a systematic review of randomized controlled trials / H.O. Dickinson, J.M. Mason, D.J. Nicolson [et al.] // *Journal of Hypertension*. – 2006. – Vol.24. – №2. – P. 215 – 233.
58. Dinh D.T. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function / D.T. Dinh, A.G. Frauman, C.I. Johnston [et al.] // *Clinical science*. – 2001. – Vol.100. – №5. – P. 481 – 492.
59. Dzau V. The relevance of tissue angiotensin– converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data / V. Dzau, K. Bernstein, D. Celermaier [et al.] // *American Journal of Cardiology*. – 2001. – Vol.88. – №9. – P. 1 – 20.

60. Egan B.M. Initial monotherapy and combination therapy and hypertension control the first year / B.M. Egan, D. Bandyopadhyay, S.R. Shaftman [et al.] // *Hypertension*. – 2012. – Vol.59. – №6. – P. 1124–1131.

61. El–Emam A.A. Determination of lisinopril in dosage forms and spiked human plasma through derivatization with 7–chloro–4–nitrobenzo–2–oxa–1,3–diazole (NBD–C1) followed by spectrophotometry or HPLC with fluorimetric detection / A.A. El–Emam, S.H. Hansen, M. Moustafa [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2004. – Vol.34 – №1. – P. 35 – 44.

62. El–Gindy A. Stability–indicating HPLC method for simultaneous determination of captopril, indapamide, and their related compounds / A. El–Gindy; M.W. Nassar; K.A–S. Attia [et al.] // *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. – 2014. – Vol.37. – №5. – P. 696 – 712.

63. El–Yazbi F.A. Spectrophotometric and spectrofluorometric methods for the assay of lisinopril in single and multicomponent pharmaceutical dosage forms / F.A. El–Yazbi, H.H. Abdine, R.A. Shaalan // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. – 1999. – Vol.19. – №6. – P. 819 – 827.

64. Ensafi A.A. Characterization of Mn–nanoparticles decorated organo–functionalized SiO₂–Al₂O₃ mixed–oxide as a novel electrochemical sensor: application for the voltammetric determination of captopril / A.A. Ensafi, M. Ghiaci, M. Arshadi [et al.] // *Journal of Materials Chemistry*. – 2011. – Vol.21. – №38. – P 15022 – 15030.

65. Erk N. Comparison of High – Performance Liquid Chromatography and Absorbance Ratio Methods for the Determination of Hydrochlorothiazide and Lisinopril in Pharmaceutical Formulations / N. Erk, M. Kartal // *Analytical Letters*. – 1999. – Vol.32. – №6. – P. 1131 – 1141.

66. European Pharmacopoeia 8th Edition. // Electronic version / European Department for the Quality of Medicines & Healthcare / Strasbourg, France. – 2013.

67. Flegal K.M. Association of all–cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta–analysis / K.M. Flegal, B.K. Kit, H. Orpana [et al.] // *Journal of the American Medical Association*. – 2013. – Vol.309. – №1. – P. 71 – 82.

68. Franklin S.S. Single versus combined blood pressure components and risk for cardiovascular disease: the Framingham Heart Study / S.S. Franklin, V.A. Lopez, N.D. Wong [et al.] // *Circulation*. – 2009. – Vol.119. – P. 243 – 250.

69. Friedman D.I. Intestinal absorption mechanism of dipeptide angiotensin converting enzyme inhibitors of the lysyl–proline type: Lisinopril and SQ 29,852 / D.I. Friedman, G.L. Amidon // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1989. – Vol.78. – №12. – P. 995 – 998.

70. Gay H.C. Effects of different dietary interventions on blood pressure: systematic review and meta–analysis of randomized controlled trials / H.C. Gay, S.G. Rao, V. Vaccarino [et al.] // *Hypertension*. – 2016. – Vol. 67. – №. 4. – P. 733 – 739.

71. Gherman S. Development and validation of UV spectrophotometric method for determination of enalapril maleate from commercial dosage forms / S. Gherman, D. Zavastin, A. Şpac [et al.] // *Farmacia*. – 2015. – Vol.63. – №6. – P. 934 – 937.
72. Gherman S. Spectrophotometric Determination of Enalapril Using Tropeolin 00 / S. Gherman, D. Zavastin, A. Spac [et al.] // *Revista de Chimie –Bucharest– Original Edition*. – 2013. – Vol.64. – №11. – P. 1224 – 1228.
73. Graudal N.A. Effects of low-sodium diet vs. highsodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride (Cochrane Review) / N.A. Graudal, T.Hubeck–Graudal, G. Jurgens // *American Journal of Hypertension*. – 2012. – Vol.25. – №1. – P. 1 – 15.
74. Gu Q.M. Synthetic approach towards captopril production / Q.M. Gu, D.R. Reddy, I.H. Shikamu // *Tetrahedron Letters*. – 1986. – Vol.27. – P. 5203 – 5206.
75. Gul W. Methods of Analysis of Lisinopril: A Review / W. Gul, Z. Augustine, S. Khan [et al.] // *Journal of Bioequivalence and Bioavailability*. – 2016. Vol.9. – №1. – P. 331 – 335.
76. He J. Passive smoking and the risk of coronary heart disease—a meta-analysis of epidemiologic studies / J. He, S.Vupputuri, K. Allen [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 1999. – Vol.340. – №12. – P. 920 – 926.
77. Iwao J. Chemical optical resolution of a racemic mixture using an optically organic amine / J. Iwao, M. Oya, E. Kato // *Japan Kokai Tokkyo Koho*. – 1979. – Vol.79. – P. 15192 – 15197.
78. Jamkhandi, C.M. Developed analytical methods for lisinopril – an ACE inhibitor / C.M. Jamkhandi, J. Chandrasekhar, M.S. Niranjani // *Asian Journal of biochemical and pharmaceutical research*. – 2011. – Vol.1. – №2. – P. 401 – 410.
79. Kallikazaros I.E. Arterial Hypertension // *Hellenic journal of cardiology*. – 2013. – Vol.54. – №5. – P. 413 – 415.
80. Kearney P.M. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. / P.M. Kearney, M. Whelton, K. Reynolds [et al] // *Lancet* – 2005. – Vol. 365 – P. 217 – 223.
81. Kitagawa S. pH-Dependent Inhibitory Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors on Cefroxadine Uptake by Rabbit Small Intestinal Brush-Border Membrane Vesicles and Their Relationship with Hydrophobicity and the Ratio of Zwitterionic Species / S. Kitagawa, J. Takeda, S. Sato // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 1999. – Vol.22. – №7.– P. 721 – 724.
82. Kohli S. Impact of interactions between risk alleles on clinical endpoints in hypertension / S. Kohli, R. Kumar, M. Gupta [et al.] // *Heart Asia*. – 2016. – Vol.8. – №1. – P. 83 – 89.
83. Koppala S. User-Friendly HPLC Method Development and Validation for Determination of Enalapril Maleate and Its Impurities in Enalapril Tablets / S. Koppala, R.V. Ranga, J.S. Anireddy // *Journal of Chromatographic Science*. – 2017. – Vol.55. – №10. – P. 979 – 988.

84. Leitzmann M.F. Physical activity recommendations and decreased risk of mortality / M.F. Leitzmann, Y. Park, A. Blair [et al.] // *Archives of internal medicine*. – 2007. – Vol.167. – №22. – P. 2453 – 2460.

85. Lim S.S. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 / S.S. Lim, T. Vos, A.D. Flaxman [et al.] // *The Lancet*. – 2012. – Vol. – 380. – P. 2224 – 2260.

86. Linneberg A. Effect of smoking on blood pressure and resting heart rate: a mendelian randomization meta-analysis in the CARTA Consortium / A. Linneberg, R.K. Jacobsen, T. Skaaby [et al.] // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. – 2015. – Vol.8. – №6. – P. 832 – 841.

87. Logoyda L. Development and validation of HPLC method for the simultaneous determination of enalapril maleate in presence of their impurities: application to tablet analysis / L. Logoyda, A.M. Abdel-Megied, Y. Kondratova [et al.] // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2018. – Vol.10. – №1. – P. 98 – 102.

88. Martin D.J. Use of trithiocarbonate ion as a nucleophilic reagent in synthesis of captopril / D.J. Martin, C.C. Greco // *Journal of Organic Chemistry*. – 1968. – Vol.33. – P. 1275 – 1279.

89. Matsuzaki M. Combination Therapy of Hypertension to Prevent Cardiovascular Events Trial Group. Prevention of cardiovascular events with calcium channel blocker-based combination therapies in patients with hypertension: a randomized controlled trial / M. Matsuzaki, T. Ogihara, S. Umemoto [et al.] // *Journal of hypertension*. – 2011. – Vol.29. – №8. – P.1649 – 1659.

90. Migdalof B.H. Thin-Layer Radiochromatographic Determination of Captopril (SQ 14,225) and its Disulfide Dimer Metabolite in Blood / B.H. Migdalof, S.M. Singhvi, K.J. Kripalani // *Journal of Liquid Chromatography*. – 2006. – Vol.3. – №6. – P. 857 – 865.

91. Naveed S. Analytical Determination of Lisinopril Using UV Spectrophotometer and HPLC: An Overview // *Modern Chemistry and Applications*. – 2014. – Vol.2. – №3. – P. 1 – 3.

92. Neter J.E. Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials / J.E. Neter, B.E. Stam, F.J. Kok [et al.] // *Hypertension*. – 2003. – Vol.42. – №5. – P. 878 – 884.

93. Nogueira R. Validation of a liquid chromatographic method for determination of related substances in a candidate certified reference material of captopril / R. Nogueira, W. Wollinger, T.E. Silva [et al.] // *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2011. – Vol.47. – №2. – P. 351 – 362.

94. Obreshkova D.P. Simultaneous identification and determination of total content of aminoacids in food supplements – Tablets by gas chromatography / D.P. Obreshkova, D.D. Tsvetkova, K.V. Ivanov // *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. – 2012. – Vol.5. – №2. – P. 57 – 68.

95. Olalowo A.W. Simple potentiometry and phenolphthalein–based titrimetric methods of analysis for Lisinopril tablets / A.W. Olalowo, O.M. Adegbolagun, O.A. Bamiro // *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2015. – Vol.9. – №6. – P. 165 – 172.
96. Opie L.H. Angiotensin converting enzyme inhibitors. The advance continues. 3rd edition / L.H. Opie – NY.: Authors' Publishing House. – 1999. – 275 p.
97. Özer D. Determination of lisinopril from pharmaceutical preparations by derivative UV spectrophotometry / D.Özer, H.Senel // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 1999. – Vol.21. – №3. – P. 691 – 695.
98. Patel R.N. Synthesis of chiral side chain of captopril using lipas / R.N. Patel, J.M. Howell, C.G. McNamee [et al.] // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 1992. – Vol.16. – P. 34 – 47.
99. Rahman N. Spectrophotometric determination of lisinopril in commercial dosage forms using N–bromosuccinimide and chloranil / N. Rahman, M. R. Siddiqui, S. N. Azmi // *Chemia Analityczna*. – 2007. – Vol.52. – №3. – P. 465 – 480.
100. Raza A. Spectrophotometric Determination of Lisinopril in Pure and Pharmaceutical Formulations / A. Raza, T.M. Ansari, R. Atta–ur // *Journal of the Chinese Chemical Society*. – 2005. – Vol.52. – №5. – P. 1055 – 1059.
101. Rossi A. The impact of physical activity on mortality in patients with high blood pressure: a systematic review / A. Rossi, A. Dikareva, S.L. Bacon [et al.] // *Journal of hypertension*. – 2012. – Vol.30. – №7. – P. 1277 – 1288.
102. Sakimae A. Screening of micro–organisms producing D–b–acetylthioisobutyric acid / A. Sakimae, E. Hosai, N. Kobayashi [et al.] // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 1992. – Vol.56. – P. 1252 – 1256.
103. Sakur A.A. Direct Spectrophotometric Determination of Perindopril Erbumine and Enalapril Maleate in Pure and Pharmaceutical Dosage Forms using Bromocresol Green / A.A. Sakur, B. Balid // *Research Journal of Pharmacy and Technology*. – 2021. – Vol.14. – №6. – P. 3276 – 3282.
104. Sana A. Simultaneous determination of ACE inhibitors and dexibuprofen in active pharmaceutical ingredient, formulations and human serum by RP–HPLC / A. Sana, S. Naveed, F. Qamar [et al.] // *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. – 2017. – Vol.30. – P. 635 – 639.
105. Schönherr D. Characterisation of selected active agents regarding pKa values, solubility concentrations and pH profiles by Sirius T3 / D. Schönherr, U. Wollatz, D. Haznar–Garbacz [et al.] // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2015. – Vol. 92. – P. 155 – 170.
106. Shimazaki M. Chemical synthesis of captopril from 3–chloro–2D–methyl propanoyl chloride // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 1982. – Vol.30. – P. 3139 – 3146.
107. Shinton R. Meta–analysis of relation between cigarette smoking and stroke / R. Shinton, G. Beevers // *British medical journal*. – 1989. – Vol.298. – №6676. – P. 789 – 794.

108. Stulzer H.K. Compatibility studies between captopril and pharmaceutical excipients used in tablets formulations / H.K. Stulzer, P.O. Rodrigues, T.M. Cardoso [et al.] // *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. – 2008. – Vol.91. – №1. – P. 323 – 328.

109. Taylor R.S. Reduced dietary salt for the prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized controlled trials (Cochrane review) / R.S. Taylor, K.E. Ashton, T. Moxham [et al.] // *American Journal of Hypertension*. – 2011. – Vol.24. – P. 843 – 853.

110. The 17th Edition of the Japanese Pharmacopoeia. // Electronic version / The Ministry of Health, Labour and Welfare / Tokyo, Japan – 2016.

111. The United States Pharmacopoeia 36th revision. / National formular 31th edition (USP 36–NF 31) // Electronic version / The United States Pharmacopoeial Convention / Maryland, United States. – 2013.

112. Trask A.J. Inhibition of angiotensin-converting enzyme 2 exacerbates cardiac hypertrophy and fibrosis in Ren-2 hypertensive rats / A.J. Trask, L. Groban, B.M. Westwood [et al.] // *American Journal of Hypertension*. – 2010. – Vol.23. – №6. – P. 687 – 693.

113. Wang Z.X. Photoluminescent coral-like carbon-branched polymers as nanoprobe for fluorometric determination of captopril / Z.X. Wang, Y.F. Gao, X.H. Yu [et al.] // *Microchimica Acta*. – 2018. – Vol.185. – №9. – P. 1 – 9.

114. Wexler P. Encyclopedia of Toxicology: in 4 vol. Vol. 1 / P.Wexler. – Elsevier Inc., 2014. – 1276 p.

115. Williams B. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension / B. Williams, G. Mancia, W. Spiering [et al.] // *European Heart Journal*. – 2018. – Vol.36. – №10. – P. 1953 – 2041.

116. Wyvratt M.J. Reductive Amination of Ethyl 2-Oxo-4-phenylbutanoate with L-Alanyl-L-proline. Synthesis of Enalapril Maleate / M. J. Wyvratt, E. W. Tristram, T. J. Ikeler [et al.] // *Journal of Organic Chemistry*. – 1984. – Vol.49. – P. 2816 – 2819.

117. Xin X. Effects of alcohol reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials / X. Xin, J. He, M.G. Frontini [et al.] // *Hypertension*. – 2001. – Vol.38. – №5. – P. 1112 – 1117.

118. Zacharis C.K. Chromatographic behavior of the biologically active proline derivative captopril on particulate, monolithic and core-shell narrow bore columns / C.K. Zacharis, T.D. Karakosta, P.D. Tzanavaras [et al.] // *Analytical Methods*. – 2012. – Vol.4. – №12. – P. 4373 – 4377.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

УТВЕРЖДАЮ

Директор
Федерального бюджетного учреждения
«Государственный институт
лекарственных средств и надлежащих
практик» (ФБУ «ГИЛС и НП»)

Шестаков В.Н.

« 15 » _____ 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертации Чепило Дмитрия Андреевича в рабочий процесс Управления по инспектированию производства лекарственных средств и экспертизе в части разработки, аттестации и производства стандартных образцов в ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП»)

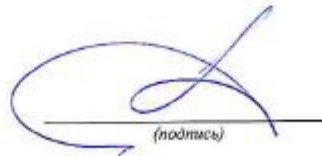
Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Чепило Дмитрия Андреевича

на тему «Разработка стандартных образцов для контроля качества антигипертензивных лекарственных средств – ингибиторов АПФ»

внедрены в рабочий процесс Управления по инспектированию производства лекарственных средств и экспертизе в части разработки, аттестации и производства стандартных образцов в ФБУ «Государственный институт лекарственных средств и надлежащих практик» (ФБУ «ГИЛС и НП»)

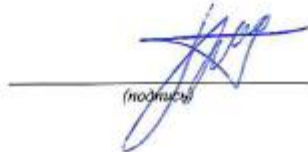
Начальник УИПЛС и Э
к.х.н.



(подпись)

Чадова Н.Н.

Заместитель Начальника
УИПЛС и Э по проекту
«Стандартные образцы»
к.м.н.



(подпись)

Левко А.А.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.
Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)

Литвинова Т.М.

2022 г.

08 ИЮЛ 2022 АКТ
00 115



о внедрении результатов диссертации Чепило Дмитрия Андреевича
в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П.
Арзамасцева Института Фармации им. А.П. Нелюбина

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные
положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации

Чепило Дмитрия Андреевича

на тему «Разработка стандартных образцов для контроля качества
антигипертензивных лекарственных средств – ингибиторов АПФ»

внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии
им. А.П. Арзамасцева Института Фармации им. А.П. Нелюбина

при изучении дисциплины «специальная фармацевтическая химия»,

читаемая студентам по направлениям подготовок (специальностей)
33.05.01 Фармация.

Директор Института
Фармации им. А.П. Нелюбина
д.ф.н., профессор

(подпись)

Раменская Г.В.

Заведующий кафедрой
фармацевтической и
токсикологической
химии им. А.П. Арзамасцева

(подпись)

Раменская Г.В.

Начальник Учебного управления
к.м.н.

(подпись)

Юдина Л.Ю.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

УТВЕРЖДЕНО
 приказом Федерального агентства
 по техническому регулированию
 и метрологии
 от «20» июля 2021 г. № 1384

Регистрационный № ГСО 11697-2021

Лист № 1
Всего листов 3

ОПИСАНИЕ ТИПА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА

СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ СОСТАВА КАПТОПРИЛА (НЦСО-Каптоприл)

Назначение стандартного образца: контроль точности результатов измерений и аттестация методик измерений массовой доли основного вещества в субстанции каптоприла, фармацевтических препаратах и материалах, в состав которых входит каптоприл. Стандартный образец может использоваться для:

- установления и контроля стабильности градуировочной (калибровочной) характеристики при соответствии метрологических характеристик стандартного образца требованиям методики измерений;
- калибровки средств измерений при соответствии метрологических характеристик стандартного образца требованиям методики калибровки.

Области экономики и сферы деятельности, где планируется применение стандартного образца: здравоохранение, фармацевтическая промышленность, научные исследования.

Описание стандартного образца: стандартный образец представляет собой субстанцию каптоприла, порошок белого или почти белого цвета (2S)-1-[(2S)-2-метил-3-сульфанилпропанонил]пирролидин-2-карбоновой кислоты, расфасованный по 200 мг во флаконы темного стекла марки ОС или ОС-1 с кримповыми крышками. Каждый флакон снабжается этикеткой, оформленной согласно требованиям ГОСТ Р 8.691-2010 и помещается в полиэтиленовый пакет.

Разработчик стандартного образца – ООО «НЦСО».

Форма выпуска: серийное производство периодически повторяющимися партиями.

Метрологические характеристики: аттестуемая характеристика – массовая доля каптоприла, %

Т а б л и ц а 1 – Нормированные метрологические характеристики

Аттестуемая характеристика	Интервал допустимых аттестованных значений, %	Границы допустимых значений абсолютной погрешности при $P=0,95$, %	Допускаемые значения абсолютной расширенной неопределенности при $k=2$, $P=0,95$, %
Массовая доля каптоприла	от 95,0 до 100,0	$\pm 1,0$	1,0

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

УТВЕРЖДЕНО
 приказом Федерального агентства
 по техническому регулированию
 и метрологии
 от «22» декабря 2021 г. № 2966

Регистрационный № ГСО 11691-2021

Лист № 1
Всего листов 3

ОПИСАНИЕ ТИПА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА

СТАНДАРТНЫЙ ОБРАЗЕЦ СОСТАВА ЭНАЛАПРИЛА МАЛЕАТА
 (НЦСО-Эналаприл)

Назначение стандартного образца: контроль точности результатов измерений и аттестация методик измерений массовой доли основного вещества в субстанции эналаприла малеата, фармацевтических препаратах и материалах, в состав которых входит эналаприла малеат. Стандартный образец может использоваться для:

- установления и контроля стабильности градуировочной (калибровочной) характеристики при соответствии метрологических характеристик стандартного образца требованиям методики измерений;
- калибровки средств измерений при соответствии метрологических характеристик стандартного образца требованиям методики калибровки.

Области экономики и сферы деятельности, где планируется применение стандартного образца: здравоохранение, фармацевтическая промышленность, научные исследования.

Описание стандартного образца: стандартный образец представляет собой субстанцию эналаприла малеата, порошок белого цвета (2RS)-1-[(2S)-2-[[[(1S)-3-Фенил-1(этоксикарбонил)пропил]амино]пропаноил]пирролидин-2-карбоновой кислоты (2Z)-бут-2-ендиоат (1:1), расфасованный по 200 мг во флаконы темного стекла марки ОС или ОС-1 с кримповыми крышками. Каждый флакон снабжается этикеткой, оформленной согласно требованиям ГОСТ Р 8.691-2010 и помещается в полиэтиленовый пакет.

Разработчик стандартного образца – ООО «НЦСО».

Форма выпуска: серийное производство периодически повторяющимися партиями.

Метрологические характеристики: аттестуемая характеристика – массовая доля эналаприла малеата, %

Т а б л и ц а 1 – Нормированные метрологические характеристики

Аттестуемая характеристика	Интервал допускаемых аттестованных значений, %	Границы допускаемых значений абсолютной погрешности при $P=0,95$, %	Допускаемые значения абсолютной расширенной неопределённости при $k=2$, $P=0,95$, %
Массовая доля эналаприла малеата	от 95,0 до 100,0	$\pm 1,0$	1,0