

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени И.М. СЕЧЕНОВА

На правах рукописи

Гегечкори
Владимир Ираклиевич

РАЗРАБОТКА ФАРМАКОПЕЙНЫХ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПЕПТИДНОЙ СТРУКТУРЫ

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат фармацевтических наук, доцент
Щепочкина Ольга Юрьевна

Москва – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 13 |
| 1.1 История применения стандартных образцов и современное состояние нормативной базы за рубежом и в Российской Федерации..... | 16 |
| 1.2 Стандартные образцы для фармакопеи..... | 18 |
| 1.3 Стандартные образцы, произведенные другими производителями..... | 21 |
| 1.4 Характеристика объектов исследования – лекарственных средств пептидной структуры | 26 |
| 1.5 Синтез фармакопейных субстанций препаратов Дилепт и ГБ-115..... | 28 |
| 1.6 Методы анализа соединений пептидной структуры..... | 33 |
| 1.6.1 Химическая идентификация пептидных препаратов..... | 34 |
| 1.6.2 Титриметрические методы анализа | 35 |
| 1.6.3 Спектральные методы анализа..... | 36 |
| 1.6.3.1 УФ-спектрофотометрия..... | 36 |
| 1.6.3.2 ИК-спектрометрия..... | 37 |
| 1.6.3.3 ЯМР-спектроскопия..... | 37 |
| 1.6.4 Хроматографические методы анализа | 38 |
| 1.6.4.1 Высокоэффективная жидкостная хроматография..... | 39 |
| 1.6.4.2 Газо-жидкостная хроматография..... | 39 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 41 |
| 2.1. Объекты исследования..... | 41 |
| 2.2.Используемое оборудование..... | 41 |
| 2.3. Используемые реактивы..... | 43 |
| 2.4. Используемые ранее разработанные методики..... | 43 |
| 2.4.1. Методики определения посторонних примесей методов ВЭЖХ..... | 43 |
| 2.4.2. Методики определения количественного содержания..... | 45 |
| ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ДИЛЕПТА..... | 46 |
| 3.1 Разработка методик анализа стандартного образца Дилепта..... | 46 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1.1 Внешний вид стандартного образца Дилепта..... | 46 |
| 3.1.2 Растворимость стандартного образца Дилепта..... | 46 |
| 3.1.3 Прозрачность и цветность растворов стандартного образца Дилепта..... | 47 |
| 3.1.4 Определение температуры плавления стандартного образца Дилепта..... | 48 |
| 3.1.5 Определение удельного вращения растворов стандартного образца Дилепта..... | 49 |
| 3.1.6. Определение содержания воды в стандартном образце Дилепта..... | 49 |
| 3.1.7. Определение сульфатной золы в стандартном образце Дилепта..... | 50 |
| 3.1.8. Определение тяжелых металлов в стандартном образце Дилепта..... | 50 |
| 3.2. Изучение спектральных характеристик стандартного образца Дилепта..... | 51 |
| 3.2.1 УФ-спектрофотометрия в анализе стандартного образца Дилепта..... | 51 |
| 3.2.2 ИК-спектрометрия в анализе стандартного образца Дилепта..... | 54 |
| 3.2.3 ЯМР-спектроскопия в анализе стандартного образца Дилепта..... | 55 |
| 3.3 Хроматографические методы в контроле качества стандартного образца Дилепта..... | 61 |
| 3.3.1 Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе стандартного образца Дилепта..... | 61 |
| 3.3.2 Газо-жидкостная хроматография в анализе стандартного образца Дилепта..... | 64 |
| 3.4 Количественное определение Дилепта методом Кьельдаля..... | 80 |
| 3.5 Установление показателей качества и норм для стандартного образца Дилепта..... | 81 |
| ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ГБ-115..... | 86 |
| 4.1 Разработка методик анализа стандартного образца ГБ-115..... | 86 |
| 4.1.1 Внешний вид стандартного образца ГБ-115..... | 86 |
| 4.1.2 Растворимость стандартного образца ГБ-115..... | 86 |
| 4.1.3 Прозрачность и цветность растворов стандартного образца ГБ-115..... | 87 |
| 4.1.4 Определение температуры плавления стандартного образца ГБ-115..... | 88 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.1.5 | Определение удельного вращения растворов стандартного образца ГБ-115..... | 89 |
| 4.1.6. | Определение содержания воды в стандартном образце ГБ-115..... | 89 |
| 4.1.7 | Определение сульфатной золы в стандартном образце ГБ-115..... | 90 |
| 4.1.8. | Определение тяжелых металлов в стандартном образце ГБ-115..... | 90 |
| 4.2 | Изучение спектральных характеристик стандартного образца ГБ-115..... | 91 |
| 4.2.1 | УФ-спектрофотометрия в анализе стандартного образца ГБ-115..... | 91 |
| 4.2.2 | ИК-спектрометрия в анализе стандартного образца ГБ-115..... | 94 |
| 4.2.3 | ЯМР-спектроскопия в анализе стандартного образца ГБ-115..... | 96 |
| 4.3 | Хроматографические методы в контроле качества стандартного образца ГБ-115..... | 100 |
| 4.3.1 | Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе стандартного образца ГБ-115..... | 101 |
| 4.3.2 | Газо-жидкостная хроматография в анализе стандартного образца ГБ-115..... | 103 |
| 4.4 | Количественное определение ГБ-115 методом Къельдаля..... | 118 |
| 4.5 | Установление показателей качества и норм для стандартного образца ГБ-115..... | 119 |
| | ОБЩИЕ ВЫВОДЫ..... | 124 |
| | СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ..... | 126 |
| | СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... | 127 |
| | ПРИЛОЖЕНИЕ..... | 139 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Интенсивное развитие фармацевтической отрасли приводит к повышению уровня технического оснащения, расширению номенклатуры лекарственных средств (ЛС), повышению требований к их качеству и методам контроля. Это вывело требования к фармакопейному анализу на совершенно другой уровень и определило чёткую тенденцию к переходу на расширенное использование сложных, селективных, высокочувствительных физических и физико-химических методов анализа. Обзор ведущих зарубежных фармакопей позволяет сделать заключение, что для установления подлинности, анализа чистоты и количественного определения ЛС преимущественно используются именно такие методы, реализация которых предусматривает использование стандартных образцов [1]. Во-первых, это позволяет совершенствовать подходы и требования к контролю качества ЛС, делает фармацевтический анализ объективным и достоверным. Во-вторых, гарантирует поступление на рынок эффективной и безопасной лекарственной продукции. В связи с этим, актуальна необходимость наличия и доступности стандартных образцов фармацевтических субстанций.

Степень разработанности темы исследования

Проблеме создания стандартных образцов посвящены работы академика РАМН, профессора Арзамасцева А.П., профессора Садчиковой Н.П, профессора Дорофеева В.Л и др. ученых [2, 3, 4, 5]. Благодаря их исследованиям впервые общая фармакопейная статья «Стандартные образцы» была включена в XI фармакопею СССР [59]. На данный момент Федеральным законом № 429-ФЗ от 22.12.2014 г. «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств», вводятся определения стандартного образца и фармакопейного стандартного образца, произведённого в соответствии с фармакопейной статьей [6, 7]. "19.1) стандартные образцы - вещества, посредством сравнения с которыми осуществляется контроль качества исследуемых лекарственных средств с помощью физико-химических и

биологических методов в целях подтверждения соответствия лекарственных средств требованиям нормативной документации, установленным при осуществлении государственной регистрации, и которые применяются для калибровки стандартных образцов производителя лекарственных средств, используемых для контроля качества и иных целей при обращении лекарственных средств». К сожалению, в ГФ XIII общая статья не включена [23].

Согласно Европейской фармакопее (EP) стандартные образцы используют для достижения надлежащего уровня контроля качества лекарственных средств [8,9]. Стандартные образцы применяют для контроля качества лекарственных средств, начиная от разработки лекарственных препаратов и вплоть до их использования потребителем. При разработке лекарственных средств уже на стадии валидации аналитических методик необходимо уделять серьёзное внимание использованию стандартных образцов.

Доступность стандартных образцов фактически во многом определяет уровень контроля качества лекарственных средств в стране. Политика американской фармакопеи (USP) состоит в том, что примерно для 80 % препаратов, находящихся на рынке, должны быть введены в действие фармакопейные монографии и, соответственно, иметься фармацевтические стандартные образцы, необходимые для контроля качества и субстанции, и препарата. Номенклатура фармацевтических стандартных образцов USP составляет около 2600 наименований [3]. Для сравнения, в Российской Федерации в настоящий момент в фармацевтическом анализе используются стандартные образцы зарубежных фармакопей и практически нет отечественных (около 60). Вопрос о статусе (государственной регистрации или включении в Государственный реестр ЛС) фармакопейных стандартных образцов на лекарственные препараты отечественного производства с действующими веществами, не включёнными в иностранные фармакопеи (EP, BP, USP и др.), представляет собой пробел в существующем нормативном регулировании, а именно: отсутствует порядок утверждения нормативной документации на

стандартные образцы и включения их в Государственный реестр лекарственных средств [10, 11].

В последние годы основным направлением исследований ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» является создание высокоэффективных лекарственных средств пептидной структуры, обладающих различной фармакологической активностью.

Специфика применения, широкий спектр фармакологической активности, а также вопросы безопасности лекарственных средств неразрывно связаны с повышением предъявляемых требований к их качеству. В связи с этим стандартизацию оригинальных лекарственных средств необходимо проводить высокочувствительными, точными и специфичными современными физико-химическими методами анализа, поэтому, актуальным является разработка стандартных образцов и фармакопейных статей на них.

Цель исследования: разработать фармакопейные стандартные образцы, предназначенные для стандартизации и контроля качества отечественных инновационных лекарственных средств пептидной структуры Дилепта и ГБ-115 по показателям «Идентификация», «Посторонние примеси» и «Количественное определение».

Задачи исследований:

1. Изучить современное состояние и перспективы совершенствования системы обеспечения качества ЛС и определить основные тенденции развития стандартизации ЛС пептидной структуры за рубежом и в РФ.
2. Провести комплексные исследования по изучению физико-химических свойств и разработке методик анализа стандартных образцов Дилепта и ГБ-115 с помощью методов ИК-спектromетрии, УФ-спектрофотометрии и ЯМР-спектроскопии для подтверждения их подлинности.

3. Наиболее полно охарактеризовать качество стандартных образцов ГБ-115 и Дилепта по общим показателям фармакопейного анализа (описание, растворимость, удельное вращение, температура плавления, вода, сульфатная зола, тяжелые металлы) и установить нормы для включения в фармакопейные статьи.
4. Провести хроматографический анализ чистоты стандартных образцов ГБ-115 и Дилепта по показателю «Посторонние примеси» с помощью метода ВЭЖХ, установить нормы для включения в фармакопейные статьи.
5. Разработать и валидировать методики оценки фармакопейных стандартных образцов ГБ-115 и Дилепта по показателю «Остаточные органические растворители» с помощью метода ГЖХ; установить нормы по данному разделу.
6. Провести количественное определение стандартных образцов ГБ-115 и Дилепта методом Кьельдаля, оценить возможность их использования в качестве фармакопейных стандартных образцов.
7. Разработать фармакопейные статьи на полученные фармакопейные стандартные образцы Дилепта и ГБ-115.

Научная новизна

Проведены комплексные исследования по изучению физико-химических свойств и разработке методик анализа стандартных образцов Дилепта и ГБ-115 с помощью методов ИК-спектроскопии, УФ-спектрофотометрии и ЯМР-спектроскопии для надежного подтверждения их подлинности.

Разработаны и валидированы методики определения "Остаточных органических растворителей" с помощью метода ГЖХ. Обоснованы и установлены нормы для включения в нормативную документацию.

Разработаны фармакопейные статьи на стандартные образцы лекарственных средств пептидной структуры – Дилепта и ГБ-115. Впервые обоснована возможность использования полученных стандартных образцов для контроля

качества ЛС пептидной структуры – Дилепта и ГБ-115 – по показателям «Идентификация», «Посторонние примеси» и «Количественное определение».

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

Подходы к разработке фармакопейных стандартных образцов лекарственных веществ пептидной структуры могут быть рекомендованы при решении подобных задач для других лекарственных веществ пептидной структуры. Разработаны методики аналитического контроля стандартных образцов Дилепта и ГБ-115, установлены нормы качества. Разработанные методики внедрены в работу опытно-технологического отдела ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» для анализа стандартных образцов Дилепта и ГБ-115.

Оформлены проекты ФС на стандартные образцы Дилепта и ГБ-115.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Обоснование необходимости комплексных испытаний для надежной идентификации стандартных образцов пептидных препаратов – ГБ-115 и Дилепта с использованием спектральных методов анализа (УФ-спектрофотометрии, ИК-спектрометрии и ЯМР C^{13} -спектроскопии).
2. Экспериментальное обоснование необходимости проведения контроля качества стандартных образцов по общим фармакопейным испытаниям (растворимость, удельное вращение, вода, сульфатная зола, тяжелые металлы) и установление норм по этим показателям.
3. Результаты хроматографического анализа чистоты стандартных образцов ГБ-115 и Дилепта с применением метода ВЭЖХ. Установление норм по показателю «Посторонние примеси».
4. Методики определения остаточных органических растворителей в стандартных образцах ГБ-115 и Дилепта методом ГЖХ и их валидационные характеристики.

5. Экспериментальные данные количественного определения стандартных образцов ГБ-115 и Дилепта методом Къельдаля и обоснование возможности использования полученных стандартных образцов ГБ-115 и Дилепта в качестве фармакопейных стандартных образцов.
6. Обоснование показателей и норм качества полученных фармакопейных стандартных образцов ГБ-115 и Дилепта для включения в фармакопейные статьи.

Методология и методы исследования

Методология исследования базировалась на общих принципах фармакопейного анализа по установлению критериев и норм качества комплекса методов, обеспечивающих достижения требуемого уровня качества стандартных образцов лекарственных средств.

В ходе работы были применены методы УФ-спектрофотометрии, ИК-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии. Хроматографический анализ проводили с помощью ВЭЖХ с УФ-детектированием, а также ГЖХ с пламенно-ионизационным детектором. Количественное определение стандартных образцов проводили с помощью метода Къельдаля. Полученные результаты обработаны с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel.

Достоверность научных положений и выводов

Первичные данные, полученные в результате проведения настоящего исследования, получены при помощи современных методов анализа, являются достоверными и точными, что подтверждено в ходе проведения валидации разработанных методик. Использованное оборудование имело действующие свидетельства о поверке и зарегистрировано в Реестре средств измерения, что позволяет считать результаты исследования достоверными.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на XXI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство». (Москва, апрель 2014), на Факультетской научно-практической конференции посвященной 110-летию со дня рождения Заслуженного деятеля науки СССР, д.б.н., профессора Швайковой М.Д. ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Москва, июнь 2015). Также результаты были представлены на Международной научно-практической конференции «Фармацевтическое образование, наука и производство – ориентир на стратегию «Казахстан-2020». (Казахстан, Шымкент, октябрь 2014).

Апробация диссертации состоялась «03» февраля 2017 г. на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ОД ИФиТМ ФГБОУ ВО Первый МГМУ имени им. И.М. Сеченова.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. Вклад автора является определяющим на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментально-теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикация, тезисах и докладах.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 2 и 3 специальности «Фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 8 печатных работ, из них – 4 в изданиях из перечня ВАК и 2 в изданиях, включенном в базу данных Scopus.

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной темы кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева ОД ИФиТм ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования». Номер государственной регистрации: 01.2.011.68237. Соответствует плану научных исследований кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева «Основные направления создания и оценки качества лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01.2.009.07145).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 140 страницах машинописного текста, и приложения, состоит из введения, 4 глав, содержащих обзор литературных данных по излагаемой теме (1 глава), экспериментальной части (собственного исследования), где описаны: материалы и методы, использованные в ходе проведения эксперимента (2 глава), изучение физико-химических свойств и разработка методик анализа стандартного образца Дилепта (3 глава), изучение физико-химических свойств и разработка методик анализа стандартного образца ГБ-115 (4 глава), общих выводов, списка сокращений и списка литературы.

Диссертация включает 34 таблицы и 23 рисунка. Библиографический список содержит 117 источников.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

Целью настоящего обзора литературы является анализ информации о стандартных образцах, анализ отечественной и зарубежной литературы, посвященной разработке стандартных образцов (СО), а также нормативной документации на полученные СО, изучению синтеза и очистки субстанций исследуемых лекарственных средств, а также изучение подходов к фармакопейному анализу лекарственных препаратов пептидной структуры.

Качество лекарственных средств и процесс стандартизации являются неразделимыми понятиями. В настоящее время фармакопейный анализ любого лекарственного средства включает в себя оценку качества по трем основным направлениям, таким как: идентификация лекарственного средства – анализ подлинности, оценка чистоты лекарственного средства - иначе говоря, оценивается содержание примесей различного происхождения, а также количественное определение - установление содержания лекарственного вещества в исследуемом образце. В современном мире появились дополнительные проблемы, связанные не только с наличием производственного брака, но и с умышленной фальсификацией продукции фармацевтического производства. Подобные проблемы повышают требования к анализу лекарственных средств и диктуют необходимость расширения спектра используемых физических и физико-химических методов анализа, так как спектральные и хроматографические методы удобны тем, что дают большой объем качественной информации за сравнительно небольшой промежуток времени, а также могут предоставить уникальную информацию о содержании следовых количеств примесей. В условиях контрольно-аналитических лабораторий, а также лабораторий контроля качества на производстве, широкое применение находят различные современные методы анализа. В частности, спектральные методы: УФ-спектрофотометрии и ИК-спектрометрии, масс-спектрометрия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), атомно-абсорбционная спектроскопия

(ААС), атомно-эмиссионная спектроскопия (АЭС). Огромное значение в фармакопейном анализе получили хроматографические методы анализа: высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газо-жидкостная хроматография (ГЖХ), а также тонкослойная хроматография (ТСХ). Не теряют своей актуальности определение температуры плавления, температуры кипения и другие методы анализа, такие как поляриметрия и рефрактометрия.

Обзор современной нормативной документации на производимые лекарственные препараты, такие как зарубежные фармакопеи ведущих стран мира, фармакопейные статьи, а также технические условия на лекарственные препараты, позволяет сделать выводы, что для определения качества большинства лекарственных препаратов преимущественно используются именно физические и физико-химические методы. Тем ни менее ведется постоянная работа по усовершенствованию приборов и методик проведения анализа; кроме того, ведутся изыскания по увеличению чувствительности и селективности, используемых физических и физико-химических методов анализа.

При использовании физических и физико-химических методов оценки качества лекарственных средств проводится оценка свойств, имеющих постоянные характеристики для каждого определенного вещества, что позволяет охарактеризовать указанные свойства один раз и использовать их в дальнейшем анализе последующих серий данного лекарственного препарата. В свою очередь на ход проведения и результат анализа могут влиять различные факторы, не имеющие постоянных значений, например, температура, влажность и давление; кроме того, большое влияние на исследование имеет используемое оборудование различных производителей, серий, комплектаций и амортизации.

Один из наиболее эффективных способов преодолеть возможные неточности в процессе проведения анализа при использовании физико-химических методов — это использование фармакопейных стандартных образцов.

Стандартный образец — это аутентичный гомогенный материал, предназначенный для применения при определенных химических и физических

испытаниях, в которых его свойства сравниваются со свойствами испытуемого препарата, и имеющий степень чистоты, достаточную для предполагаемого использования [26]. Другими словами, стандартные образцы представляют собой точно охарактеризованные вещества, которые подвергаются при контроле качества тому же комплексу методик, что и исследуемый препарат. Например, одинаковое положение пятен на пластинке для тонкослойной хроматографии стандартного и исследуемого веществ или одинаковый спектр, полученный в ИК-спектрометрии стандартного и исследуемого веществ, свидетельствуют о подлинности лекарственного препарата. В качестве стандартного образца может использоваться как само лекарственное вещество, так и примеси, которые требуют качественной и количественной оценки в анализе лекарственного препарата.

Для некоторых лекарственных препаратов разработаны методики физических и физико-химических методов анализа без использования стандартных образцов (например, метод УФ-спектрофотометрии по удельному показателю поглощения для количественного определения фармацевтических субстанций).

Примером подобных методик может служить использование тонкослойной хроматографии с применением внутреннего стандарта за счет нанесения небольшого количества испытуемого вещества, 1-2 мг, наряду с большим количеством, например, 100 мкг. При этом любое дополнительное пятно, полученное при хроматографировании большего количества вещества, не должно быть более интенсивным, чем основное пятно, наблюдаемое на хроматограмме с меньшим количеством вещества. Несмотря на возможность проведения тонкослойной хроматографии без использования СО, нельзя забывать о необходимости стандартизовать процесс проведения данного вида исследования, некоторые аспекты которого, такие как качество и пригодность приготовленной системы, сорбента, детектирующих реактивов или полнота насыщения камеры, невозможно предугадать. Другим примером проведения исследования без использования СО можно считать подход к ИК-спектрометрии,

подразумевающий возможность исключения СО в процессе идентификации. Взамен предлагается определять некоторые характеристики спектра или представлять копию «аутентичного» спектра, который мог бы использоваться для сравнения (ГФ XII, ГФ XIII, ВР 9 и др.). Но в настоящее время этот подход затруднителен вследствие отличий в характере спектров, полученных на приборах различных производителей, различий в разрешающей способности приборов, проблем, связанных с полиморфизмом и образованием сольватов, а также особенностей пробоподготовки. Такие подходы можно считать обоснованными, если нет возможности производства стандартного образца необходимого качества; в других случаях использование СО является необходимым для достоверного проведения анализа.

1.1. История применения стандартных образцов и современное состояние нормативной документации за рубежом и в Российской Федерации

Началом использования стандартных образцов можно считать создание Фармакопейной комиссии Соединенных Штатов Америки в области стандартных образцов в 1931 г., когда был принят биологический стандарт для количественного определения наперстянки. К 1950 году Фармакопея США (XIV) содержала 40 стандартных образцов, большинство из которых использовалось для химических испытаний и количественного определения. Число стандартных образцов постоянно возрастало, и издание XVIII Фармакопеи 1970 г. уже включало 240 стандартов [37].

Аналогичное развитие наблюдалось при рассмотрении программы стандартных образцов Национального формуляра США. В издании 1960 г. описано 5 стандартных образцов; число их возросло соответственно до 42 (в 1960 г.), 91 (в 1965 г.) и 238 в XIII Национальном формуляре 1970 г. издания.

Следующим шагом развития использования СО является решение Комитета экспертов Всемирной Организации Здравоохранения по спецификациям для фармацевтических препаратов в 1952 г. принять рекомендацию другого комитета ВОЗ – Комитета по биологической стандартизации – о создании коллекции

аутентичных (подлинных) химических веществ, состоящей из соединений, ранее применявшихся в качестве международных биологических стандартов. Подлинные химические вещества были необходимы для количественного определения препаратов, описанных в Международной фармакопее, а некоторые из них предназначались для научных исследований [37].

В соответствии с упомянутой выше рекомендацией Комитета экспертов ВОЗ (1952) и соглашением между ВОЗ и Шведским аптечным обществом при Аптечной контрольно-аналитической лаборатории в Стокгольме в 1956 г. был создан Международный справочный центр ВОЗ по химическим стандартным образцам – WHO Centre for Chemical Reference Substances.

Стандартные химические образцы впервые были упомянуты в Британской фармакопее издания 1963 г., когда были введены аутентичные вещества для идентификации лекарственных средств методом ИК-спектromетрии, и позже для количественного определения лекарственных препаратов фотометрическими методами [37].

Первые стандартные образцы были разработаны в 1964 г. и с тех пор выпускаются Британской фармакопейной комиссией. За последнее время число аутентичных стандартных образцов в Британской фармакопее возросло до 300 наименований.

Согласно терминологии Британской фармакопеи и Фармацевтического кодекса, аутентичный образец – вещество обычного, обеспечиваемого химико-фармацевтической промышленностью качества, отвечающее требованиям фармакопеи и необходимое для специальных исследований. Применение аутентичных образцов для ИК-спектromетрии основывается на необходимости идентификации соединений, имеющих очень близкое строение, подлинность которых нельзя с достаточной достоверностью установить другими способами.

Таким образом, вначале предполагалось, что применение аутентичных образцов будет ограничено ИК-спектromетрией. Однако в последующих изданиях Британской фармакопеи использование аутентичных образцов расширилось; их рекомендуется применять в хроматографических испытаниях на посторонние

примеси, а также для количественного определения лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций [37].

Первые стандартные образцы, разработанные и произведенные в СССР, вошли в Государственную фармакопею IX издания в 1961 г. Так как проблема разработки и производства СО была крайне актуальна в условиях развития фармацевтической промышленности, список СО ежегодно увеличивался.

В настоящее время ситуация, связанная со стандартными образцами в разных странах мира, отличается. Практически все ведущие фармакопеи мира содержат ссылки на стандартные образцы лекарственных препаратов, а также их использование в физических и физико-химических методах анализа. Однако проблема классификации стандартных образцов не решена и в настоящее время. Данной проблеме посвящен отчет ISO (ISO/TR 10989:2009(E)), в котором была совершена попытка классификации всех химических стандартных образцов в зависимости от их свойств, области применения стандартных образцов, а также материала, использованного для производства стандартных образцов. В целом все стандартные образцы можно разделить на две группы:

- Стандартные образцы фармакопеи
- Стандартные образцы, произведенные другими производителями.

1.2.Стандартные образцы фармакопеи

Термин «стандартные образцы фармакопеи» употребляется для стандартных образцов, произведенных для одной из двух главных фармакопей: Европейской или Американской. Однако различные ведущие фармакопеи таких стран, как Великобритания, Франция, Япония, также содержат ссылки на стандартные образцы. Также в отдельную группу можно выделить стандартные образцы для Международной фармакопеи, разрабатываемые и контролируемые WHO Centre for Chemical Reference Substances начиная с 1956 г [13,14, 17].

Эталонное химическое вещество Европейской фармакопеи (European Pharmacopoeia Chemical Reference Substance, EPCRS) – вещество или смесь веществ, предназначенная для использования таким образом, который определен

в монографии или в основном тексте Фармакопеи. Эталонные химические вещества Европейской фармакопеи - это первичные эталоны, за исключением эталонных веществ, действие которых выражается в Международных единицах (Антибиотики). Первичный эталон (Primary standard) – эталон, для которого установлено, что имеет свойства, соответствующие для предусмотренного применения, установление этого соответствия происходит без сравнения с существующим эталоном [13].

Согласно Американской фармакопее, стандартные образцы – это материалы, одобренные USP Reference Standards Expert Committee, пригодные для применения в качестве эталонного вещества в тестах и анализах, проводимых по указаниям USP, описанным в советующих монографиях [14].

Несмотря на различные формулировки данных определений, они соответствуют подходу, принятому в системе Надлежащей лабораторной практики (GLP), определяющей работу лабораторий, задействованных в анализе качества лекарственных препаратов. GLP определяет стандартные образцы как каждый хорошо охарактеризованный материал, отличный от материала исследования, и используемый в сравнительных целях [15].

Стандартные образцы используются в первую очередь для сравнения в качественном и количественном анализе действующего вещества, а также возможных примесей и вспомогательных веществ. Кроме того, фармакопеи подразумевают использование стандартных образцов, например, стандартных образцов температуры плавления, для калибровки аппаратуры, необходимой для проведения испытаний. Использование стандартных образцов также включает в себя калибровку аппаратуры, а также подтверждение эффективности аналитической системы (колонок) в хроматографическом анализе. Последние стандарты представляют собой раствор, чаще нескольких веществ. Отличием их является то, что они не используются в качественном или количественном анализе, а применяются в исследовании пригодности хроматографической системы в конкретном случае. С помощью данных стандартов возможно изучить такие параметры колонок для газового или жидкостного хроматографа, как

эффективность или разрешение. Так как эти параметры зависят не только от свойств колонки, но также и от состава разделяемых смесей, в стандартных образцах такого рода должны находиться образцы разделяемых веществ.

В отдельную категорию стандартных образцов необходимо выделить группу стандартных образцов для Международной фармакопеи. Началом этой фармакопеи служат первые публикации Всемирной организации здравоохранения в 1951 г. монографий, необходимых для начала процесса гармонизации подходов к качественному и количественному анализу лекарственных препаратов. Стандартные образцы, разрабатываемые и используемые согласно Международной фармакопее, получили название Международные эталонные химические вещества (International Chemical Reference Substances, ICRS). Производством и поставкой данных образцов занимается организация European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), также производящая стандартные образцы, необходимые для контроля качества согласно Европейской фармакопее. Международные эталонные химические вещества являются первичными эталонами и могут использоваться не только в качественном и количественном анализе лекарственных препаратов согласно Международной фармакопее, но и для установления вторичных эталонов. Получение вторичных эталонов происходит путем сравнения соединений с первичными эталонами данных соединений [17, 20, 21].

Отличием стандартных образцов Международной фармакопеи от стандартных образцов Европейской и Американской фармакопеи является нормативная документация, поставляемая вместе со стандартным образцом. Для стандартных образцов Европейской фармакопеи существуют документы под названием «Batch validity statement» и «Leaflet», которые содержат некоторую информацию, а стандартные образцы Американской фармакопеи сопровождаются документом «USP Certificate», не содержащим никаких аналитических данных. Нормативная документация, сопровождающая стандартные образцы WHO, содержит наибольшее количество аналитических данных, характеризующих

стандартный образец качественно и количественно, а также его чистоту [13, 14, 17, 19].

Кроме химических стандартных образцов лекарственных препаратов Всемирная организация здравоохранения занимается производством международных стандартных образцов антибиотиков (International Standards for Antibiotics, ISA) и стандартов для биологических препаратов, за их производство отвечает WHO Expert Committee on Biological Standardization (ECBS). Две эти группы стандартных образцов используются в первую очередь для сравнения в производстве вторичных эталонов, необходимых для национального и регионального пользования [20, 21].

1.3. Стандартные образцы, произведенные другими производителями

В условиях постоянного увеличения производства и разработки новых лекарственных препаратов увеличивается потребность в стандартных образцах, а также в получении стандартных образцов для новых лекарственных препаратов. Таким образом, процесс получения стандартных образцов постепенно переходит к производителям [16].

Сторонним производителем может быть, как предприятие, производящее вторичные эталоны, так и лаборатория, разрабатывающая стандартные образцы для своих собственных потребностей. Во втором случае лаборатория может производить как вторичные эталоны, связанные с фармакопеями, так и стандартные образцы из собственного материала.

Производством вторичных эталонов занимаются лаборатории, работающие непосредственно по методикам, утвержденными фармакопеями. Если данная лаборатория применяет в своей работе процедуры, описанные точно в какой-либо из ведущих фармакопей, она должна применять стандартные образцы, описанные и утвержденные именно данной фармакопеей. Так как процесс закупки, транспортировки и хранения первичных эталонов является крайне трудоемким и дорогостоящим, лаборатории могут проводить процесс самостоятельного

изготовления вторичного эталона путем сравнения его с первичным эталоном какой-либо из фармакопей. Таким образом появляется возможность получить стандартный образец надлежащего качества и одновременно снизить расходы, связанные с использованием первичного эталона.

В условиях постоянной разработки и усовершенствования продуктов фармацевтического производства возможны ситуации, когда фармакопеи не предлагают стандартных образцов веществ, которые необходимо исследовать. Одним из решений является изготовление лабораторией или фармацевтическим предприятием нужного стандартного образца, который в дальнейшем и будет использоваться в контроле качества лекарственного препарата. Стандартные образцы, произведенные сторонними производителями и не связанные с первичными стандартными эталонами какой-либо из фармакопей, можно разделить на следующие группы [12, 15, 19, 20]:

- Стандартные образцы активных фармацевтических веществ и их примесей, имеющих молекулярную массу, приближенную к молекулярной массе основного вещества;
- Стандартные образцы примесей с низкой молекулярной массой;
- Стандартные образцы вспомогательных веществ;
- Стандартные образцы активных веществ, выделенных из растений;
- Стандартные образцы для физико-химических анализов.

Указания по разработке и производству сформулировала организация The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), задачей которой является гармонизация требований к регистрации лекарственных средств. Данная организация опубликовала несколько руководств, касающихся процесса разработки стандартных образцов. В руководстве «Good manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients» (ICH Q7) установлено: «Если первичный стандартный эталон недоступен из официального источника, следует установить «внутренний первичный эталон» («in-house primary standard»). Следует провести соответствующие тесты, чтобы вполне исследовать идентичность и чистоту

первичного стандартного эталона. Следует надлежащим образом документировать ход этих тестов». Однако ни руководство ICH Q7, ни другие литературные источники не дают указаний, какие именно тесты необходимо провести в процессе разработки первичного стандартного эталона, чтобы признать его таковым. Стоит сказать, что эти тесты, а также объем проводимых исследований, должны обладать максимальной информативностью и позволять всесторонне охарактеризовать получаемый стандартный образец. Основываясь на анализе литературных источников, а также различной нормативной документации на уже разработанные стандартные образцы, можно выделить несколько обязательных тестов и методов анализа [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,]:

- Идентификация несколькими различными методами (ПМР-спектроскопия, ЯМР-спектроскопия, ИК-спектрометрия, Масс-спектроскопия, УФ-спектрофотометрия);
- Определение посторонних примесей, наиболее информативными методами, таким как ВЭЖХ с различными детекторами;
- Содержание действующего вещества должно быть определено с помощью независимого метода, такого как титрование;
- Определение воды по методу Карла Фишера;
- Определение остаточных органических растворителей;
- Потеря в массе при высушивании (сумма содержания летучих растворителей и воды);
- Температура плавления;
- Определение тяжелых металлов (Атомно-абсорбционная спектроскопия).

Также возможно проведение других видов анализа, исходя из специфики исследуемого лекарственного препарата. Произведенные стандартные образцы должны соответствовать требованиям, сформулированным в Руководствах ISO (ISO Guides 30, 31, 32, 33, 34) [22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31]:

- ISO Guide 30:1992 – Термины и определения, употребляемые в связи со стандартными образцами (Terms and definitions used in connection with reference materials);
- ISO Guide 31:2000 – Содержание сертификатов и этикеток (Reference materials – Contents of certificates and labels);
- ISO Guide 32:1997 – Калибровка в аналитической химии и использование сертифицированных стандартных образцов (Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials);
- ISO Guide 33:2000 – Применение сертифицированных стандартных образцов (Use of certified reference materials);
- ISO Guide 34:2009 – Общие требования, касающиеся компетенции производителей стандартных образцов (General requirements for the competence of reference material producers);
- ISO Guide 35:2006 – Правила сертификации стандартных образцов (Reference materials – General and statistic principles for certification).

Пользователь стандартных образцов должен обладать полной информацией о свойствах, способах характеристики и их значениях. Такая информация содержится в документе, который сопровождает стандартный образец и называется «сертификат» или «сертификат анализа»; при этом стандартный образец может не являться сертифицированным даже при наличии данного сертификата [24, 26].

Основным документом, требованиям которого должны удовлетворять сертификаты стандартных образцов, является ISO Guide 33:2000 – Применение сертифицированных стандартных образцов (Use of certified reference materials). В соответствии с его требованиями, сертификат стандартного образца должен содержать следующую информацию [24, 26, 32, 33, 34, 35,38]:

- Наименование и адрес организации, сертифицирующий материал и ответственной за информацию, указанную на сертификате. Этот пункт должен содержать все доступные данные, включая электронную почту;
- Заглавие документа;
- Название материала, описывающее его тип настолько точно, насколько это возможно, и позволяющее отличить его от других материалов;
- Кодовый номер и обозначение партии материала;
- Описание материала с указанием всех данных, существенных для потребителя, таких как: состав, количественное содержание, агрегатное состояние, измельченность, вид упаковки;
- Назначение стандартного образца;
- Руководство по применению;
- Описание условий хранения;
- Информация о возможных угрозах;
- Сертификационные величины и их способы получения;
- Не сертифицируемые величины;
- Дата сертификации;
- Дата и срок годности материала;
- Имя, фамилия и подпись лица, ответственного за сертификацию.

Составление сертификата является сложной задачей; изучение действующих сертификатов показывает, что количество сертификатов, удовлетворяющих вышеуказанным требованиям, минимально. В связи с этим в руководстве содержится перечень минимальных требований относительно сертификата. Он должен содержать следующие пункты [24, 26, 28]:

- Название материала;
- Название производителя материала;
- Общее описание материала;
- Предполагаемое применение;

- Руководство по правильному применению;
- Руководство по правильному хранению;
- Сертификационные величины;
- Метод получения сертификационных величин;
- Дату и срок годности материала.

Сертификат — это не единственный источник информации, поставляемый вместе с сертифицированным стандартным образцом; таковым также являются этикетка стандартного образца и отчет по сертификации [24].

1.4. Характеристика объектов исследования — лекарственных средств пептидной структуры

Объектами исследования являются два препарата пептидной структуры, разработанные в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова». ГБ-115 — новый селективный анксиолитик по химической структуре представляющий собой амид N-[6-фенилгексаноил]глицил-L-триптофана (рис. 1) [39, 40, 41, 42, 43, 44, 45,46].

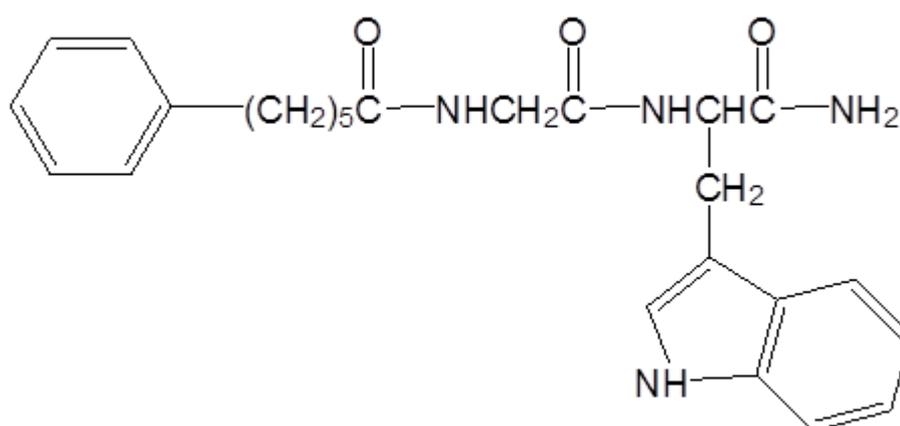


Рисунок 1. амид N-(6-фенилгексаноил)-глицил-L-триптофана (ГБ-115)

Доклинические исследования показали, что препарат оказывает избирательное анксиолитическое действие, при отсутствии миорелаксирующих эффектов, что является несомненным преимуществом по сравнению с бензодиазепиновыми транквилизаторами, также выявлена антидепрессивная активность [47, 48, 49, 50, 51]. Препарат не вызывает патологических изменений в органах и системах подопытных животных, не вызывает аллергических реакций не оказывает иммунотоксического действия, не влияет на способность экспериментальных животных к спариванию и оплодотворению, не влияет на постнатальное развитие потомства, не обладает мутагенными свойствами и не вызывает летальности у мышей и крыс при однократном введении внутрь в дозах до 6 г/кг и 3,5 г/кг соответственно [50, 51].

Описаны перспективы применения соединения ГБ-115 в клинической практике для устранения разнообразных проявлений наркотической зависимости [52]. Показано, что препарат безопасен при длительном применении, заметно усиливает анальгетический эффект морфина и тормозит развитие толерантности к нему [53].

Дилепт – атипичный нейролептик, по химической структуре представляющий собой метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина (рис.2) [54, 55, 56, 57].

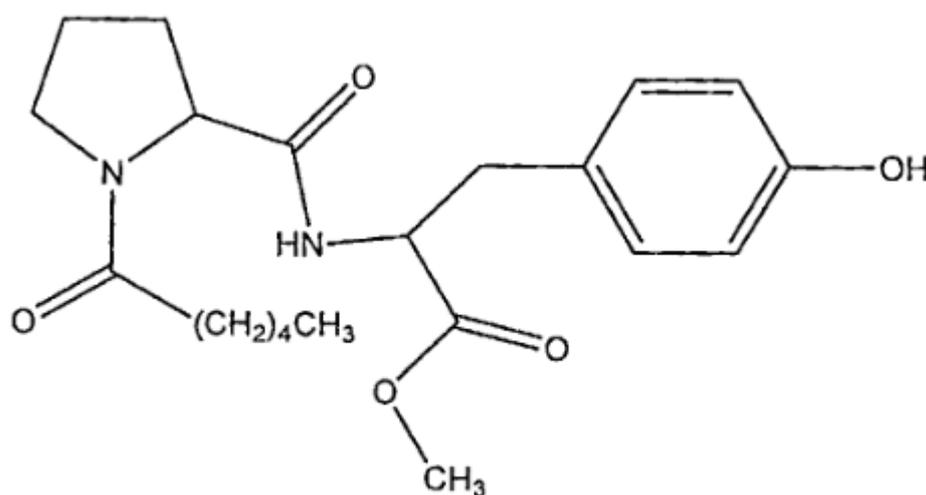


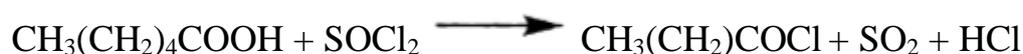
Рисунок 2. Метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина (Дилепт)

Исследования показали наличие у препарата наибольшей фармакологической активности как атипичный нейлолептик, в отличие от других пептидных препаратов, разработанных в ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова». Препарат не проявляет каталептогенного действия, седативного и миорелаксирующего действия, не вызывает аллергических реакций. Дилепт не вызывает экстрапирамидных расстройств, так же не является мутагеном и не оказывает повреждающего действия на органы и системы организма [55, 58, 59].

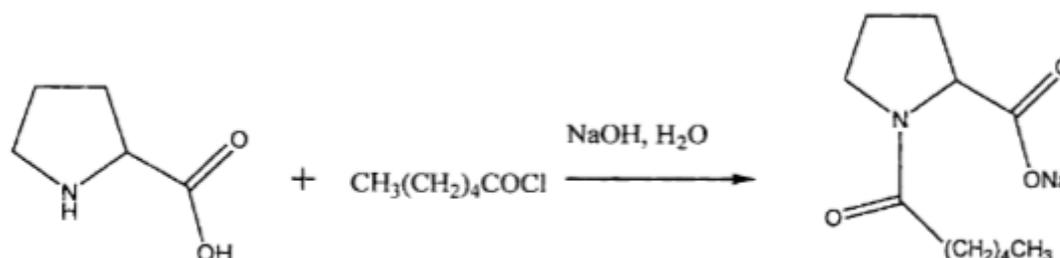
1.5. Синтез фармакопейных субстанций препаратов Дилепт и ГБ-115

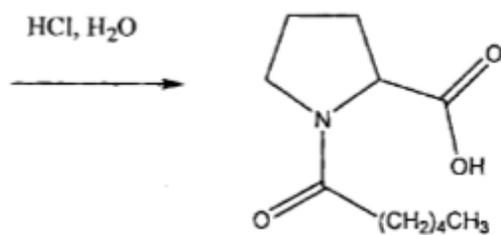
Техническую субстанцию Дилепта синтезируют путем взаимодействия N-капроил-L-пролина с изобутилхлорформиатом в среде диметилформаида в присутствии N-этилморфолина при температуре $-15/-10^{\circ}\text{C}$ с последующим взаимодействием с метиловым эфиром L-тирозина. Для получения фармакопейной субстанции Дилепта проводится кристаллизация из технической субстанции с помощью этилацетата. Кристаллизацию проводят при соблюдении следующих соотношений 1:3-3,5 с добавлением 5-10% активированного угля. Далее проводится сушка при температуре $50-60^{\circ}\text{C}$. Схема получения фармакопейной субстанции представлена ниже [55].

I – получение хлорангирида капроновой кислоты

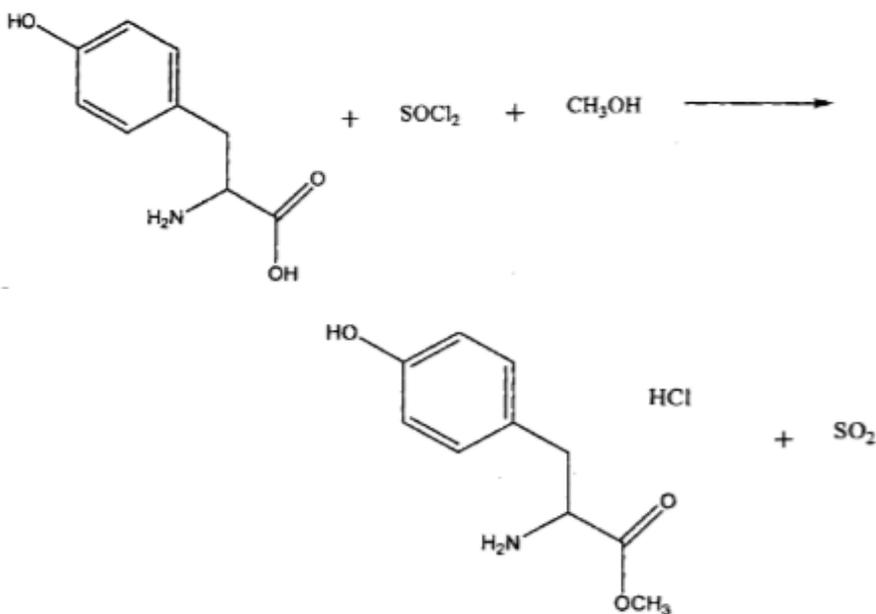


II – получение N-капроил-L-пролина

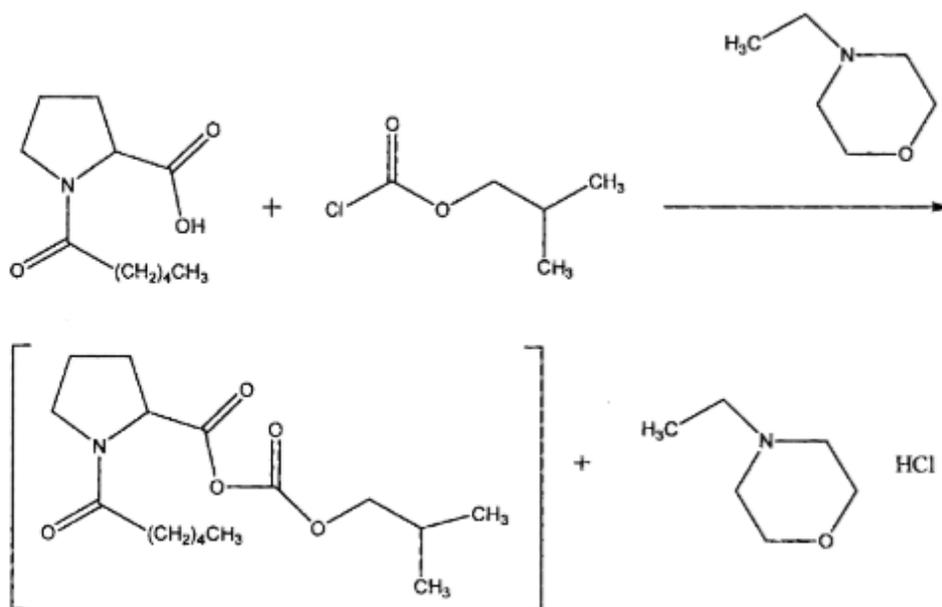




III – получение хлоргидрата метилового эфира L-тирозина

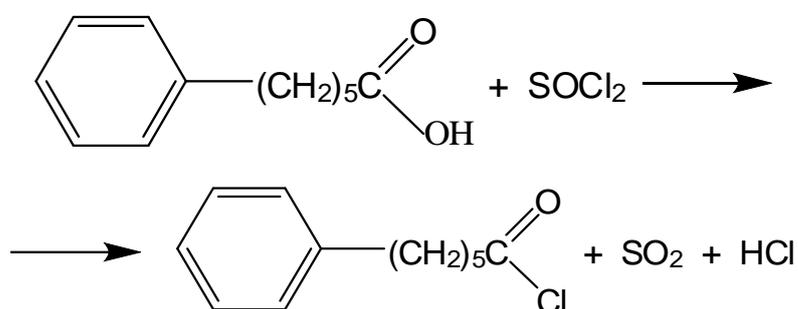


IV – получение метилового эфира N-капроил-L-пролин-L-тирозина

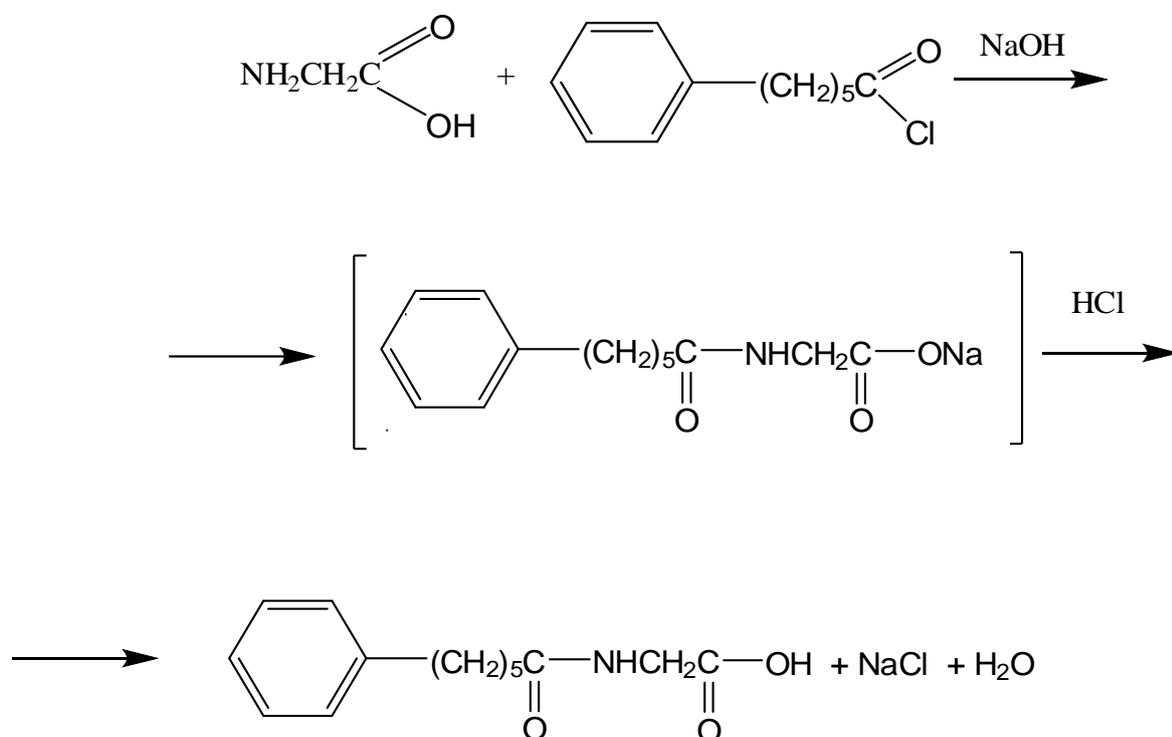


Синтез технической субстанции ГБ-115 осуществляется за счет взаимодействия 6-фенилгексановой кислоты с хлористым тионилем. Затем проводится стадия ацетилирования в щелочных условиях при 0°C. Получение этилового эфира путем этерификации с хлористым тионилем. Далее следует взаимодействие эфира дипептида с аммиаком в среде метанола. Фармакопейную субстанцию получают путем кристаллизации технической субстанции из спирта этилового. Схема синтеза представлена ниже [44, 61].

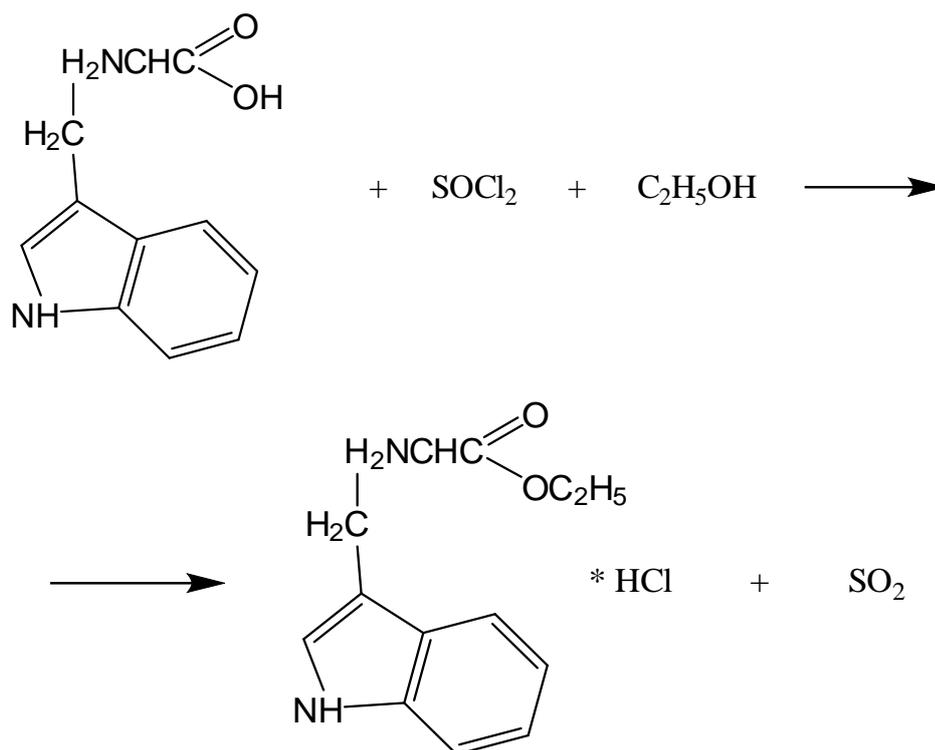
I - Получение хлорангирида 6-фенилгексановой кислоты.



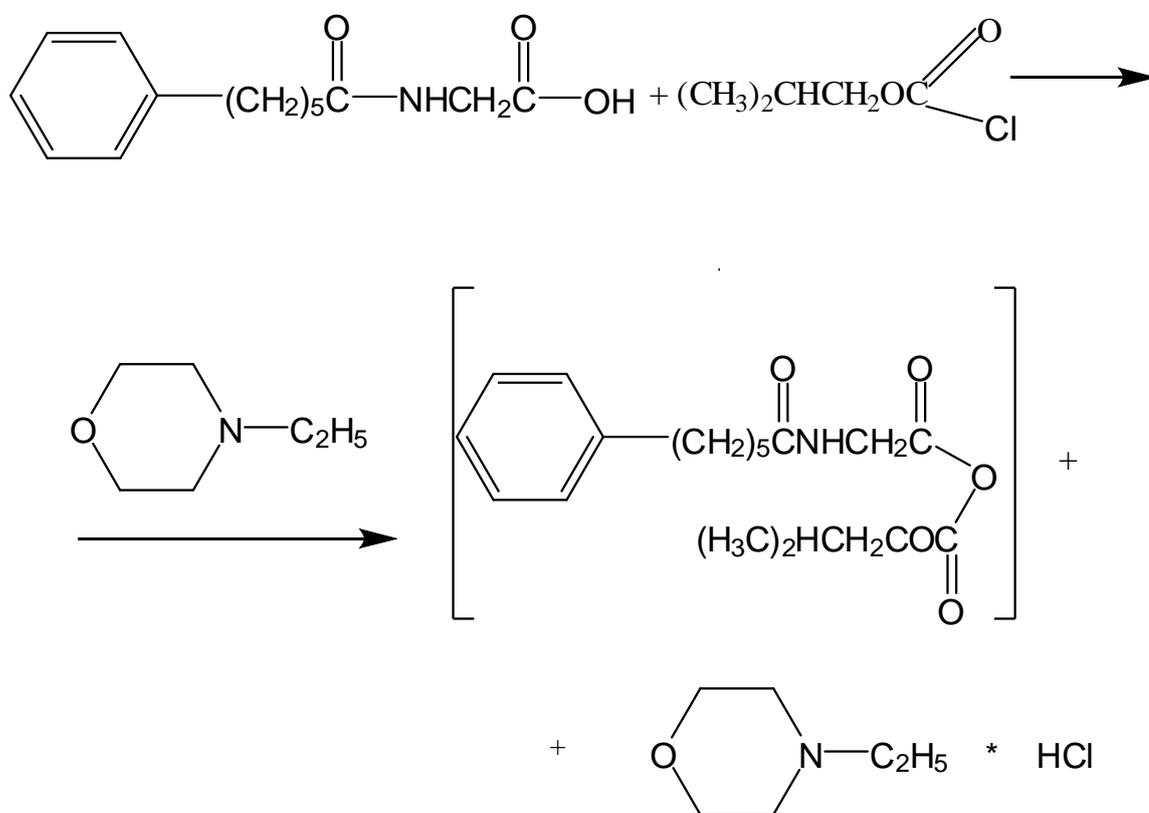
II - Получение N-(6-фенилгексаноил)глицина.

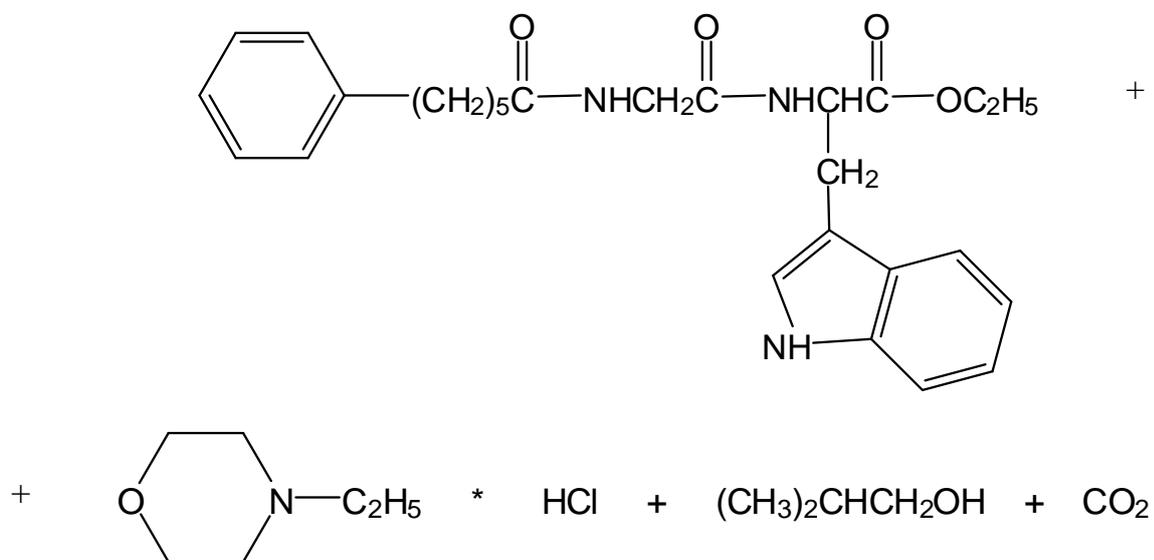
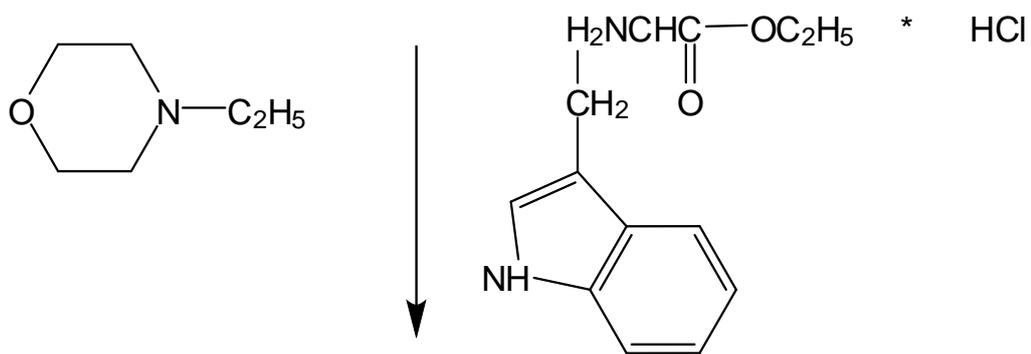


III - Получение хлоргидрата этилового эфира L-триптофана.

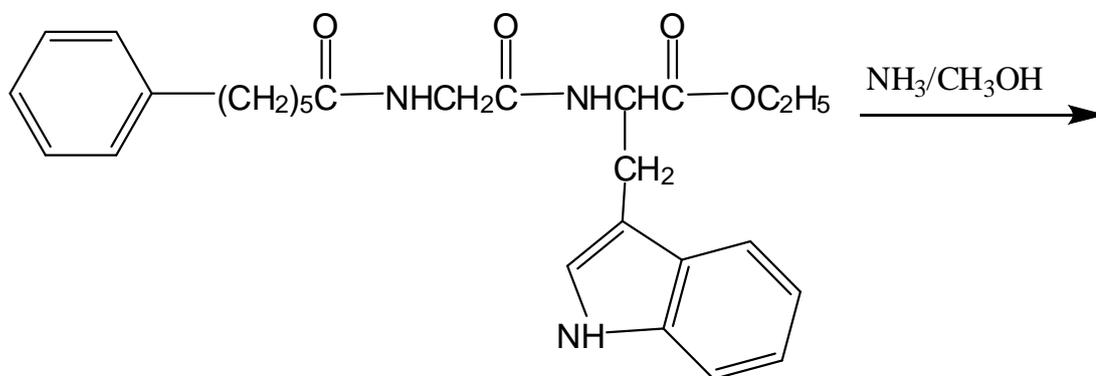


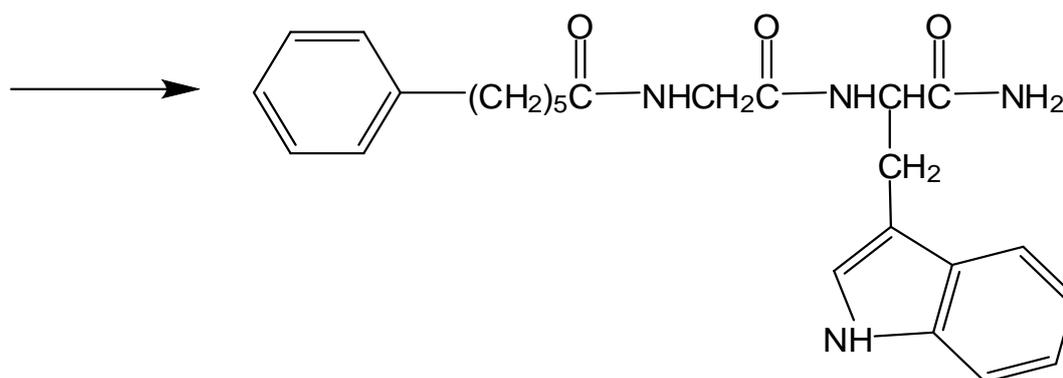
IV - Получение этилового эфира N-(6-фенилгексаноил)глицил-L-триптофана.





V - Получение амида N-(6-фенилгексаноил)глицил-L-триптофана.





амид N-(6-фенилгексаноил)-глицил-L-триптофана (ГБ-115)

Полученные фармакопейные субстанции подвергались перекристаллизации из органических растворителей для достижения необходимого уровня качества, характеризующего субстанции как стандартный образец: Дилепт из этилацетата, а ГБ-115 из спирта этилового.

1.6. Методы анализа соединений пептидной структуры

По химической структуре Дилепт и ГБ-115 представляют собой соединения пептидной структуры. Дилепт содержит в своей структуре остатки пролина и тирозина, а ГБ-115 содержит остатки глицина и триптофана [44, 55].

Для проведения качественного и количественного фармакопейного анализа соединений пептидной структуры применяются различные методы. Химические методы, такие как титрование и проведение качественных реакций, могут применяться для количественного и качественного определения [62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73].

Оптические методы, такие как УФ-спектрофотометрия, ИК-спектрометрия, ЯМР-, ПМР-спектроскопия, могут быть использованы для доказательства подлинности. ААС и АЭС могут быть использованы в анализе чистоты лекарственных препаратов пептидной структуры [60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73].

Хроматографические методы (ТСХ, ГЖХ) могут быть использованы в анализе чистоты, а метод ВЭЖХ может быть использован в качественном и количественном анализе при условии использования стандартных образцов лекарственных препаратов [64, 70, 73, 74, 75].

1.6.1. Химическая идентификация пептидных препаратов

Для проведения идентификации лекарственных препаратов пептидной структуры могут быть использованы химические реакции подлинности. По литературным данным, для идентификации пептидов проводят реакции образования солей и гидроксамовых кислот. Данная группа соединений обладает амфотерными свойствами, так как соединения обладают как кислотными, так и основными функциональными группами. Карбоксильная группа может реагировать с неорганическими основаниями, наиболее характерными будут продукты реакции с солями меди – образование темно-синего или сине-фиолетового раствора, или осадка [77, 78, 101].

Наличие в структуре ГБ-115 остатка триптофана позволяет провести реакцию с диэтилбензальдегидом в среде хлористоводородной кислоты при нагревании – образуется раствор пурпурно-голубого цвета.

Другим характерным свойством препаратов пептидной структуры является способность к гидролизу амидной связи – образование гидроксамовых кислот в кислой среде.

Обнаружение полученных гидроксамовых кислот проводят с помощью образования окрашенных внутрикомплексных солей с соединениями железа (III) и меди (II). Продукты реакции зависят от рН среды и количества используемых реагентов [76].

В ГФ X реакция образования гидроксамовых кислот рекомендована для анализа лекарственных препаратов группы пенициллина, новокаина и др., также, как и пептиды, являющихся амидами [80].

Описано определение с помощью гидроксамовой реакции препаратов пептидной структуры – Дилепта и ноопепта с образованием темно-вишневого окрашивания [55, 81, 82].

Так как вышеуказанные реакции не являются специфическими для группы препаратов пептидной структуры, они не могут быть достоверным подтверждением подлинности и использоваться для идентификации стандартных образцов.

1.6.2. Титриметрические методы анализа

Согласно отечественной и зарубежной нормативной документации одним из наиболее часто используемых методов количественного определения является титриметрический метод.

Для препаратов пептидной структуры может быть предложено несколько вариантов титриметрического количественного определения, а именно титрование в неводных средах и определение общего азота методом Кьельдаля [67, 70, 71, 72, 73, 80, 83, 84].

Препараты пептидной структуры являются слабыми основаниями, в связи с этим их растворяют в протогенных растворителях таких как муравьиная и безводная уксусная кислота, а также уксусный ангидрид. Титрантом является хлорная кислота [72].

Также для количественного анализа соединений, содержащих в своем составе атом азота, используется метод определения общего азота по Кьельдалю. Метод Кьельдаля включен в общие и частные статьи ведущих фармакопей мира.

Количественное определение стандартных образцов необходимо проводить независимым химическим способом без использования сличительных методов, таким образом титриметрические методы необходимы для включения в нормативную документацию по показателю «Количественное содержание» [40].

1.6.3. Спектральные методы анализа

Оптические методы анализа описаны и рекомендуются всеми ведущими фармакопеями мира. Для качественного и количественного анализа субстанций и лекарственных форм препаратов пептидной структуры широко применяются спектральные методы, однако в анализе стандартных образцов спектральные методы могут быть использованы только в анализе подлинности.

1.6.3.1. УФ-спектрофотометрия

Метод УФ-спектрофотометрии широко используется в анализе подлинности субстанций и лекарственных форм и описан в большинстве ведущих фармакопей мира. В контроле качества метод используется для веществ, имеющих сопряженные кратные связи. Метод УФ-спектрофотометрии является неспецифичным, однако необходим в контроле качества стандартных образцов как независимый дополнительный метод [34, 36, 37, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 71, 73].

Изучение УФ-спектров лекарственных препаратов обычно проводят в интервале длин волн 200-350 нм, используя в качестве растворителей вещества, не поглощающие в исследуемой области спектра и не вступающие в реакции с исследуемым веществом [85, 86, 87, 88, 89].

Соединения пептидной структуры имеют характерные полосы поглощения и определяются наличием в структуре двух хромофорных групп. Пептидная группа проявляет слабое поглощение, которое наблюдается при 200-220 нм, а основными хромофорами в соединениях пептидной структуры являются остатки ароматических аминокислот: триптофан (ГБ-115) и тирозин (Дилепт). Спектры фармакопейных субстанций были изучены ранее и характеризовались двумя максимума поглощения при 282 ± 2 нм и 290 ± 2 нм для ГБ-115 и максимумом поглощения при 278 ± 2 нм для Дилепта. [44, 55].

1.6.3.2. ИК-спектроскопия

Спектроскопия в инфракрасной (ИК) области спектра является распространенным методом качественного анализа, позволяющим провести идентификацию соединения, установить его структуру, провести анализ смесей, а также анализ чистоты. Широкий диапазон применения ИК-спектроскопии обусловлен высокой чувствительностью к колебанию функциональных групп, изменениям в структуре [90, 91, 92, 93, 94].

Пептидные препараты имеют две полосы поглощения «Амид I» и «Амид II». Находятся эти полосы в интервалах 1690-1630 и 1620-1590 см^{-1} соответственно. Первая полоса характеризуется наличием карбонильной группы в структуре препарата. Вторая амидная полоса проявляется в первичных и вторичных амидах. [95, 96, 97, 98, 99, 105]

В Японской и Британской фармакопеях одним из методов идентификации триптофана и ацетилтриптофана предложен метод ИК- спектроскопии [65, 73].

Необходимость получения ИК-спектра стандартного образца обусловлена использованием в последующем процессе идентификации, субстанций и лекарственных форм препарата путем сопоставления рисунков спектров [40]. Несмотря на получение ранее ИК-спектров фармакопейной субстанции, так как СО являются более чистыми соединениями, именно ИК-спектр СО необходимо использовать в дальнейшем контроле качества как фармакопейных субстанций, так и лекарственных форм исследуемых веществ. [43, 54]

1.6.3.3. ЯМР-спектроскопия

Метод ЯМР может быть использован для проведения качественного анализа, исследования или подтверждения структуры органических соединений, определения чистоты. Метод ЯМР-спектроскопии включен в монографии большинства ведущих фармакопей мира.

Получение спектров стандартных образцов необходимо для подтверждения их качества по показателям «Подлинность» и «Посторонние примеси». Метод ЯМР-спектроскопии должен применяться в совокупности с другими независимыми методами анализа.

В качестве растворителей должны использоваться соединения, которые не имеют собственных сигналов в исследуемой области и не взаимодействующие с растворенным веществом. Для подобных исследований наиболее часто используются дейтерированная вода, хлороформ, дейтерированный диметилсульфоксид [100, 101, 102, 103, 104, 106]. Фармакопейные субстанции, исследуемых препаратов были ранее изучены с помощью метода ПМР, однако для идентификации стандартных образцов исследуемых веществ необходимо использовать более селективный метод ЯМР C^{13} . [43,54]

1.6.4. Хроматографические методы анализа

В настоящее время в фармакопейном анализе применяются различные виды хроматографии, например, тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), газо-жидкостная хроматография (ГЖХ).

Ввиду низкой селективности и чувствительности метода ТСХ, данный метод не может применяться в контроле качества стандартных образцов препаратов пептидной структуры. В свою очередь на основе исследований, проведенных в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» были продемонстрированы преимущества метода ВЭЖХ в анализе субстанции лекарственных препаратов ГБ-115 и Дилепт по показателю «Посторонние примеси».

Метод ГЖХ используют в контроле качества стандартных образцов по показателю «Остаточные органические растворители». Это связано с тем, что в отличие от субстанций количественное содержание остаточных органических растворителей должно контролироваться отдельно от показателя «Вода» методом

К.Фишера, в таком случае определение потери в массе при высушивании не проводят.

1.6.4.1.Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

В настоящее время методики ВЭЖХ выполняются с применением следующих способов детектирования: ультрафиолетовые, флуориметрические, масс-спектрометрические. Для анализа препаратов пептидной структуры чаще используют обращенно-фазовую ВЭЖХ, где в качестве сорбентов наибольшее распространение получили обращенно-фазовые сорбенты с привитыми октильными (C_8) или октадецильными (C_{18}) радикалами. Используя данные виды сорбентов, получают высоко воспроизводимые результаты.

В качестве подвижной фазы в обращенно-фазовой ВЭЖХ могут использоваться как индивидуальные растворители, так и их смеси: смеси вода-ацетонитрил или вода-метанол в чистом виде или с добавлением солей фосфорной, серной или уксусной кислот.

Оптимизировать разделения соединений пептидной структуры и подобрать оптимальные условия хроматографирования можно, изменяя параметры хроматографической системы.

Основными критериями для оценки хроматографического разделения являются такие показатели, как число теоретических тарелок (N), фактор размывания зоны (T), коэффициент емкости (k'), коэффициент разделения (α), разрешение (R_s) [106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117]. Методика определения посторонних примесей в фармакопейных субстанциях Дилепта и ГБ-115 были разработаны и опубликованы ранее. [43, 54]

1.6.4.2. Газо-жидкостная хроматография

Метод ГЖХ обладает рядом достоинств, к которым можно отнести высокую чувствительность и селективность метода, высокую скорость

проведения анализа, возможность использовать различные типы детекторов (пламенно-ионизационный, азотный или фосфорный детектор, детектор захвата электронов и масс-спектрометр).

Препараты пептидной структуры – высокополярные соединения с низкой летучестью, что требует проведения дериватизации для увеличения летучести данных соединений. Сложные процессы дериватизации, необходимые для анализа пептидных препаратов, исключают этот метод в качестве рутинного. Однако метод ГЖХ является наиболее подходящим для анализа остаточных органических растворителей в стандартных образцах [61, 88, 106]. Для фармакопейных субстанций исследуемых препаратов были разработаны методики определения остаточных органических растворителей, однако в НД они не вошли. [43,54] Кроме того в процессе дальнейших исследований, была показана необходимость разработки новых и более чувствительных методов контроля качества стандартных образцов.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

2.1. Объекты исследования

Объектами исследований являлись 3 образца субстанции ГБ-115, промежуточные продукты его синтеза – фенилгексаноилглицин, L-триптофана хлорогидрат, фенилгексановая кислота – исходный продукт синтеза.

Также материалами исследований являлись 3 образца субстанции Дилепта, исходные продукты синтеза метиловый эфир L-тирозина и N-капроил-L-пролин, а также продукт гидролиза полученного препарата – N-капроил-L-пролил-L-тирозин.

Синтез субстанций ГБ-115 и Дилепта осуществлен в отделе химии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова» (руководитель отдела – доктор биологических наук, профессор, член - корреспондент РАМН - Т.А. Гудашева).

Очистка субстанций производилась в группе технологии синтеза лекарственных средств химико-технологической лаборатории опытно-технологического отдела ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова» (руководитель группы – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник - Авдюнина Н.И.).

Исходные и промежуточные продукты синтеза ГБ-115 были предоставлены отделом химии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова» (руководитель отдела – доктор биологических наук, профессор, член - корреспондент РАМН - Т.А. Гудашева).

2.2.Используемое оборудование

Оценку физико-химических свойств ГБ-115 и Дилепта, разработку и воспроизведение методик анализа и научно-обоснованных норм качества стандартных образцов проводили в аналитической группе химико-технологической лаборатории опытно-технологического отдела (руководитель аналитической группы – д. фарм. н. Л.Н.Грушевская) и в Испытательной лаборатории экспертизы качества лекарственных средств Научно-

исследовательского института Фармации ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (заведующая лабораторией – Санникова Елена Юрьевна).

Для изучения спектральных характеристик субстанции использовали УФ-спектрофотометр UV-1700 (“Shimadzu”, Япония), ИК-спектрометр Bruker Vertex 70 (Германия), Bruker AM300 (300.13 МГц для ¹H и 75.47 МГц для ¹³C).

Определение угла вращения проводили на автоматическом поляриметре ADP 410 (Bellingham + Stanley, Великобритания).

Температуру плавления определяли на приборе Buchi Melting Point B-540.

Определение воды по методу Карла Фишера проводили на приборе Mettler Toledo DL 32.

Для определения pH растворов pH-метр Mettler Toledo Seven Compact S230.

Хроматографический анализ методом ВЭЖХ проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1200 Series с колонкой Luna C18(2) 100 A, LC Column 250 x 4.6 mm, Ea. 3 мкм).

Хроматографический анализ методом газовой хроматографии проводили на хроматографе с пламенно-ионизационным детектором Газовый хроматограф Carlo Erba 6000 Vega Series 2 GC (фирмы «Carlo Erba Strumentazione», Италия Колонка: Капиллярная колонка DB-624 длиной 60 м, внутренним диаметром 0,53 мм и фазой, состоящей из 6% -цианпропилфенила и 94%-диметилполисилоксана (толщина пленки 3 мкм).).

Изучение таких показателей как: внешний вид, растворимость, прозрачность, цветность и pH водных растворов, потеря в массе при высушивании, температура плавления проводили в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи XIII издания.

Количественное определение ГБ-115 в субстанции методом определения общего азота по Кьельдалю проводили также в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи XIII.

Статистическую обработку осуществляли в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи XIII.

2.3. Используемые реактивы

Для определения растворимости исследуемого соединения были использованы следующие растворители: вода очищенная, спирт этиловый 95%, ацетон (хч), диэтиловый эфир (чда), этилацетат (чда), диоксан (чда), гексан (хч), хлороформ (хч), толуол (чда).

Для хроматографического анализа методом ВЭЖХ были использованы следующие химические вещества и растворители: вода очищенная, ацетонитрил (для ВЭЖХ, для градиентной хроматографии (Biosolve) или «сорт 0» и «сорт 1» (Криохром)), фосфорная кислота (орто) (хч), калия дигидрофосфат ($\geq 99,0\%$ (Sigma) или чда).

Для количественного определения методом Кьельдаля применяли кислоту серную (хч), селен (99+, Merck), калия сульфат (хч), меди сульфат пятиводный (чда), калия гидроксид (хч), кислоту борную (хч), кислоту хлористоводородную (хч), метиловый красный (чда), метиленовый синий (чда).

2.4. Используемые ранее разработанные методики

В ходе исследования использовались ранее разработанные и опубликованные методики определения посторонних примесей и количественно содержания [43, 54].

2.4.1. Методики определения посторонних примесей методом ВЭЖХ

Методика определения посторонних примесей для фармакопейной субстанции Дилепта:

Около 0,01 г (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в достаточном объеме подвижной фазы, доводят объем раствора подвижной фазы до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

20 мкл (2 мкг) испытуемого раствора хроматографируют в следующих условиях: C_{18} 5 мкм, длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм с предколонкой C_{18} 5 мкм, длиной 30 мм и внутренним диаметром 4,6 мм или аналогичная; подвижная фаза – ацетонитрил-вода-ледяная уксусная кислота (500:500:1), скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин, длина волны детектирования 205 нм, температура колонки комнатная.

Перед проведением испытания колонку промывают подвижной фазой до установления стабильной базовой линии.

Методика определения посторонних примесей для фармакопейной субстанции ГБ-115:

Около 0,025 г (точная навеска) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в достаточном объеме подвижной фазы, доводят объем раствора подвижной фазой до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

По 20 мкл (2 мкг) испытуемого раствора, раствора Б и раствора ППХС хроматографируют в следующих условиях: стальная колонка длиной 250 мм и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная сорбентом C_{18} с размером частиц 5 мкм (Luna $C_{18}(2)$, 5 мкм (Phenomenex) или аналогичная), подвижная фаза – ацетонитрил – вода, подкисленная до pH 3,15 фосфорной кислотой, (400 - 450), режим элюирования изократический, температура колонки комнатная, скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин, длина волны детектирования – 215 нм.

Перед проведением испытания колонку промывают подвижной фазой до установления стабильной базовой линии.

Использованные методики были ранее валидированы [43, 54].

2.4.2. Методики определения количественного содержания

В ходе наших исследований использовались методики количественного определения, разработанные ранее [43, 54].

Для количественного анализа стандартного образца Дилепта использовали следующую методику: около 0,2 г Дилепта (точная навеска) минерализуют нагреванием с 7 мл серной кислоты в присутствии катализатора селена в количестве 0,05 г и 1 г растертой смеси калия сульфата и меди сульфата (в соотношении 10:1) до получения светло-зеленого раствора. Время минерализации около 45 минут. Затем в реакционную среду добавляют избыток (40 мл) 30% раствора натрия гидроксида, и выделившийся аммиак отгоняют в приемник с борной кислотой и смешанным индикатором. Собирают 100 мл отгона, затем титруют его стандартным раствором (0,1 моль/л) кислоты хлористоводородной до перехода окраски индикатора от зеленой до красно-фиолетовой. Параллельно проводят контрольный опыт.

Методика проведения определения содержания в стандартном образце ГБ-115: анализ, проводят в несколько стадий в приборе для определения азота. Около 0,1 г ГБ-115 (точная навеска) в колбе Къельдаля минерализуют нагреванием с 7 мл серной кислоты в присутствии смеси катализаторов: 0,075 г металлического селена и 1,2 г растертой смеси калия сульфата и меди сульфата (в соотношении 10:1) до получения светло-зеленого раствора. Время минерализации около 3 часов.

Затем колбу подсоединяют к прибору для перегонки и медленно, по каплям, прибавляют избыток (40 мл) 30% щелочи. Выделившийся аммиак отгоняют в приемник с 20 мл 4% раствора борной кислоты и 5 каплями смешанного индикатора. Собирают 100 мл отгона, затем титруют его 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до перехода окраски индикатора из зеленой в красно-фиолетовую. Параллельно проводят контрольный опыт.

ГЛАВА 3. Изучение физико-химических свойств и разработка методик анализа стандартного образца Дилепта.

3.1 Разработка методик анализа стандартного образца Дилепта.

В процессе проведенного исследования физико-химических свойств субстанции Дилепта, предназначенные для создания стандартного образца, были изучены три серии субстанции по следующим показателям: внешний вид, растворимость в различных растворителях, прозрачность и цветность полученных растворов, температура плавления, удельное вращение, а также вода, сульфатная зола и тяжелые металлы. По полученным результатам были установлены нормы контроля качества стандартных образцов.

3.1.1. Внешний вид стандартного образца Дилепта

По внешнему виду все образцы субстанции Дилепта, предназначенные для создания стандартного образца, представляли собой белый кристаллический порошок. Оценку проводили визуально, согласно методики ГФ XIII, Том 1 стр. 179. По результатам определения была установлена норма для стандартного образца по показателю «Описание» - белый кристаллический порошок.

3.1.2. Растворимость стандартного образца Дилепта

Определение растворимости проводили по методике ГФ XIII, Том 1, стр. 531.

Растворимость определяли в следующих растворителях: вода, гексан, толуол, хлороформ, этанол (95%), этилацетат, диоксан, ацетон. Все изученные серии субстанции Дилепта, предназначенные для создания стандартного образца, практически нерастворимы в воде, гексане и толуоле, умеренно растворимы в этилацетате, легко растворимы в спирте и хлороформе; растворимы в ацетоне и диоксане.

Результаты анализа представлены в таблице 1.

Растворимость стандартных образцов Дилепта в различных растворителях

| № серии | I | II | III |
|---------------------|-------------------|-----------|------------|
| Растворитель | | | |
| Вода | Менее чем 1:10000 | | |
| Гексан | Менее чем 1:10000 | | |
| Толуол | Менее чем 1:10000 | | |
| Этанол (95%) | 1:10 | 1:10 | 1:10 |
| Этилацетат | 1:60 | 1:55 | 1:60 |
| Диоксан | 1:20 | 1:25 | 1:20 |
| Ацетон | 1:15 | 1:15 | 1:15 |
| Хлороформ | 1:5 | 1:5 | 1:5 |

При контроле качества стандартного образца Дилепта предложено определять растворимость стандартного образца в воде (практически нерастворим), этилацетате (умеренно растворим), ацетоне (растворим) и этаноле (легко растворим). Данные нормы совпадают с НД для фармакопейной субстанции, так как увеличенная степень чистоты стандартного образца не может изменять показатель «Растворимость».

3.1.3. Прозрачность и цветность растворов стандартного образца Дилепта

Как было изучено ранее, серии субстанции Дилепта практически нерастворимы в воде, для оценки этих показателей качества, из полученного образца были приготовлены 0,5% растворы в этиловом спирте (0,05 г в 10 мл 95% этанола).

Прозрачность и степень мутности полученных растворов определяли по методике ГФ XIII, Том 1, стр. 542, а цветность полученных растворов определяли согласно методике ГФ XIII, Том 1, стр. 535.

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что по показателю «Прозрачность» все растворы стандартного образца Дилепта в этиловом спирте 95% являются прозрачными или по мутности не превышают эталон I, а по показателю «Цветность» - бесцветные. В ходе наших исследований не наблюдалось изменений этих показателей, что может свидетельствовать о постоянстве состава стандартного образца.

Таблица 2

Результаты определения прозрачности и цветности 0,5% растворов стандартных образцов Дилепта в этиловом спирте 95%

| № серии | I | II | III |
|--------------|------------|------------|------------|
| Показатель | | | |
| Прозрачность | Прозрачный | Прозрачный | Прозрачный |
| Цветность | Бесцветный | Бесцветный | Бесцветный |

Таким образом нами установлены нормы по показателям «Прозрачность» и «Цветность» спиртовых растворов стандартного образца. 0,5% спиртовые растворы стандартного образца должны быть прозрачными и бесцветными.

3.1.4. Определение температуры плавления стандартного образца Дилепта

Определение температуры плавления проводили со скоростью подъема температуры 0,5-1 °С в минуту по методике ГФ XIII, Том 1 стр. 560. Предварительно высушенные образцы препарата плавилась в интервале 119– 125° С. Каждый отдельный образец субстанции Дилепта плавился в пределах 1-2° С четко, без видимого разложения. Результаты представлены в таблице № 3. Для проведения контроля качества стандартных образцов препарата были установлены нормы по показателю «Температура плавления», а именно от 121 до 123 С⁰. Результаты исследования показывают, что субстанция, предназначенная

для создания стандартного образца, более очищенная – пределы по данному показателю могут быть сужены в отличие от НД для фармакопейной субстанции.

3.1.5. Определение удельного вращения растворов стандартного образца Дилепта

Изучение фармакопейной субстанции, позволило предположить наличие у этого вещества двух асимметрических атомов углерода, что в свою очередь обуславливает наличие оптической активности. [43] В связи с этим целесообразно определять удельное вращение растворов стандартных образцов препарата. Рассчитывали удельное вращение для 2% раствора Дилепта в этаноле (95%) по методике ГФ XIII, Том 1, стр. 605. Значение удельного вращения растворов Дилепта находится в интервале от -49 до -51^0 и, следовательно, должны быть включены в нормативную документацию на полученный стандартный образец. Изменение угла вращения растворов стандартного образца свидетельствует о ненадлежащем качестве и невозможности использования СО по назначению. Полученные результаты определения удельного вращения представлены в таблице № 3.

3.1.6. Определение содержания воды в стандартном образце Дилепта

Определение воды в стандартных образцах Дилепта проводили согласно методике ГФ XIII, Том 1, стр. 719. Содержание воды определяли методом К.Фишера. Результаты представлены в таблице № 3. Включение данного показателя в НД на разрабатываемый стандартный образец необходимо, следуя современным требованиям ведущих фармакопей, таких как ГФ РФ, Американская и Европейская Фармакопеи.

Таблица 3

Результаты определения температуры плавления, удельного вращения и содержания воды для стандартных образцов Дилепта

| № серии | I | II | III |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Показатель | | | |
| Температура плавления | 121,0-123,0 | 121,5-122,5 | 121,0-123,0 |
| Вода | 0,15% | 0,12% | 0,13% |
| Удельное вращение | -49,6 ⁰ | -50,8 ⁰ | -49,2 ⁰ |

3.1.7. Определение сульфатной золы стандартных образцов Дилепта

Определение показателя «Сульфатная зола» проводили согласно методике ГФ XIII, том 1, стр. 714. Полученные результаты представлены в таблице № 4. Оценивая полученные результаты, был сделан вывод о необходимости включения в ФС на разрабатываемый стандартный образец нормы не более 0,1 %, также как и для фармакопейной субстанции.

3.1.8. Определение тяжелых металлов в стандартных образцах Дилепта

Определение показателя «Тяжелые металлы» проводили согласно методике ГФ XIII, том 1, стр. 708. Полученные результаты представлены в таблице № 4. Оценивая полученные результаты, был сделан вывод о необходимости включения в ФС на разрабатываемый стандартный образец нормы не более 0,001 %, также как и для фармакопейной субстанции.

Результаты определения сульфатной золы и тяжелых металлов в стандартных образцах Дилепта

| № серии | I | II | III |
|----------------------------|--------|-------|-------|
| Содержание сульфатной золы | 0,059 | 0,071 | 0,089 |
| Тяжелые металлы | 0,0009 | 0,001 | 0,001 |

3.2. Изучение спектральных характеристик стандартного образца Дилепта

3.2.1. УФ-спектрофотометрия в анализе стандартного образца Дилепта

Изучив литературные данные, а также ранее проведенные исследования [43], посвященные анализу субстанции Дилепта, нами выбрана методика УФ-спектрофотометрии, как одного из методов определения подлинности стандартных образцов. Наличие остатка тирозина в структуре Дилепта, обуславливает избирательное поглощение УФ-света, являясь хромофором.

Так как для анализа стандартных образцов, в отличие от анализа фармакопейной субстанции необходимо введение дополнительных параметров оценки подлинности нами были предприняты попытки установления новых норм, а именно минимумов поглощения. Для проверки спектральных свойств, готовили 0,01 и 0,001 % спиртовые растворы стандартных образцов Дилепта. Спирт этиловый в качестве растворителя был выбран в связи с особенностями растворимости препарата. Спектры снимали в интервале от 200 до 350 нм. Полученные спектры имеют четкие максимумы и минимумы поглощения. На рис.3 и рис.4 представлены типичные спектры стандартных образцов Дилепта в этаноле.

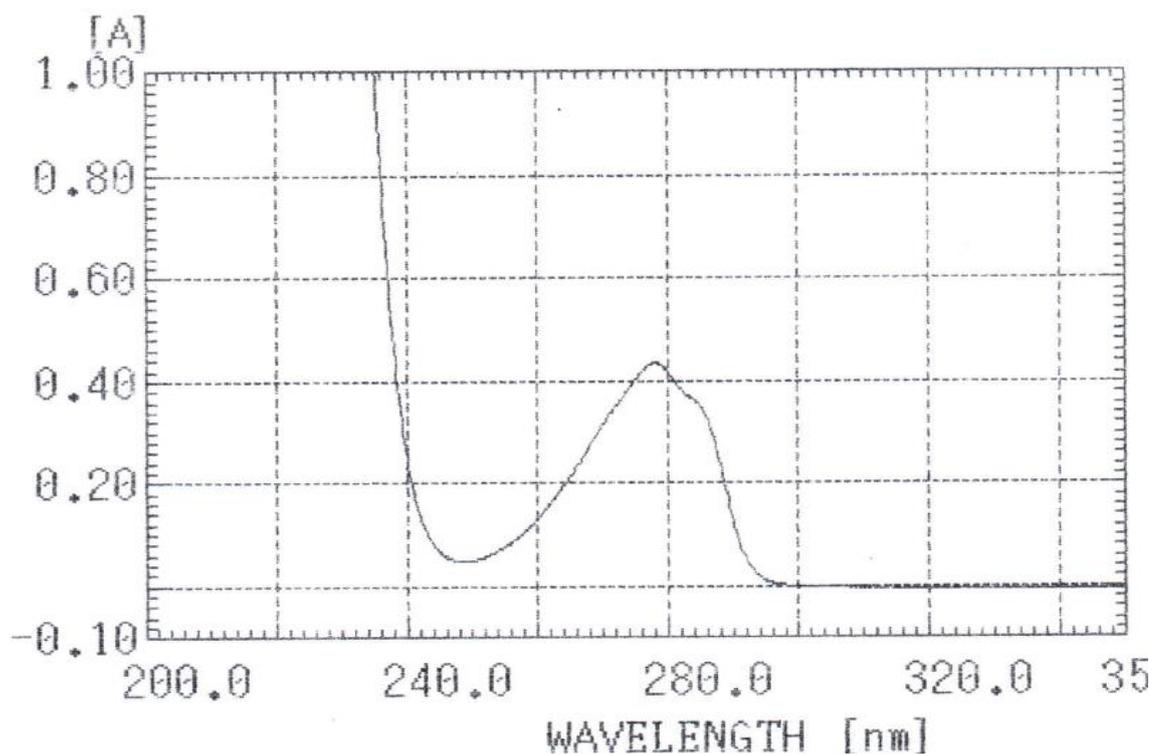


Рисунок 3. Типичный УФ-спектр 0,01 % раствора Дилепта в этаноле.

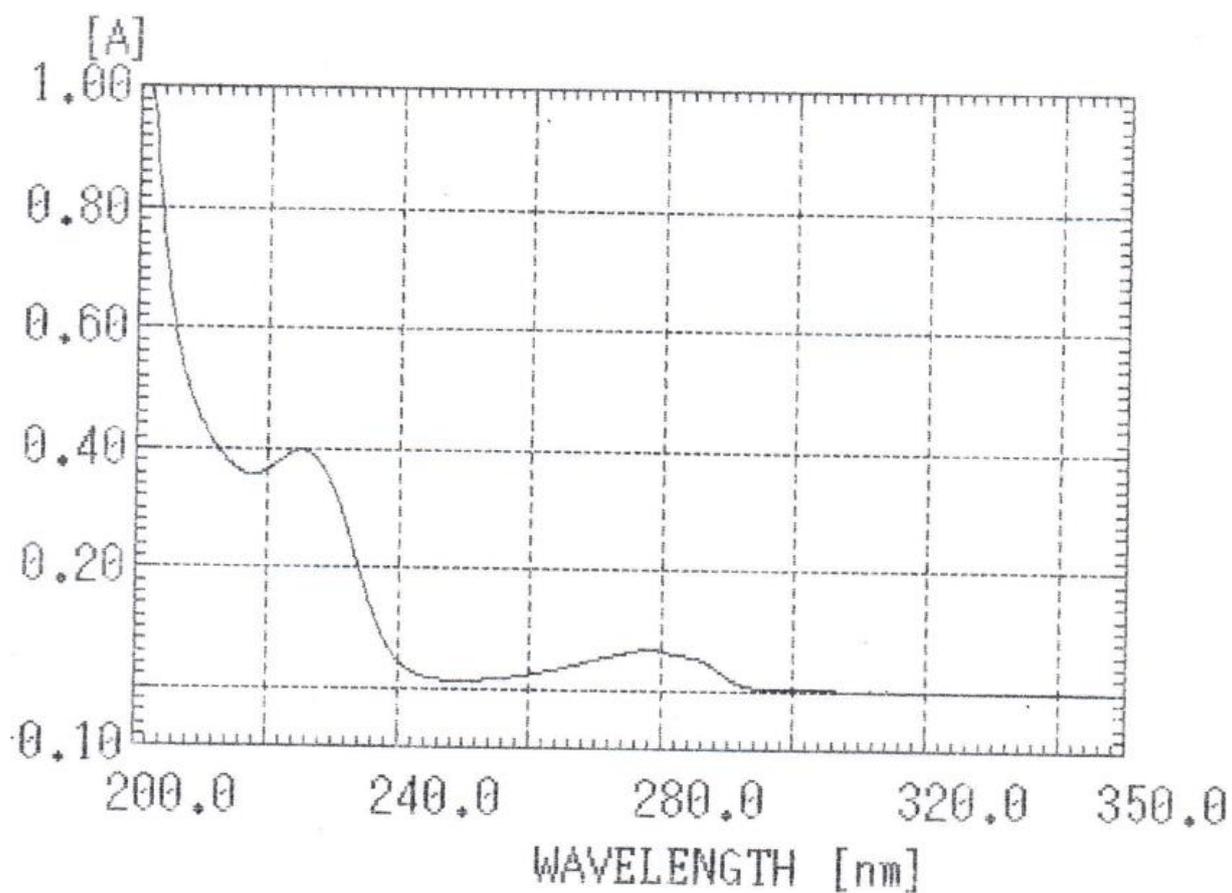


Рисунок 4. Типичный УФ-спектр 0,001 % раствора Дилепта в этаноле.

Нами подтверждено, что полученные спектры 0,01% растворов Дилепта в этаноле имеют характерный максимум поглощения длине волны около 278 нм, в свою очередь полученные спектры 0,001 % растворов Дилепта имеют максимумы поглощения при длинах волн около 225 нм, 207 нм и 278 нм. А также были установлены характерные минимумы при следующих длинах волн – 249 нм и 218 нм.

В таблице № 5 представлены основные спектральные характеристики полученных спектров поглощения.

Таблица 5

Основные спектральные характеристики растворов стандартного образца Дилепта в этаноле (95%)

| Длина волны, нм | Оптическая плотность | Молярный коэффициент поглощения | Концентрация растворов |
|-----------------|----------------------|---------------------------------|------------------------|
| Максимумы | | | |
| 207±0,2 | 0,430 | 15902 | 0,01% |
| 225±0,2 | 0,309 | 11427 | |
| 278±0,2 | 0,435 | 16390 | 0,001% |
| Минимумы | | | |
| 218±0,2 | 0,270 | 10173 | 0,01% |
| 249±0,2 | 0,050 | 1883 | |

Наличие в УФ-спектрах характерных максимумов и минимумов поглощения, а также относительно высокие значения молярных показателей поглощения позволяют использовать метод УФ-спектрофотометрии для определения подлинности стандартных образцов, а также демонстрирует

необходимость включения данного метода в нормативную документацию на полученные стандартные образцы. Полученные УФ-спектры 0,01% и 0,001% спиртовых растворов стандартных образцов должны совпадать с УФ-спектрами, представленными в нормативной документации, должны также определяться максимумы и минимумы поглощения и рассчитываться молярные показатели поглощения.

3.2.2. ИК-спектрометрия в анализе стандартного образца Дилепта

Спектры исследуемых образцов снимали на ИК-спектрометре Bruker Vertex 70 (Германия), программное обеспечение OPUS 5.5. Подготовку проб осуществляли методом прессования анализируемого стандартного образца с инертным наполнителем (калия бромидом).

Полученный типичный ИК-спектр стандартного образца Дилепта представлен на рис.5. Представленный ИК-спектр имеет характеристические полосы поглощения, представленные в таблице № 6.

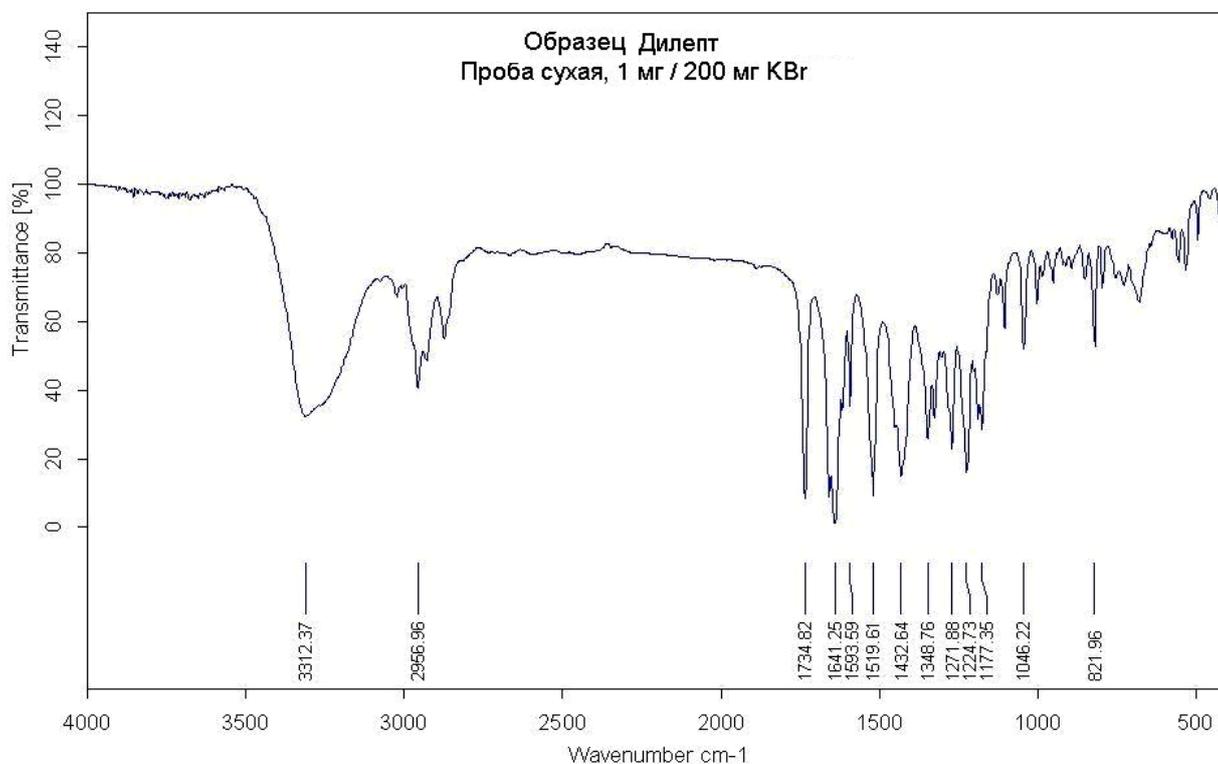


Рисунок 5. Типичный ИК-спектр стандартного образца Дилепта.

Характеристические полосы поглощения ИК-спектра стандартного образца
Дилепта

| Диапазон, см ⁻¹ | Спектральная информация |
|----------------------------|--|
| 3310 | ОН-группы, NH-группы |
| 1735 | -COOCH ₃ |
| 1660,1640,1594 | -CONH, >N-C=O |
| 1519,1432 | Деформационные колебания С=C связей тирозина |
| 822 | Замещение в кольце |

По положению и интенсивности полос поглощения ИК-спектры всех серий стандартных образцов были практически идентичны, поэтому метод ИК-спектрометрии включён в нормативную документацию в раздел «Подлинность» на полученные стандартные образцы. ИК-спектр стандартных образцов должен полностью совпадать с предложенным ИК-спектром в фармакопейной статье. Типичный ИК-спектр стандартного образца Дилепта представлен на рис.5.

3.2.3. ЯМР-спектроскопия в анализе стандартного образца Дилепта

Спектры ЯМР регистрировали на приборе Bruker AM300 (300.13 МГц для ¹H и 75.47 МГц для ¹³C) в ДМСО-d₆ (Acros, Бельгия). В ходе теоретических расчетов, обработки и интерпретации спектров использовали компьютерное программное обеспечение ACD Labs [ACD Labs 10 (сборка 18036, версия 17.01.2008)].

Подготовка образцов для регистрации спектров ЯМР ¹H и ¹³C:

Навеску исследуемого стандартного образца Дилепта массой 50 мг растворяли в 0,6 мл ДМСО-d₆ и помещали в стеклянную ампулу для ЯМР-спектроскопии.

При регистрации спектров ЯМР использовали стандартную одноимпульсную последовательность с последующим Фурье-преобразованием (в случае спектров ^{13}C дополнительно использовали широкополосную протонную развязку). Химические сдвиги ЯМР-сигналов определяли относительно тетраметилсилана. Отнесение сигналов производили на основании теоретических расчетов и литературных данных с учетом интенсивности сигналов и спин-спиновых взаимодействий.

На следующем этапе исследований для Дилепта в соответствии с расчетными данными (рис. 6 а) и имеющимися литературными описаниями провели сопоставление сигналов по химическим сдвигам и форме с соответствующими пронумерованными участками молекул (рис. 7). После этого на спектрах ЯМР ^1H , полученных для 3-х серий стандартного образца (рис. 6 б) найдены аналогичные сигналы. Спектры трех серий стандартного образца практически идентичны (форма сигналов была постоянна, а колебания значений химических сдвигов не превышало 0.1 – 0.2 м.д.), при этом посторонние сигналы (кроме соответствующих синглетных сигналов диметилсульфоксида и воды при 2.52 и 3.35 м.д.) отсутствуют, что дополнительно свидетельствует об индивидуальности и чистоте полученных стандартных образцов.

Дилепт (рис. 7) представляет собой метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина. Субстанция, предназначенная для создания стандартного образца, состоит из 2-х конформеров [4], что приводит к расщеплению спектральных полос в соотношении $\sim 1:1$ (рис. 6, б). Метиленовый фрагмент 1 резонирует в виде мультиплетного сигнала в интервале 3.25 – 3.53 м.д., а циклические CH_2 -2 и CH_2 -3 группы сливаются в трудночитаемый мультиплет с ациклическими CH_2 -звеньями 7 – 10 в области 1.02 – 2.35 м.д. Расщепленный дублетный сигнал при 4.26, 4.35 м.д. отвечает группе CH -4 и накладывается на триплет расщепленного сигнала группы CH -13 тирозинового компонента при 4.36, 4.45 м.д. Метильная группа 11 резонирует двумя триплетами при 0.83, 0.88 м.д., а NH -12 – двумя дублетами при 8.09, 8.41 м.д. Мультиплет в диапазоне 2.75 – 3.06 м.д. отвечает CH_2 -фрагменту

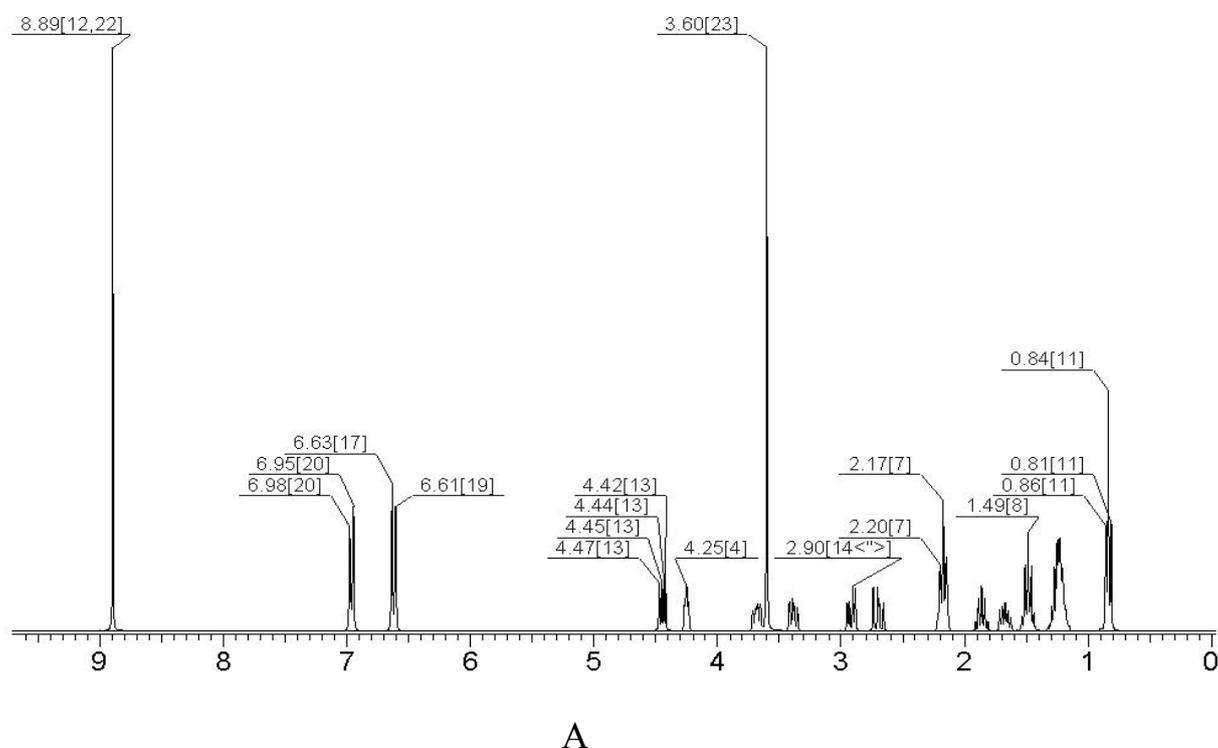
14. Расщепленные и частично накладывающиеся друг на друга мультиплетные сдвиги при 6.98, 7.00 м.д. отвечают ароматическим протонам 16 и 20, а при 6.64, 6.67 м.д. – СН-протонам 17 и 19. Сигналы ОН-группы 22 и ОСН₃-группы 23 дают расщепленные синглеты при 9.21, 9.24 м.д. и 3.58, 3.64 м.д. соответственно.

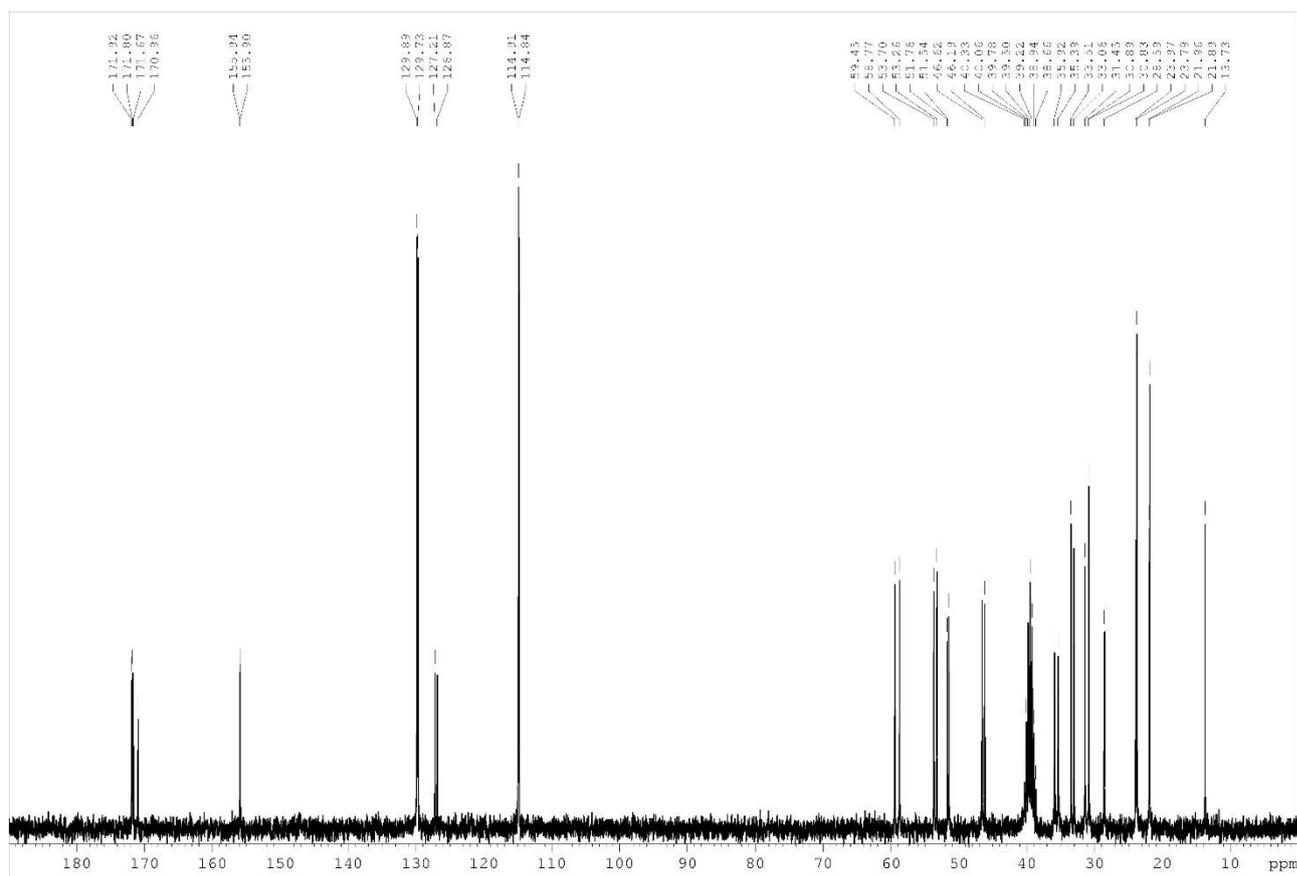
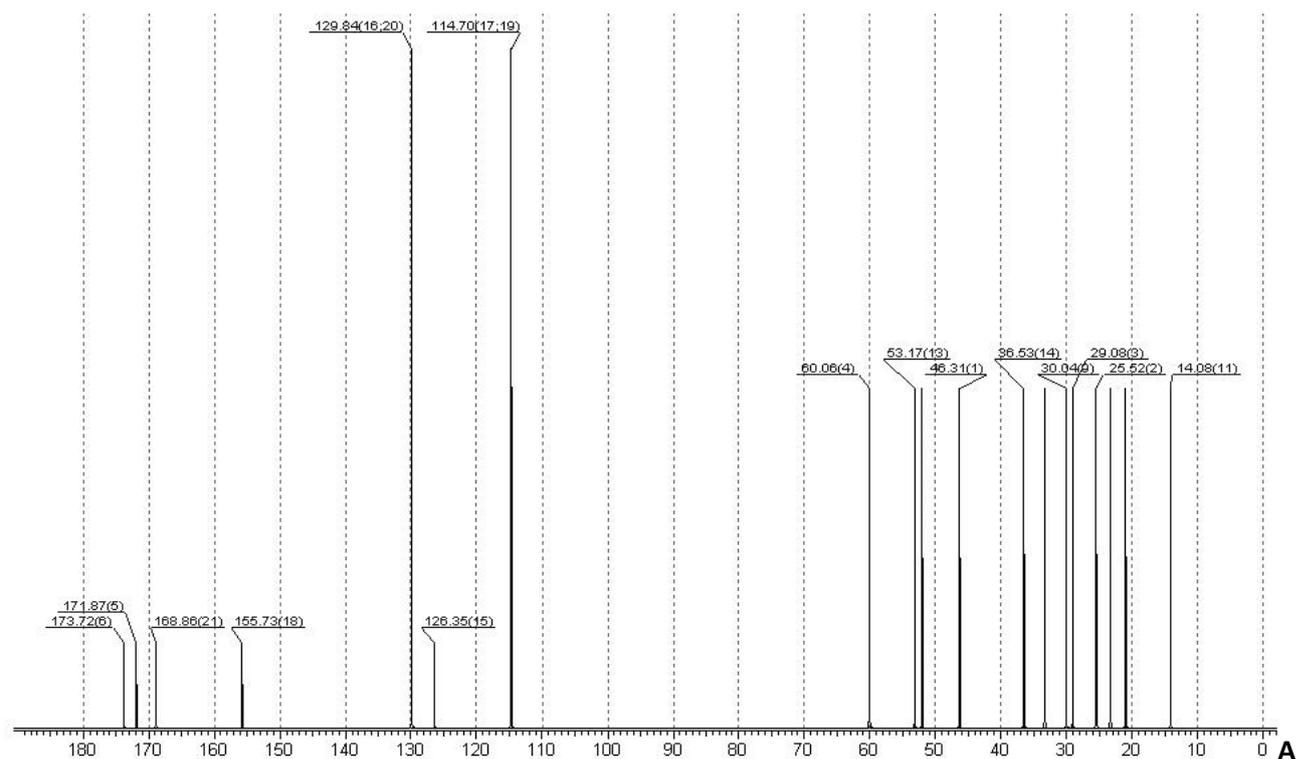
В целом, несмотря на информативность спектроскопии ЯМР на ядрах ¹H в анализе строения Дилепта, интерпретация спектров значительно затруднена из-за сложных по форме и накладывающихся друг на друга сигналов. В этом плане более эффективной и интерпретируемой представляется один из видов ЯМР-спектроскопии на ядрах ¹³C, включающий развязку от протонов: подавление спин-спиновых взаимодействий резонирующих атомов приводит к сигналам в виде узких полос и это позволяет различить даже очень близко расположенные сигналы. При этом предварительные компьютерные расчеты таких спектров являются более точными по сравнению с ЯМР ¹H.

В соответствии с этим, на втором этапе исследований были проведены предварительные компьютерные расчеты спектров ЯМР ¹³C Дилепта (рис. 8, а), а затем получены их реальные спектры (рис. 8 б) на примере одной субстанции из каждой серии, после чего проведено точное отнесение сигналов. Посторонних сигналов (кроме сигналов ДМСО в интервале 38 – 41 м.д.) на полученных спектрах нет.

На спектре ЯМР ¹³C Дилепта (рис. 8, б) также имеются расщепленные сигналы атомов углерода, отвечающие двум конформерам. Метиленовая группа 1 и СН-группа 4 пирролидинового кольца резонируют в виде двух близкорасположенных расщепленных линий при 46.19, 46.62 м.д. и 58.77, 59.45 м.д. соответственно, в то время как СН₂-2 и СН₂-3 проявляются при 25.52 и 29.08 м.д. Одиночная полоса при 171.67 м.д. и расщепленный сигнал при 171.80, 171.92 м.д. соответствуют кето-группам 5 и 6. Алкильные группы 7 – 11 по мере удаленности от акцепторной кето-группы 6 последовательно регистрируются в форме одиночных или расщепленных пиков при 33.06, 33.51 м.д. (СН₂-7), 30.83, 30.89 м.д. (СН₂-8), 23.79 м.д. (СН₂-9), 21.89, 21.96 м.д. (СН₂-10) и 13.73 м.д. (СН₃-

11). Группы CH -13 и CH_2 -14 дают характерные расщепленные линии при 53.26, 53.70 м.д. и 35.39, 35.92 м.д. Высокоинтенсивные расщепленные сигналы при 114.84, 114.91 м.д. и 129.73, 129.89 м.д. соответствуют ароматическим CH -группам 17, 19 и 16, 20, а углеродным атомам 15 и 18 отвечают расщепленные пики при 126.87, 127.31 м.д. и 155.90, 155.94 м.д. Атомы углерода сложноэфирной группы резонируют единым сигналом при 170.96 м.д. (CO -21) и расщепленным сигналом при 51.54, 51.56 м.д. (OCH_3 -23).





Б

Рисунок 8. Спектры ЯМР ^{13}C Дилепта в DMSO-d_6 . А – рассчитанный, Б – полученный.

Таким образом представленные типичные спектры ЯМР ^{13}C Дилепта и их описание для исследуемых стандартных образцов необходимы для включения в нормативную документацию в раздел «Подлинность». Полученный спектр ЯМР ^{13}C Дилепта должен соответствовать рисунку и сигналам, представленным в нормативной документации.

3.3. Хроматографические методы в контроле качества стандартных образцов Дилепта

Хроматографическая чистота полученных стандартных образцов Дилепта, была изучена с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии. Определение содержания остаточных органических растворителей в стандартных образцах проведено методом газо-жидкостной хроматографии.

3.3.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе стандартных образцов Дилепта

В связи с высокими требованиями, предъявляемыми к стандартным образцам, а также по ранее полученным данным был выбран метод ВЭЖХ для анализа чистоты стандартных образцов Дилепта с последующим включением в нормативную документацию. [54]

В полученных стандартных образцах Дилепта могут присутствовать исходные продукты синтеза, а именно метиловый эфир L-тирозина и N-капроил-L-пролин. Кроме этого в субстанции Дилепта могут быть обнаружены продукты гидролиза полученного препарата – N-капроил-L-пролил-L-тирозин.

Согласно литературным данным [54] поглощение Дилепта и возможных примесей в области от 200 до 210 нм выше, чем в интервале от 250 до 300. Также совпадение максимумов поглощения этих соединений наблюдается в интервале длин волн от 200 до 210 нм, поэтому детектирование проводили при длине волны 205 нм.

В оценке посторонних примесей была использована описанная ранее методика, разработанная сотрудниками ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова».[54]

Хроматографирование раствора проводят не менее пяти раз. На рис. 9 представлена типичная ВЭЖХ-хроматограмма испытуемых субстанций.

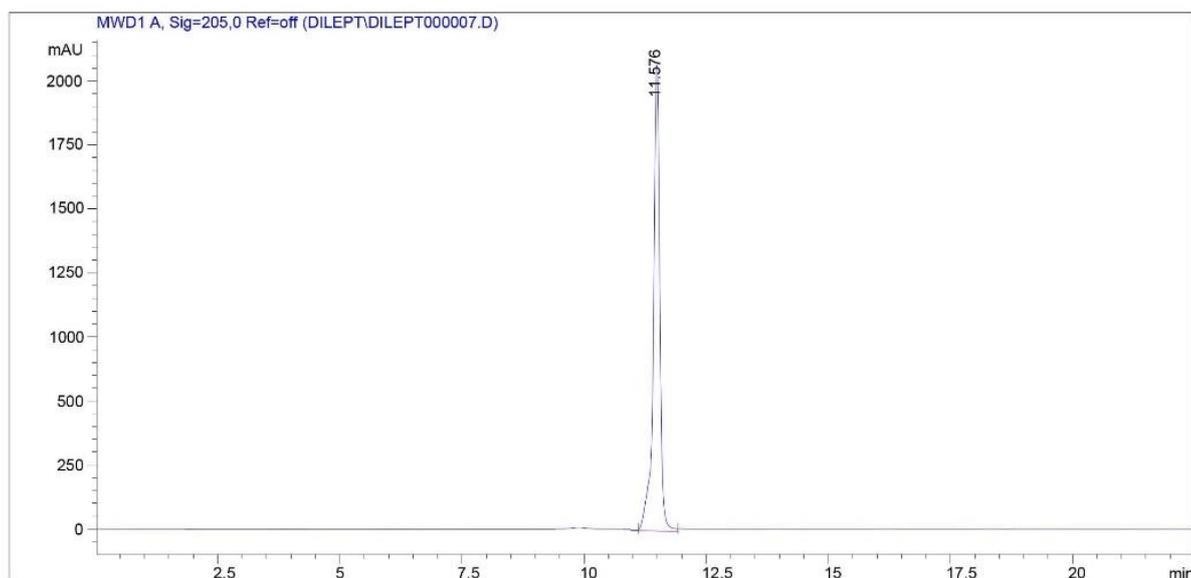


Рисунок 9. Типичная ВЭЖХ-хроматограмма стандартного образца Дилепта

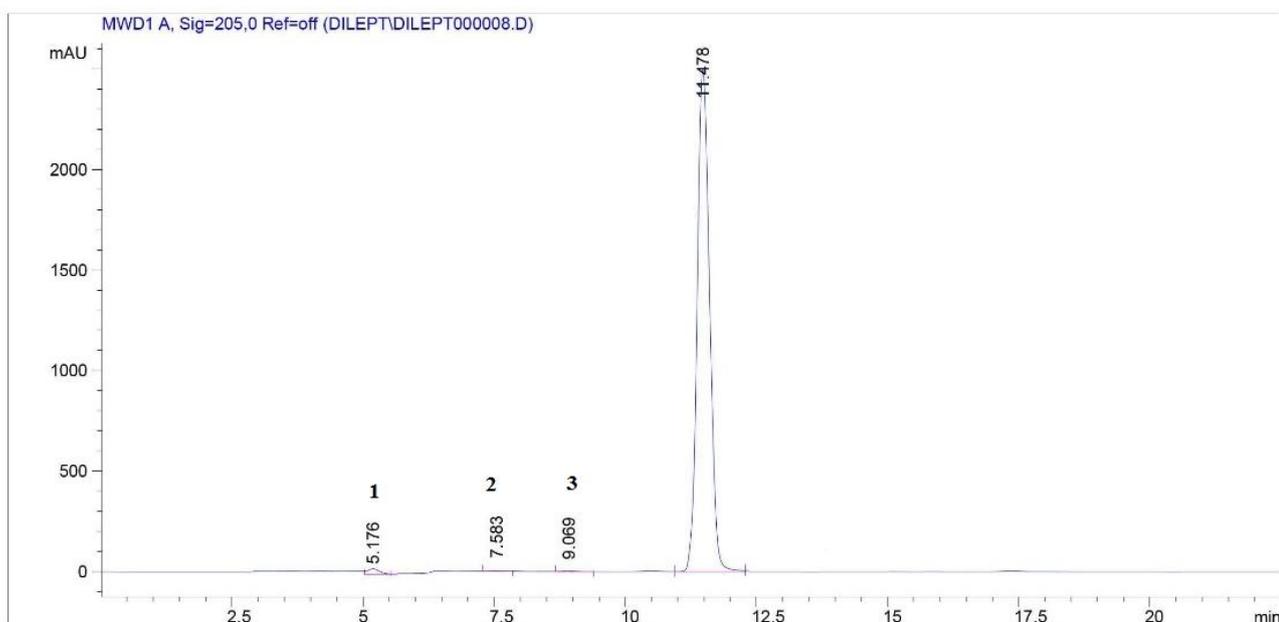


Рисунок 10. ВЭЖХ-хроматограмма полупродуктов синтеза и гидролиза Дилепта (1-метилловый эфир L-тирозина, 2 – N-капроил-L-пролил- L – тирозин, 3 – N- капроил-L-тирозин)

Селективность

На хроматограммах, полученных при введении образца подвижной фазы, отсутствуют пики с временами удерживания, соответствующими Дилепту и возможным примесям, что говорит о селективности метода.

Устойчивость

Устойчивость, или робастность, системы испытывали при незначительном изменении параметров методики определения посторонних примесей. В данном случае меняли длину волны детектора и скорость потока подвижной фазы.

Таблица 7

Результаты валидации по показателю «Устойчивость»

| Длина волны детектора | Скорость потока подвижной фазы, мл/мин | Среднее процентное содержание аналита в испытуемом растворе, от заданного количества | Среднее значение [%] |
|--|--|--|----------------------|
| 200 | 0,4 | 99,5 | 99,30 |
| | 0,6 | 99,1 | |
| 210 | 0,4 | 100,4 | 100,75 |
| | 0,6 | 101,1 | |
| Средняя величина \bar{x} | | | 100,03 |
| Стандартное отклонение s_x | | | 0,900 |
| Относительное стандартное | | | 0,899 |

Критерии допуска коэффициент вариации $\leq 3\%$ выполнен. Устойчивость метода удовлетворительная.

3.3.2. Газо-жидкостная хроматография в анализе стандартных образцов Дилепта

Стандартные образцы Дилепта, получают из фармакопейной субстанции, путем кристаллизации из этилацетата при соотношении 1:3,5 с добавлением 5-10% активированного угля. Поскольку этот растворитель может присутствовать в стандартном образце Дилепта, необходимо контролировать в ней его количество.

По требованиям ОФС «Остаточные органические растворители» содержание этилацетата, как растворителя 3-го класса токсичности, допускается не более 0,5% (5000 ppm).

Нами разработана более чувствительная и селективная газохроматографическая методика определения остаточных органических растворителей с применением статического парофазного метода ГХ- HS на газовом хроматографе, снабженным HS-устройством для отбора проб (дозатором равновесного пара). В таблице 8 представлены условия хроматографирования, в таблице № 9 - параметры статического пробоотборника-HS.

Таблица 8

Хроматографические условия определения остаточных органических растворителей в стандартных образцах Дилепта

| | |
|--|---|
| Детектор | Пламенно-ионизационный детектор (ПИД). |
| Температура детектора | 230 °С |
| Температура инжектора | 210 °С |
| Температура термостата колонки в режиме программирования | Начальная температура 50 °С в течение 4 мин., затем повышение температуры со скоростью 15 °С/мин. до 200 °С и удерживается в течение 5 мин. |

| | |
|---------------------|-------------------------------|
| Газ носитель (азот) | Скорость потока 4,9 мл/мин. |
| Сплит-система | Деление потока 1:5 |
| Водород | Скорость потока - 30 мл/мин. |
| Воздух | Скорость потока - 300 мл/мин. |

Таблица 9

Параметры статического парофазного пробоотборника

| | |
|--|---------|
| Температура head space виалы | 85 °С |
| Время термостатирования (уравновешивания) head space виалы | 40 мин. |
| Температура линии переноса | 135 °С |
| НС-давление (давление наддува виалы) | 0,7 Мпа |
| Время нагнетания (подачи под давлением) | 5 мин. |
| Время отбора пробы | 10 сек |
| Объём вводимой дозы равновесного пара | 1,0 мл |

Методика проведения анализа.

Для оценки содержания остаточного органического растворителя этилацетата в стандартных образцах Дилепта был предложен метод внутреннего стандарта. Внутренним стандартом был выбран бутилацетат, раствором сравнения – диметилсульфоксид.

1. Приготовление стандартных и испытуемых растворов.

1. Приготовление раствора внутреннего стандарта: в мерную колбу вместимостью 100 мл отмеривали 20 мл диметилсульфоксида, далее во взвешенную колбу помещали около 0,5 г (точная навеска в граммах)

бутилацетата, доводили объем раствора в колбе диметилсульфоксидом до метки, перемешивали (раствор А). 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки тем же растворителем, перемешивали (раствор Б). Концентрация раствора внутреннего стандарта 0,5 мг/мл.

2. *Приготовление раствора для определения поправочного коэффициента (раствор В):* около 0,5 г (точная навеска) этилацетата и около 0,5 г (точная навеска) бутилацетата помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, наполненную наполовину диметилсульфоксидом, доводили объем раствора в колбе до метки тем же растворителем, перемешивали. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки тем же растворителем, перемешивали. Концентрации обоих веществ в растворе 0,5 мг/мл.

3. *Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы (раствор С):* около 0,05 г (точная навеска) этилацетата и 0,05 г (точная навеска) бутилацетата помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, наполненную наполовину диметилсульфоксидом, доводили объем раствора в колбе до метки тем же растворителем, перемешивали. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивали. Концентрации обоих веществ в растворе 0,05 мг/мл.

4. *Контрольный раствор:* 2,0 мл диметилсульфоксида помещали в head space виалу вместимостью 10 мл, герметично закупоривают крышками с тефлоновыми прокладками и обжимают горловины виал алюминиевыми крышками.

5. *Приготовление испытуемых растворов стандартных образцов Дилепта:* около 0,2 (точная навеска) субстанции, предназначенной для создания стандартного образца, помещали в виалы для парофазной экстракции, прибавляли 2 мл раствора Б, перемешивали.

Растворы используют свежеприготовленными.

II. Проверка пригодности хроматографической системы.

В автоматическом режиме в указанных условиях (Таблицы № 7-8) в дозатор хроматографа вводится паро-газовая фаза раствора С (раствора для проверки пригодности хроматографической системы в объеме 1,0 см³. Раствор С хроматографируют последовательно в 6 повторностях. На хроматограммах регистрируют пики этилацетата и бутилацетата. Результаты определения считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы»:

- порядок выхода пиков растворителей:

1- этилацетат; 2- бутилацетат; 3- диметилсульфоксид.

- эффективность колонки, рассчитанная по пику этилацетата, должна быть не менее 5 000 теоретических тарелок;

- разрешение между пиками этилацетата и бутилацетата должно быть не менее 2,0;

- коэффициент асимметрии пика этилацетата должен быть не более 1,5;

- относительное стандартное отклонение площадей пиков этилацетата (RSD) по результатам 6 измерений не превышает 10,0%.

На рис.9 представлена типичная ГЖХ-хроматограмма раствора проверки пригодности хроматографической системы со следующими параметрами:

- время выхода пика этилацетата - 5,31 мин.;

- время выхода пика бутилацетата - 8,54 мин.;

- относительное время выхода этилацетата – 0,62;

- разрешение (n, n+1) – 23,63;

- асимметрия пика этилацетата - 1,07;

- число теоретических тарелок по пику этилацетата (ТТ) – 21403;

- относительное стандартное отклонение по площади пика этилацетата (RSD)- 8,85%.



Рисунок 9. Типичная ГЖХ-хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы (1-этилацетат; 2- бутилацетат)

Относительное стандартное отклонение площадей пика этилацетата (RSD) по 6 последовательным введениям раствора для проверки пригодности

хроматографической системы рассчитывали с помощью программы Excel по данным, представленным в таблице № 10.

Таблица № 10

Расчет относительного стандартного отклонения площадей пика этилацетата (RSD) в растворе ПИХС

| Файл хроматограммы | Площадь пика этилацетата, mV*сек |
|---|-------------------------------------|
| ZB251433.chw | 28,14 |
| ZB251502.chw | 26,86 |
| ZB251537.chw | 27,72 |
| ZB251611.chw | 28,29 |
| ZB251645.chw | 27,45 |
| ZB251728.chw | 26,53 |
| | |
| Среднее значение площади пика | 27,50 |
| Дисперсия | 0,406 |
| Стандартное отклонение | 2,435 |
| Относительное стандартное отклонение (RSD), % | 8,85 |

После проведения процедуры проверки пригодности хроматографической системы в описанных выше хроматографических условиях последовательно хроматографируют контрольный раствор, испытуемый раствор и стандартный раствор В. Были исследованы 3 различные серии субстанции Дилепта, предназначенных для создания стандартного образца, для количественной

оценки содержания в них остаточного органического растворителя - этилацетата. Каждый стандартный раствор и каждый из испытуемых растворов каждой серии готовился в трех повторностях.

На рис.10 представлена типичная ГЖХ-хроматограмма стандартного раствора В.

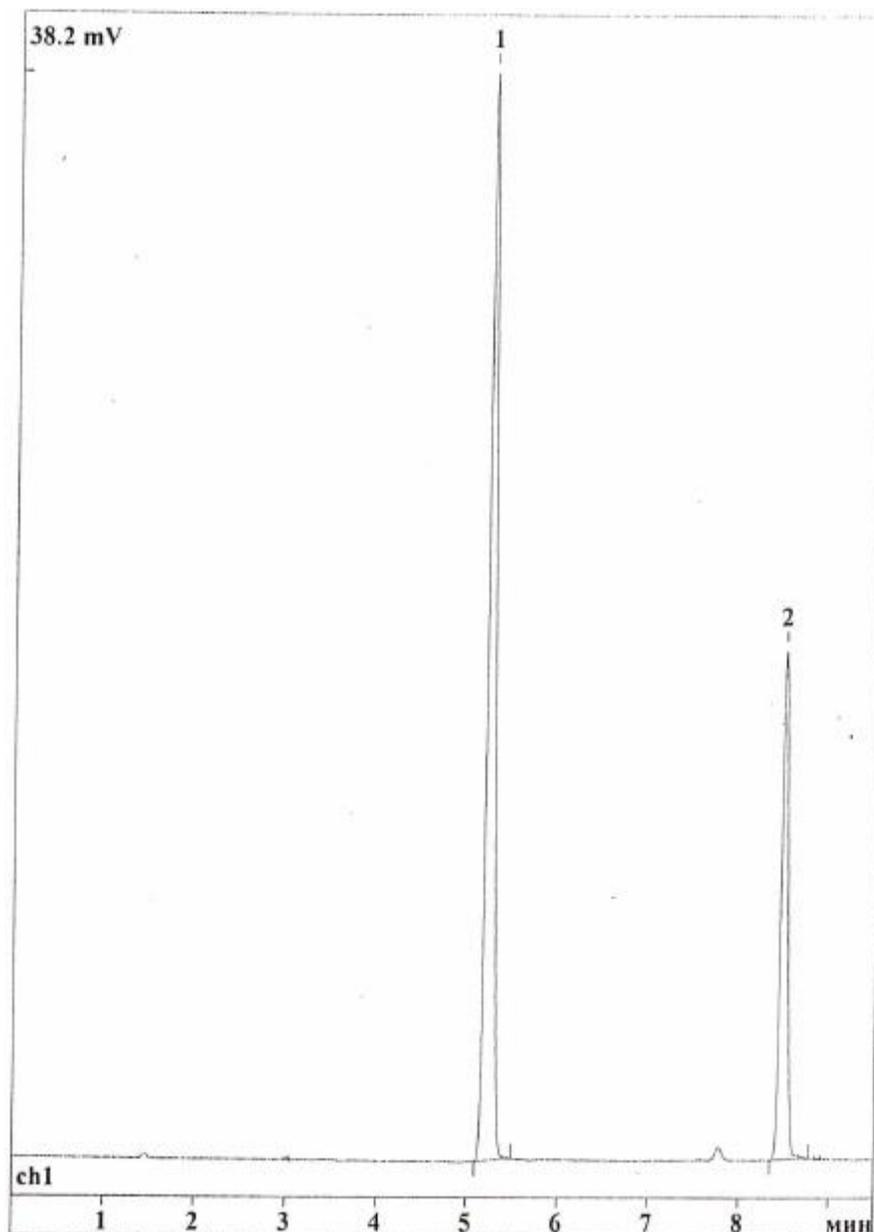


Рисунок 10. Типичная ГЖХ-хроматограмма стандартного раствора В
(1-этилацетат; 2- бутилацетат)

На рис.11 представлена типичная ГЖХ-хроматограмма исследуемых стандартных образцов Дилепта.

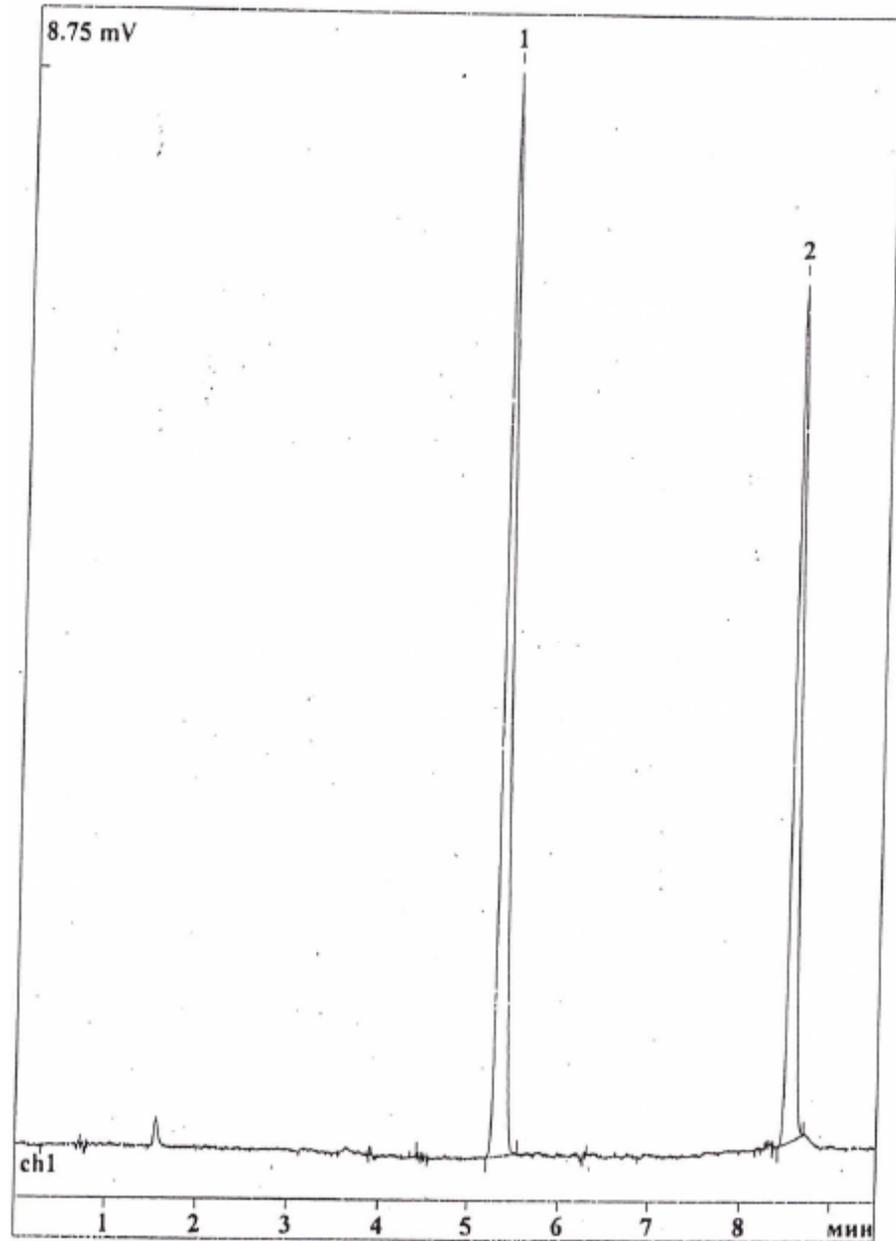


Рисунок 11. Типичная ГЖХ-хроматограмма испытуемого образца Дилепта
(1-этилацетат; 2- бутилацетат)

III. Количественное определение этилацетата в стандартном образце Дилепта.

По полученным хроматограммам рассчитывали количественное содержание этилацетата в 3-х испытуемых сериях стандартных образцов Дилепта двумя альтернативными способами.

Ша. Обработка полученных результатов с помощью компьютерной программы МультиХром для Windows версия 1.5.

Для этого из раствора В, содержащего одинаковые концентрации этилацетата и бутилацетата (0,5 мг/мл), готовили 5 калибровочных растворов с концентрациями обоих веществ 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 мг/мл. Каждый из калибровочных растворов хроматографировали 6 раз, вычисляя средние значения площадей, уравнение калибровочного графика и коэффициент корреляции R^2 . Калибровочный график (на рис.12) линеен в этом диапазоне концентраций и описывался уравнением: $Y = 0,0025x - 0,0155$, где x - площадь пика этилацетата.

Коэффициент корреляции $R^2 = 0,9979$.

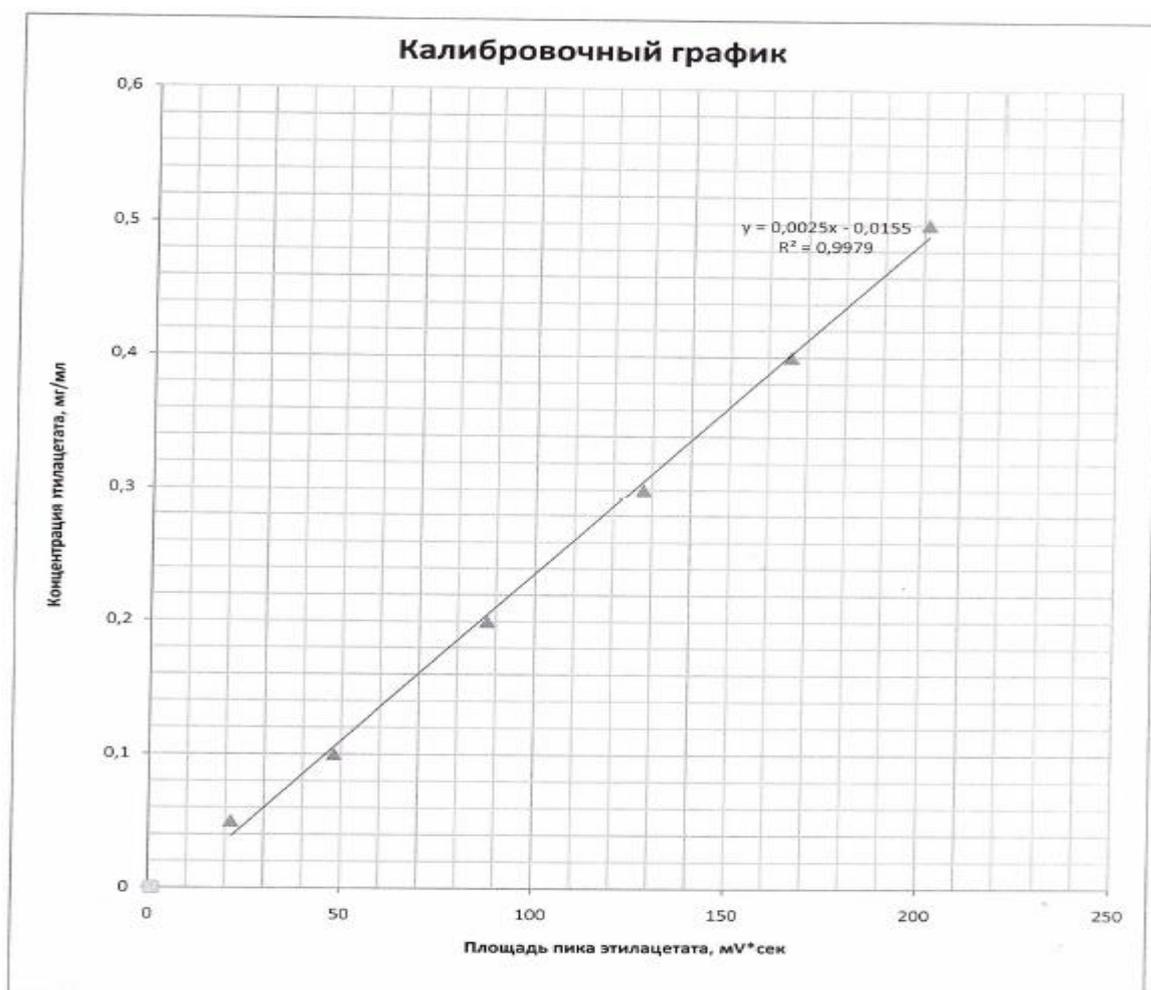


Рисунок 12. Калибровочный график для определения этилацетата в стандартных образцах Дилепта методом ГЖХ

Шб. Количественный расчет по формуле.

Содержание этилацетата в процентах ($X_i\%$) рассчитывали по формуле:

$$X_i\% = \frac{A_{\text{исп.}} \cdot C_{\text{ст}} \cdot V \cdot 100 \cdot 10}{A_{\text{ст}} \cdot m_{\text{исп.}}} = \frac{A_{\text{исп.}} \cdot 0,05 \cdot 2}{K \cdot 0,2}$$

где $A_{\text{исп.}}$ – отношение площадей пиков этилацетата и внутреннего стандарта (бутилацетата) на хроматограмме испытуемого раствора;

$A_{ст} = K$ – поправочный коэффициент (отношение площадей пиков этилацетата и бутилацетата на хроматограмме стандартного раствора В). Для этилацетата $k = 2,42$.

$C_{ст}$ – концентрация этилацетата в стандартном растворе В, %;

$m_{исп}$ – масса навески анализируемой пробы, г;

V – объем растворителя (диметилсульфоксида), взятый для растворения анализируемой пробы, мл.

Результаты определения содержания остаточного этилацетата в стандартных образцах Дилепта представлены в Таблице № 11.

Таблица 11

Содержания этилацетата (%) в стандартных образцах Дилепта

| № п/п | Номер серии | Содержания этилацетата, % \pm RSD |
|-------|-------------|-------------------------------------|
| 1. | I | 0,151 \pm 0,011 |
| 2. | II | 0,159 \pm 0,013 |
| 3. | III | 0,110 \pm 0,014 |

Селективность

На хроматограммах, полученных при введении ДМСО без содержания этилацетата и бутилацетата, наблюдается единичный пик с временем удерживания, соответствующим ДМСО; прочие пики отсутствуют, что говорит о селективности метода.

Линейность

Линейность – способность методики в диапазоне применения давать величины сигнала, прямо пропорциональные содержанию определяемого компонента.

С целью оценки линейности методики осуществлялось построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика готовили калибровочные модельные смеси. Готовили 5 калибровочных образцов, содержащих 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 мг/мл этилацетата соответственно и 0,1 мг/мл внутреннего стандарта – бутилацетата. Проводили анализ калибровочных образцов, и по полученным данным строили калибровочный график с помощью программы Microsoft Excel 2010. Оценивали зависимость концентрации этилацетата в калибровочном образце (ось X) от отношения площади хроматографического пика этилацетата к площади хроматографического пика ВС (метод ВС). При этом определяли характер зависимости, тип аппроксимации, достоверность аппроксимации и коэффициенты соответствующего уравнения регрессии. Представленные данные свидетельствуют о том, что для определяемого вещества калибровочные графики описываются линейной функцией с высоким показателем достоверности аппроксимации. Коэффициент корреляции составил 0,99973, что соответствует требованиям НД (не менее 0,999).

Был выполнен расчёт концентраций этилацетата по уравнению калибровочной зависимости, после чего полученные результаты сравнивались с фактическими, а затем были рассчитаны значения относительной погрешности.

Таблица 12

| С_{факт}, мг/мл | | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 |
|-------------------------------------|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| Калибровочная кривая № 1 | Отношение площади пика ЭА к площади пика ВС | 0,0478 | 0,0969 | 0,1845 | 0,2791 | 0,3655 |
| | С_{рассчит}, мг/мл | 0,048 | 0,102 | 0,199 | 0,303 | 0,398 |
| | ε, % | 3,91 | 0,15 | 0,66 | 0,97 | 0,47 |

Полученные значения относительной погрешности соответствуют требованиям НД (не более 5%).

Правильность и прецизионность

Оценку показателей правильности и прецизионности осуществляли путём исследования образцов контроля качества (3 независимых образца каждой концентрации). Правильность и прецизионность определяли в течение 1 рабочего дня (внутри серии) и в течение нескольких дней (между сериями). Расчёт концентраций определяемых веществ в образцах контроля качества выполняли по уравнению калибровочного графика, полученного в составе текущей аналитической серии.

Таблица 13

Результаты оценки правильности и прецизионности методики (внутри серии)

| введено (мг/мл) | найдено (мг/мл) | найдено (мг/мл), среднее значение (n=5) | S.D. (n=5) | RSD, % (n=5) | ϵ , % | Критерий приемлемости |
|-----------------|-----------------|---|------------|--------------|----------------|-------------------------------|
| 0,05 | 0,046 | 0,0482 | 0,002 | 3,99 | 3,60 | RSD < 5%, ϵ < 5%, |
| | 0,049 | | | | | |
| | 0,051 | | | | | |
| | 0,047 | | | | | |
| | 0,048 | | | | | |
| 0,2 | 0,211 | 0,2088 | 0,003 | 1,60 | 4,40 | RSD < 5%, ϵ < 5%, |
| | 0,205 | | | | | |
| | 0,209 | | | | | |
| | 0,213 | | | | | |
| | 0,206 | | | | | |
| 0,4 | 0,424 | 0,4126 | 0,009 | 2,16 | 0,15 | RSD < 5%, ϵ < 5%, |
| | 0,411 | | | | | |
| | 0,415 | | | | | |
| | 0,407 | | | | | |
| | 0,419 | | | | | |

Таблица 14

Результаты оценки правильности и прецизионности методики (между 2-мя сериями)

| введено (мг/мл) | найдено (мг/мл) | найдено (мг/мл), среднее значение (n=10) | S.D. (n=10) | RSD, % (n=10) | ϵ , % | Критерий приемлемости |
|--------------------|--------------------|--|----------------|---------------------|----------------|-------------------------------|
| 0,1 | 0,046 | 0,0484 | 0,002 | 4,79 | 3,20 | RSD < 5%, ϵ < 5%, |
| | 0,049 | | | | | |
| | 0,051 | | | | | |
| | 0,047 | | | | | |
| | 0,048 | | | | | |
| | 0,045 | | | | | |
| | 0,048 | | | | | |
| | 0,052 | | | | | |
| | 0,051 | | | | | |
| | 0,047 | | | | | |
| 0,2 | 0,211 | 0,2079 | 0,004 | 1,85 | 3,95 | RSD < 5%, ϵ < 5%, |
| | 0,205 | | | | | |
| | 0,209 | | | | | |
| | 0,213 | | | | | |
| | 0,206 | | | | | |

| | | | | | | |
|-----|-------|--------|-------|-------------|-------------|----------------------|
| | 0,213 | | | | | |
| | 0,205 | | | | | |
| | 0,201 | | | | | |
| | 0,207 | | | | | |
| | 0,209 | | | | | |
| 0,4 | 0,424 | 0,4079 | 0,010 | 2,45 | 1,97 | RSD < 5%, ε < 5%, |
| | 0,411 | | | | | |
| | 0,402 | | | | | |
| | 0,407 | | | | | |
| | 0,419 | | | | | |
| | 0,396 | | | | | |
| | 0,391 | | | | | |
| | 0,405 | | | | | |
| | 0,411 | | | | | |
| | 0,413 | | | | | |

Правильность и прецизионность методики соответствуют требованиям НД (RSD не более 5 %).

Устойчивость

Устойчивость, или робастность, системы испытывали при незначительном изменении параметров методики количественного определения. В данном случае меняли температуру детектора и скорость потока газа-носителя.

Таблица 15

Результаты валидации по показателю «Устойчивость»

| Температура детектора | Скорость потока газа-носителя, мл/мин | Среднее процентное содержание аналита в испытуемом растворе, от заданного количества | Среднее значение [%] |
|---|---------------------------------------|--|----------------------|
| 220 | 4,8 | 98,9 | 99,80 |
| | 5,0 | 100,7 | |
| 240 | 4,8 | 99,4 | 100,3 |
| | 5,0 | 101,2 | |
| Средняя величина \bar{x} | | | 100,05 |
| Стандартное отклонение s_x | | | 0,353 |
| Относительное стандартное отклонение S_{xrel} | | | 0,353 |

Критерии допуска коэффициент вариации $\leq 3\%$ выполнен. Устойчивость метода удовлетворительная.

Контроль качества стандартных образцов Дилепта необходимо проводить по показателю «Остаточные органические растворители» с помощью метода ГЖХ. Норма – содержание этилацетата не более 0,2%.

3.4. Количественное определение стандартных образцов Дилепта методом Кьельдаля.

Дилепт является по своему строению метиловым эфиром N-капроил-L-пролил-L-тирозина, таким образом наличие азота позволяет использовать метод Кьельдаля для количественного определения стандартных образцов.

Анализ проводили по методике ГФ XIII изд. Дилепт является трудносжигаемым соединением, поэтому в процессе минерализации использовали металлический селен в качестве катализатора.

Содержание Дилепта в стандартном образце (X%) рассчитывают по формуле:

$$X\% = \frac{(V_1 - V_2) \times K \times 0,001401 \times 390,48}{28 \times m_{\text{нав}}} \times 100\%$$

Где

V_1 – объем кислоты хлористоводородной, пошедший на титрование испытуемого раствора, мл;

V_2 – объем кислоты хлористоводородной, пошедший на титрование контрольного раствора, мл;

K – поправочный коэффициент;

28 – молекулярная масса азота, входящего в состав Дилепта;

390,48 – молекулярная масса Дилепта;

$M_{\text{нав}}$ – масса навески Дилепта, г.

1 мл кислоты хлористоводородной соответствует 0,001401 г азота.

Результаты количественного определения стандартных образцов Дилепта представлены в таблице 16.

Таблица 16

Результаты количественного определения стандартных образцов Дилепта

| Номер Серии | Количественное содержание, % | | | | | Среднее Значение, % |
|----------------|---|--------|-------|--------|--------|---------------------------|
| | | | | | | |
| I | 99,94 | 100,12 | 99,91 | 100,23 | 100,02 | 100,04 |
| II | 100,14 | 99,92 | 99,91 | 99,90 | 100,03 | 99,99 |
| III | 99,90 | 100,20 | 99,57 | 99,73 | 99,81 | 99,84 |
| I | | | | | | |
| I | $n=5, \Delta x=100,04 \ s=0,132 \ \Delta \Delta x=0,16 \ (P=0,95)$ $\Delta x \pm \Delta \Delta x=100,04 \pm 0,16$ Доверит интервал $ср = 0,16\%$ | | | | | |
| II | | | | | | |
| II | $n=5, \Delta x=99,99 \ s=0,104 \ \Delta \Delta x=0,13 \ (P=0,95)$ $\Delta x \pm \Delta \Delta x=99,99 \pm 0,13$ Доверит интервал $ср = 0,16\%$ | | | | | |
| III | | | | | | |
| III | $n=5, \Delta x=99,84 \ s=0,22 \ \Delta \Delta x= 0,27 \ (P=0,95)$ $\Delta x \pm \Delta \Delta x=99,99 \pm 0,27$ Доверит интервал $ср = 0,27\%$ | | | | | |

Из результатов проведенного анализа трех серий стандартных образцов видно, что содержание Дилепта колеблется от 99,57 до 100,2%. Результаты могут быть связаны с погрешностью самого метода количественного определения. Таким образом установлена норма количественного содержания Дилепта в стандартных образцах не менее 99,5% и не более 100,5%.

Метод Кьельдаля является фармакопейным методом анализа, поэтому проведение его валидации не требуется, согласно требованиям ИСН.

3.5. Установление показателей качества и норм для стандартных образцов Дилепта

После проведения полного фармакопейного анализа изучаемых стандартных образцов, нами выбраны показатели качества, необходимые для включения в нормативную документацию, а также установлены научно-обоснованные нормы по ним. Показатели качества и нормы для изучаемых стандартных образцов представлены в таблице № 17.

Таблица 17

Спецификация контроля качества стандартного образца Дилепта

| Показатели и методы | Результаты | | | Установленные норма качества для субстанции | Установленные нормы качества для СО |
|--|---|----|-----|---|---|
| | I | II | III | | |
| Описание Визуально | Белый кристаллический порошок | | | | |
| Растворимость ГФ XIII, Том 1, стр. 531 (ОФС.1.2.1.0005.15) | Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в этилацетате, растворим в ацетоне, легко растворим в этаноле. | | | | |
| Подлинность | | | | | |
| УФ-спектрофотометрия | | | | 0,01% раствор в спирте в области от 250 | 0,01% раствор в спирте в области от 250 до 350 нм |

| | | | |
|---|--|--|--|
| | | до 350 нм должен иметь максимум поглощения около 278±2нм. | должен иметь максимум поглощения около 278±2нм, и минимум поглощения около 218±0,2. |
| ИК-спектрометрия | | ИК-спектр стандартного образца должен совпадать с ИК- спектром на прилагаемом рисунке. | ИК-спектр стандартного образца должен совпадать с ИК- спектром на прилагаемом рисунке. |
| ЯМР- спектроскопия | | Показатель отсутствует | ЯМР-спектр стандартного образца должен совпадать с ЯМР-спектром прилагаемого рисунка. |
| Прозрачность ГФ XIII, Том 1, стр. 542 | Раствор 0,5 г препарата в 10 мл этилового спирта должен быть прозрачным | Прозрачный или не более эталонного раствора I (5 % раствор в этаноле) | Раствор 0,5 г препарата в 10 мл этилового спирта должен быть |

| | | | | | |
|--|--|-----------------|-----------------|---------------------------|---|
| (ОФС.1.2.1.0007.15) | | | | | прозрачным |
| Цветность ГФ XIII, Том 1, стр. 545 (ОФС.1.21.0008.15) | Раствор, приготовленный для теста «Прозрачность», должен быть бесцветным | | | Бесцветный | Раствор, приготовленный для теста «Прозрачность», должен быть бесцветным |
| Температура плавления, °С ГФ XIII, Том 1, стр. 560 (ОФС.1.2.1.0011.15) | 121,0- 123,0 | 121,5- 122,5 | 121,0- 123,0 | От 119 до 124 | От 121 до 123 |
| Удельное вращение, ° ГФ XIII, Том 1, стр. 605 (ОФС.1.2.1.0018.15) | -49,60 | -50,80 | -49,20 | От -48,0 до - 53,0 | От -49,0 до -51,0 |
| Вода, % ГФ XIII, Том 1, стр. 719 (ОФС.1.2.3.0002.15) | 0,15 | 0,12 | 0,13 | Показатель отсутствует | Не более 0,2 |
| Сульфатная зола, % ГФ XIII, Том 1, стр. 714 | 0,059 | 0,071 | 0,089 | Не более 0,1 | Не более 0,1 |

| | | | | | |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------------|---|
| (ОФС.1.2.2.2.0014.1 5) | | | | | |
| Тяжелые металлы ГФ XIII, Том 1, стр. 708 (ОФС.1.2.2.2.0010.15) | 0,0009 | 0,001 | 0,001 | Не более 0,001% | Не более 0,001% |
| Остаточные органические растворители ГЖХ | 0,151 ± 0,011 | 0,159 ± 0,013 | 0,110 ± 0,014 | Показатель отсутствует | Этилацетата не более 0,2% |
| Посторонние примеси ВЭЖХ | Не обнаружено | | | Индивидуальной примеси не более 0,5 % | Сумма всех единичных примесей не более 0,1% |
| Количественное содержание Метод Кьельдаля | 100,04 | 99,99 | 99,84 | Не менее 98,5% и не более 100,5% | Не менее 99,5% и не более 100,5% |

ГЛАВА 4. Изучение физико-химических свойств и разработка методик анализа стандартного образца ГБ-115.

4.1 Разработка методик анализа стандартного образца ГБ-115.

В процессе проведенного исследования физико-химических свойств стандартного образца ГБ-115 изучены три серии субстанции по следующим показателям: внешний вид, растворимость в различных растворителях, прозрачность и цветность полученных растворов, температура плавления, удельное вращение, а также вода и сульфатная зола. По полученным результатам были установлены нормы контроля качества стандартных образцов.

4.1.1. Внешний вид стандартного образца ГБ-115

По внешнему виду все образцы стандартного образца ГБ-115 представляли собой белый или белый с кремоватым или желтоватым оттенком кристаллический порошок. Оценку проводили визуально, согласно методики ГФ XIII, Том 1, стр. 179. По результатам определения была установлена норма по показателю «Описание» - белый или белый с кремоватым или желтоватым оттенком кристаллический порошок.

4.1.2. Растворимость стандартного образца ГБ-115

Определение растворимости проводили по методике ГФ XIII, Том 1, стр. 531.

Растворимость определяли в следующих растворителях: вода, гексан, хлороформ, этанол (95%), диоксан, ацетон, диметилформаид, диметилсульфоксид. Все изученные серии субстанции, предназначенной для получения стандартного образца ГБ-115 практически нерастворимы в воде, очень мало растворимы в хлороформе, ацетоне, мало растворимы в гексане, этаноле

(95%), диоксане, легко растворимы в диметилсульфоксиде и легко растворимы в диметилформамиде. Результаты анализа представлены в таблице 18.

Таблица 18

Растворимость серий стандартных образцов ГБ-115 в различных растворителях

| № серии | I | II | III |
|---------------------|-------------------|-----------|------------|
| Растворитель | | | |
| Вода | Менее чем 1:10000 | | |
| Хлороформ | 1:1500 | 1:1500 | 1:1500 |
| Ацетон | 1:1400 | 1:1500 | 1:1600 |
| Гексан | 1:150 | 1:150 | 1:160 |
| Этанол (95%) | 1:150 | 1:140 | 1:140 |
| Диоксан | 1:120 | 1:120 | 1:130 |
| Диметилсульфоксид | 1:0,5 | 1:0,5 | 1:0,7 |
| Диметилформамид | 1:0,6 | 1:0,6 | 1:0,6 |

При контроле качества стандартного образца ГБ-115 предложено определять растворимость стандартного образца в воде (практически нерастворим), в ацетоне (очень мало растворим), в этаноле (95%) (мало растворим) и диметилсульфоксиде (легко растворим). Данные нормы совпадают с НД для фармакопейной субстанции, так как дополнительная очистка стандартных образцов не может изменить нормы по показателю «Растворимость».

4.1.3. Прозрачность и цветность растворов стандартного образца ГБ-115

Как было изучено ранее, серии субстанции ГБ-115 практически нерастворим в воде, для оценки этих показателей качества из полученного образца были приготовлены 0,5% растворы субстанций в этиловом спирте (0,05 г в 10 мл 95% этанола). [43]

Прозрачность и степень мутности полученных растворов определяли по методике ГФ XIII, Том 1, стр. 542, а цветность полученных растворов определяли согласно методике ГФ XIII, Том 1, стр. 535.

Из данных, представленных в таблице 19, видно, что по показателю «Прозрачность» все растворы стандартного образца ГБ-115 в этиловом спирте 95% являются прозрачными, а по показателю «Цветность» - бесцветными.

Таблица 19

Результаты определения прозрачности и цветности 0,5% растворов стандартных образцов ГБ-115 в этиловом спирте 95%

| № серии | I | II | III |
|--------------|------------|------------|------------|
| Показатель | | | |
| Прозрачность | Прозрачный | Прозрачный | Прозрачный |
| Цветность | Бесцветный | Бесцветный | Бесцветный |

Нами установлены нормы по показателям «Прозрачность» и «Цветность» спиртовых растворов стандартного образца. 0,5 % спиртовые растворы стандартного образца ГБ-115 должны быть прозрачными и бесцветными. В ходе наших исследований не наблюдалось изменений этих показателей, что может свидетельствовать о постоянстве состава стандартного образца ГБ-115.

4.1.4. Определение температуры плавления стандартного образца ГБ-115

Определение температуры плавления проводили со скоростью подъема температуры 0,5-1 °С в минуту по методике ГФ XIII, Том 1 стр. 560. Предварительно высушенные образцы препарата плавилась в интервале 177– 179° С. Каждый отдельный образец субстанции ГБ-115 плавился в пределах 1-2° С четко, с видимым разложением. Результаты представлены в таблице № 20. Для проведения контроля качества стандартных образцов препарата были

установлены нормы по показателю «Температура плавления», а именно от 177 до 179 С⁰ с разложением. Результаты исследования демонстрируют, что субстанция, предназначенная для создания стандартного образца, более очищенная – пределы по данному показателю могут быть сужены в отличие от НД для фармакопейной субстанции.

4.1.5. Определение удельного вращения растворов стандартного образца ГБ-115

Строение молекулы ГБ-115 предполагает наличие у этого вещества двух асимметрических атомов углерода, что в свою очередь обуславливает наличие оптической активности. Таким образом, было рассчитано удельное вращение растворов стандартных образцов препарата. Для определения удельного вращения использовали 5% растворы ГБ-115 в диметилформамиде по методике ГФ XIII, Том 1, стр. 605. Значение удельного вращения растворов ГБ-115 лежало в интервале от -9,00 до -10,00 и норма может быть включена в нормативную документацию. Полученные результаты определения удельного вращения представлены в таблице № 20.

4.1.6. Определение содержания воды в стандартных образцах ГБ-115

Определение воды в стандартных образцах ГБ-115 проводили согласно методике ГФ XIII, Том 1, стр. 719. Содержание воды определяли методом К.Фишера. Результаты представлены в таблице № 20. Включение данного показателя в НД на разрабатываемый стандартный образец необходимо, следуя современным требованиям ведущих фармакопей, таких как ГФ РФ, Американская и Европейская Фармакопеи.

Результаты определения температуры плавления, удельного вращения и воды для стандартных образцов ГБ-115

| № серии | I | II | III |
|-----------------------|---------|-------------|-------------|
| Показатель | | | |
| Температура плавления | 177-178 | 177,5-178,5 | 177,5-179,0 |
| Удельное вращение | -9,3 | -9,0 | -10,0 |
| Вода | 0,05% | 0,10% | 0,09% |

4.1.7. Определение сульфатной золы в стандартных образцах ГБ-115

Определение показателя «Сульфатная зола» проводили согласно методике ГФ XIII, том 1, стр. 714. В таблице № 21 представлены полученные результаты.

Оценивая полученные результаты, был сделан вывод о необходимости включения в ФС на разрабатываемый стандартный образец нормы не более 0,1 %, также как и для фармакопейной субстанции.

4.1.8. Определение тяжелых металлов в стандартных образцах ГБ-115

Определение показателя «Тяжелые металлы» проводили согласно методике ГФ XIII, том 1, стр. 708. Полученные результаты представлены в таблице № 21. Оценивая полученные результаты, был сделан вывод о необходимости включения в ФС на разрабатываемый стандартный образец нормы не более 0,001 %, также как и для фармакопейной субстанции.

Результаты определения сульфатной золы в стандартных образцах ГБ-115

| № серии | I | II | III |
|----------------------------|-------|--------|-------|
| Содержание сульфатной золы | 0,045 | 0,067 | 0,044 |
| Тяжелые металлы | 0,001 | 0,0009 | 0,001 |

4.2. Изучение спектральных характеристик стандартного образца ГБ-115

4.2.1. УФ-спектрофотометрия

Изучив литературные данные, а также исследования, посвященные анализу субстанции ГБ-115, мы выбрали методику УФ-спектрофотометрии, для определения подлинности полученных стандартных образцов [43].

В процессе изучения спектральных свойств, нами получены УФ-спектры 0,004 % растворов стандартных образцов препарата в области длин волн от 200 до 350 нм. Полученные спектры имели четкие максимумы и минимумы поглощения. На рис. 13-14 представлены типичные спектры стандартных образцов ГБ-115 в этаноле.

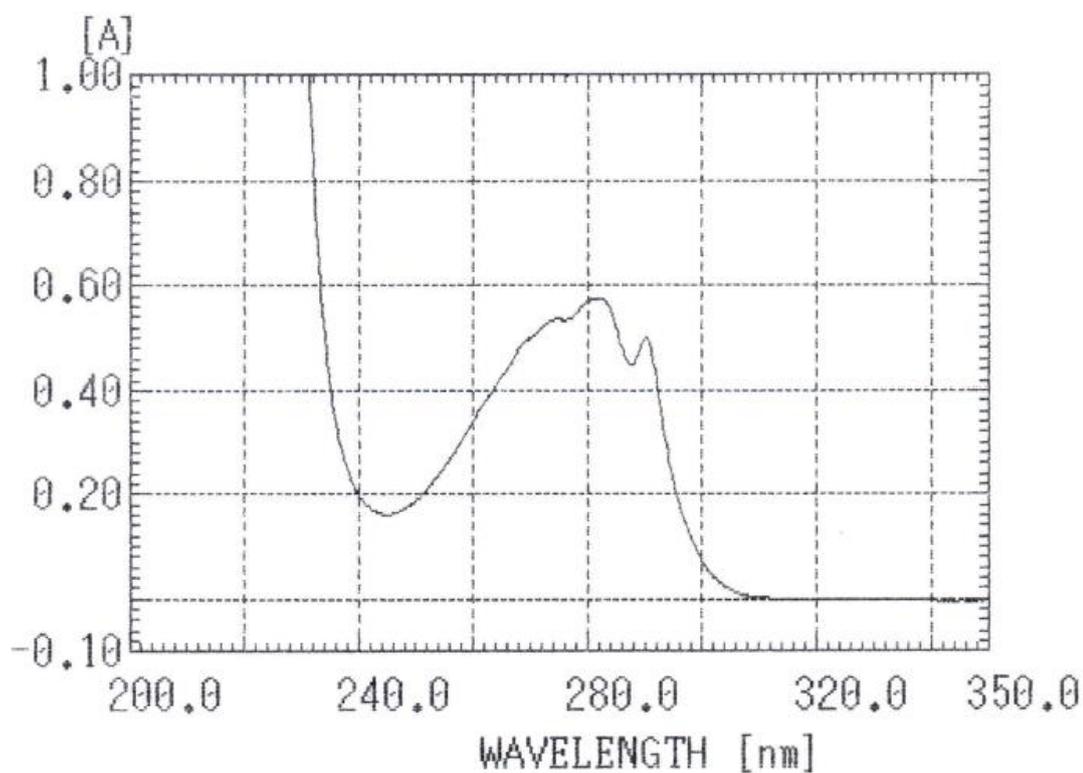


Рисунок 13. Типичный УФ-спектр 0,004% раствора ГБ-115 в этаноле

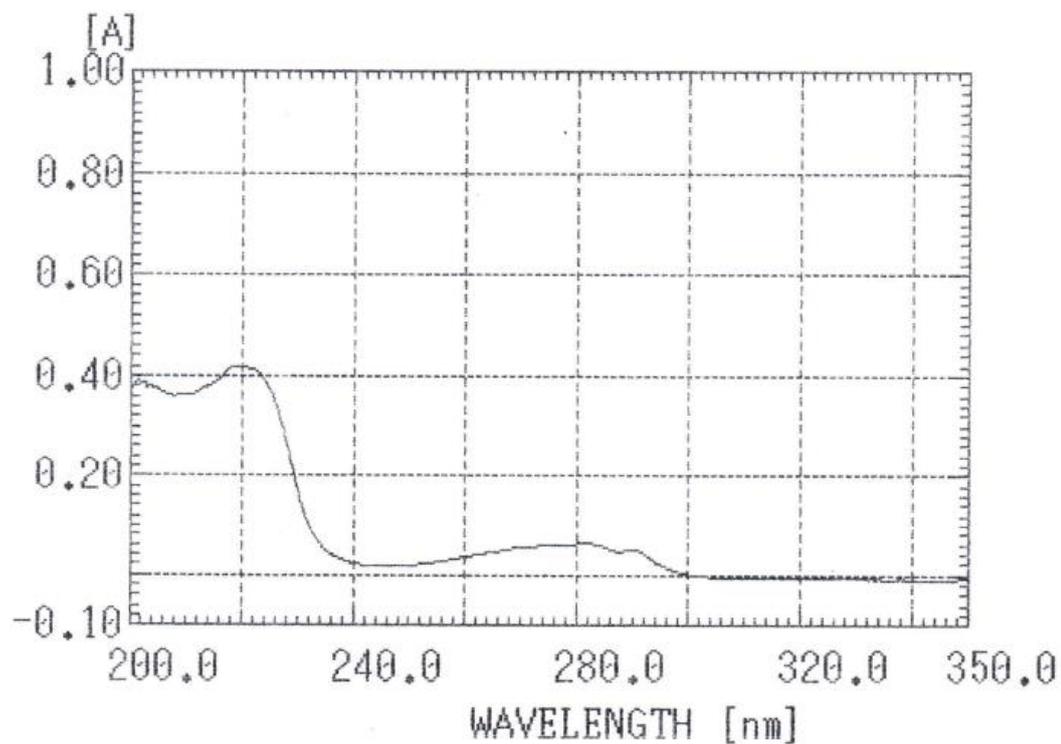


Рисунок 14. Типичный УФ-спектр 0,0004 % раствора ГБ-115 в этаноле

Так как для анализа стандартных образцов, в отличие от анализа фармакопейной субстанции необходимо введение дополнительных параметров оценки подлинности нами были предприняты попытки установления новых норм, а именно минимумов поглощения. Так как было установлено, что полученные УФ-спектры 0,004 % растворов ГБ-115 в этаноле имеют характерные максимумы поглощения при постоянных длинах волн, а именно около 290 нм, 282 нм, в свою очередь полученные УФ-спектры 0,0004 % растворов ГБ-115 имели, кроме описанных выше максимумов, дополнительный максимум при длине волны около 219 нм. Так же были установлены характерные минимумы при длинах волн около 287 нм и 245 нм. [43]

В таблице № 22 представлены основные спектральные характеристики спектров поглощения.

Таблица 22

Основные спектральные характеристики растворов стандартного образца ГБ-115 в этаноле (95%)

| Длина волны, нм | Оптическая плотность | Молярный коэффициент поглощения | Концентрация растворов |
|-----------------|----------------------|---------------------------------|------------------------|
| Максимумы | | | |
| 290±0,2 | 0,502 | 5049 | 0,004% |
| 282±0,2 | 0,567 | 5793 | |
| 219±0,2 | 0,418 | 4204 | 0,0004% |
| Минимумы | | | |
| 287±0,2 | 0,449 | 4516 | 0,004% |
| 245±0,2 | 0,161 | 1619 | |

Наличие в полученных УФ-спектрах характерных максимумов и минимумов поглощения, а также относительно высокие значения молярных показателей поглощения позволяет использовать метод УФ-спектрофотометрии для определения подлинности стандартных образцов, а также демонстрирует необходимость включения данного метода в нормативную документацию на полученные стандартные образцы. Полученные спектры 0,004% и 0,0004 % спиртовых растворов стандартных образцов должны совпадать со спектрами, представленными в нормативной документации, а также должны также определяться максимумы и минимумы поглощения и рассчитываться молярные показатели поглощения.

4.2.2. ИК-спектрометрия

Спектры исследуемых образцов снимали на ИК-спектрометре Bruker Vertex 70 (Германия), программное обеспечение OPUS 5.5. Подготовку проб осуществляли методом прессования анализируемого стандартного образца с инертным наполнителем (калия бромидом).

Полученный типичный ИК-спектр стандартного образца ГБ-115 представлен на рис. 15. Представленный ИК-спектр имеет характеристические полосы поглощения, представленные в таблице №23.

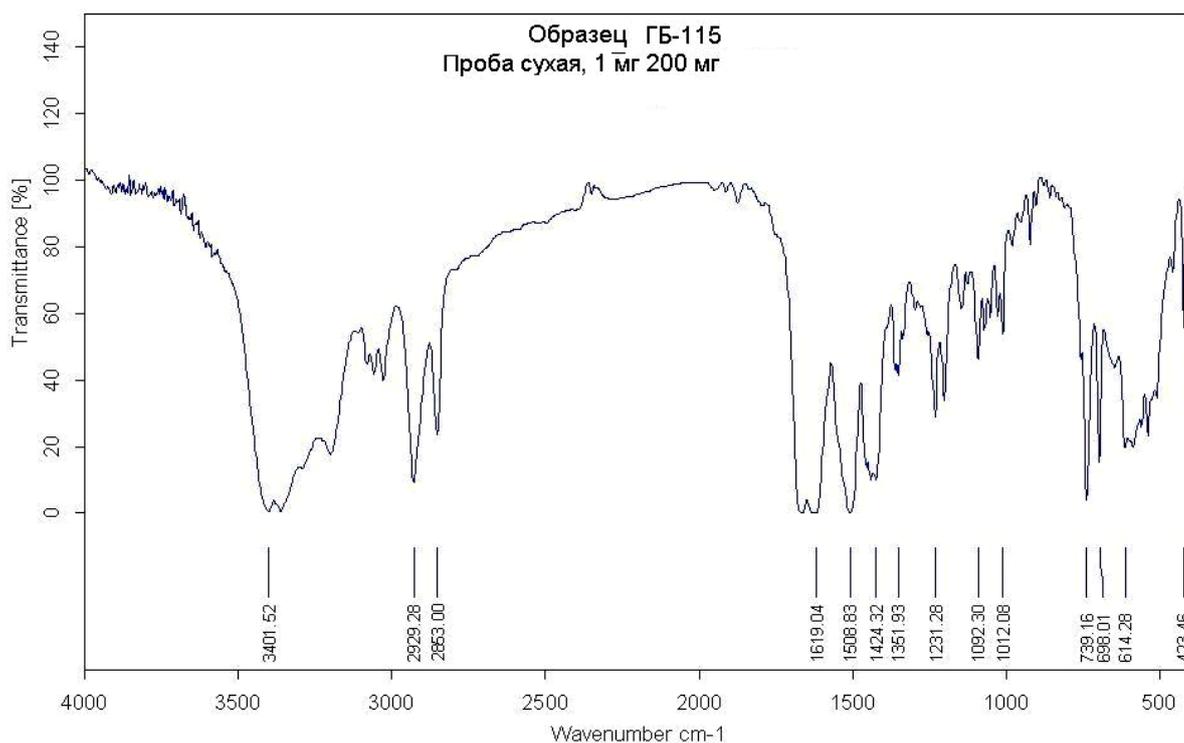


Рисунок 15. Типичный ИК-спектр стандартного образца ГБ-115

Таблица 23

Характеристические полосы поглощения ИК-спектра стандартного образца ГБ-115

| Диапазон, см^{-1} | Спектральная информация |
|----------------------------|--|
| 3402 | свободная NH_2 -группа |
| 3360, 3197 | ассоциированные NH -группы |
| 2927-2852 | валентные колебания протона в CH -группах |
| 1672, 1625 | валентные колебания $\text{C}=\text{O}$ амидных карбониллов |
| 1505 | индольный цикл |
| 1420, 1350 | колебания $\text{C}-\text{N}$ - связей (полоса Амид II) |
| 1240, 1201 | валентные колебания связи $\text{C}-\text{N}$ в амидах (амид III) |
| 738 | орто-замещение в бензольном кольце |
| 697 | деформационные колебания связи $\text{N}-\text{H}$ (в RNH_2) |

По положению и интенсивности полос поглощения ИК-спектры всех серий стандартных образцов были практически идентичны, поэтому метод ИК-спектрометрии включён в нормативную документацию в раздел «Подлинность» на полученные стандартные образцы. ИК-спектр стандартных образцов должен полностью совпадать с предложенным ИК-спектром в фармакопейной статье. Типичный ИК-спектр стандартного образца ГБ-115 представлен на рис.15.

4.2.3. ЯМР-спектроскопия

Спектры ЯМР регистрировали на приборе Bruker AM300 (300.13 МГц для ^1H и 75.47 МГц для ^{13}C) в ДМСО- d_6 (Acros, Бельгия). В ходе теоретических расчетов, обработки и интерпретации спектров использовали компьютерное программное обеспечение ACD Labs [ACD Labs 10 (сборка 18036, версия 17.01.2008)].

Подготовка образцов для регистрации спектров ЯМР ^1H и ^{13}C :

Навеску исследуемого стандартного образца ГБ-115 массой 50 мг растворяли в 0,6 мл ДМСО- d_6 и помещали в стеклянную ампулу для ЯМР-спектроскопии. При регистрации спектров ЯМР использовали стандартную одноимпульсную последовательность с последующим Фурье-преобразованием (в случае спектров ^{13}C дополнительно использовалась широкополосная протонная развязка). Химические сдвиги ЯМР-сигналов определяли относительно тетраметилсилана. Отнесение сигналов производили на основании теоретических расчетов и литературных данных с учетом интенсивности сигналов и спин-спиновых взаимодействий.

В начале исследования в соответствии с расчетными данными (рис. 16А) и имеющимися литературными описаниями было проведено сопоставление сигналов по химическим сдвигам и форме с соответствующими пронумерованными участками молекул (рис. 17). После этого на спектрах ЯМР ^1H , полученных для 3-х серий каждой субстанции, предназначенной для получения стандартного образца (рис. 16 Б) были найдены аналогичные сигналы.

Во всех случаях спектры разных серий каждого стандартного образца были практически идентичны (форма сигналов была постоянна, а колебания значений химических сдвигов не превышало 0.1 – 0.2 м.д.), при этом посторонние сигналы (кроме соответствующих синглетных сигналов диметилсульфоксида и воды при 2.52 и 3.35 м.д.) отсутствуют, что дополнительно свидетельствует об индивидуальности и чистоте полученных стандартных образцов.

ЯМР ^1H -спектр ГБ-115 (рис. 17, Б) характеризуется следующими данными: индольные NH-1 и CH-2 протоны дают синглеты при 10.82 и 7.17 м.д. в то время как группа CH-5 дает хорошо различимый дублет при 7.58 м.д. Остальные CH-протоны (6 – 8) вместе с CH-протонами 25 – 29 бензольного кольца сливаются в трудночитаемые мультиплеты в области 6.83 – 7.38 м.д. Метиленовые звенья 10 и 16 проявляются в форме двух дублет-дублетных сигналов при 2.92, 3.13 м.д. и 3.54, 3.71 м.д. соответственно, а протон CH-11 – мультиплетом при 4.43 м.д. Синглеты при 7.12 м.д. (сигнал сливается с вышеупомянутыми мультиплетами CH-групп 6 – 8, 25 – 29) и 7.42 м.д. отвечают NH_2 -группе 13. Сигналы NH-фрагментов 14 и 17 соответственно регистрируются в виде дублета при 7.90 м.д. и триплета при 8.00 м.д.. Гексановые CH_2 -группы 19 и 23 (сигнал частично сливается с сигналом CH_3 -групп диметилсульфоксида) дают триплетные сдвиги при 2.07 и 2.52 м.д., группы 20, 22 дают мультиплет при 1.47 м.д., а CH_2 -21 – мультиплет при 1.22 м.д.

На втором этапе проведения исследований были проведены предварительные компьютерные расчеты спектров ЯМР ^{13}C ГБ-115 (рис. 18А), а затем получены реальные спектры (рис. 18Б) на примере одной субстанции из каждой серии, после чего проведено точное отнесение сигналов. Посторонних сигналов (кроме сигналов ДМСО в интервале 38 – 41 м.д.) на полученных спектрах не обнаружено.

Индольный структурный компонент на спектре ЯМР ^{13}C субстанции ГБ-115 (рис. 5Б) дает характерные сигналы в интервале 109 – 137 м.д.: 123.41 м.д. (CH-2), 110.07 м.д. (C-3), 127.36 м.д. (C-4), 118.17 м.д. (CH-5), 118.33 м.д. (CH-6), 120.74

м.д. (СН-7), 111.18 м.д. (СН-8), 136.01 м.д. (С-9). Сигналы при 27.61, 42.15 и 53.14 м.д. отвечают СН₂-10, СН₂-16 и СН-11. Кето-группы 12, 15 и 18 резонируют в сильном поле при 173.26, 168.72 и 172.61 м.д. соответственно. Атомы углерода алкильной цепи резонируют в слабом поле в узком диапазоне 24 – 36 м.д.: 34.96 м.д. (СН₂-19), 24.92 м.д. (СН₂-20), 28.24 м.д. (СН₂-21), 30.65 м.д. (СН₂-22), 35.04 (СН₂-23). Бензольное кольцо дает два высокоинтенсивных близко расположенных сигнала при 128.11 м.д. (СН-25, СН-29) и 128.17 м.д. (СН-26, СН-28), а также два менее интенсивных сигнала при 141.21 и 125.49 м.д., отвечающих С-24 и СН-27.

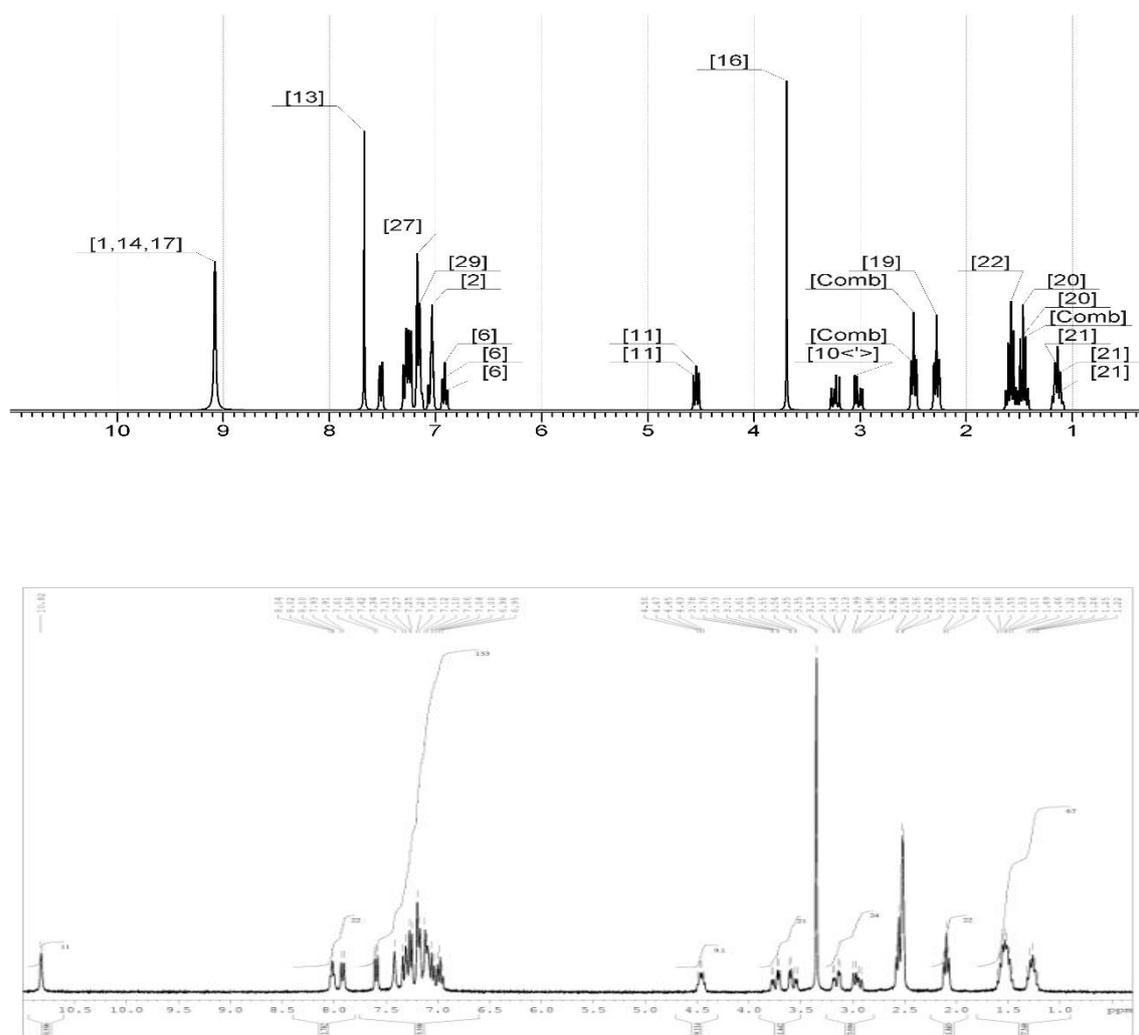


Рисунок 16. Спектры ЯМР ¹H ГБ-115 в DMSO-d₆. А – рассчитанный спектр, Б – полученный

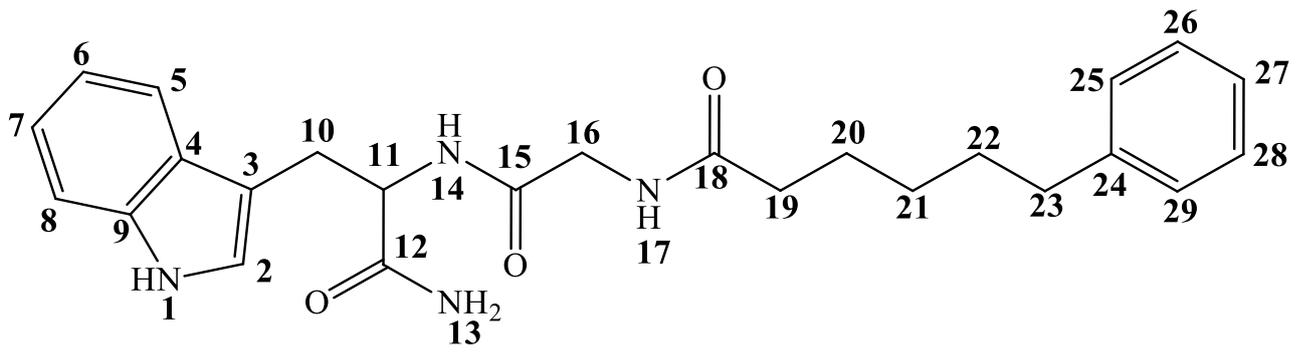
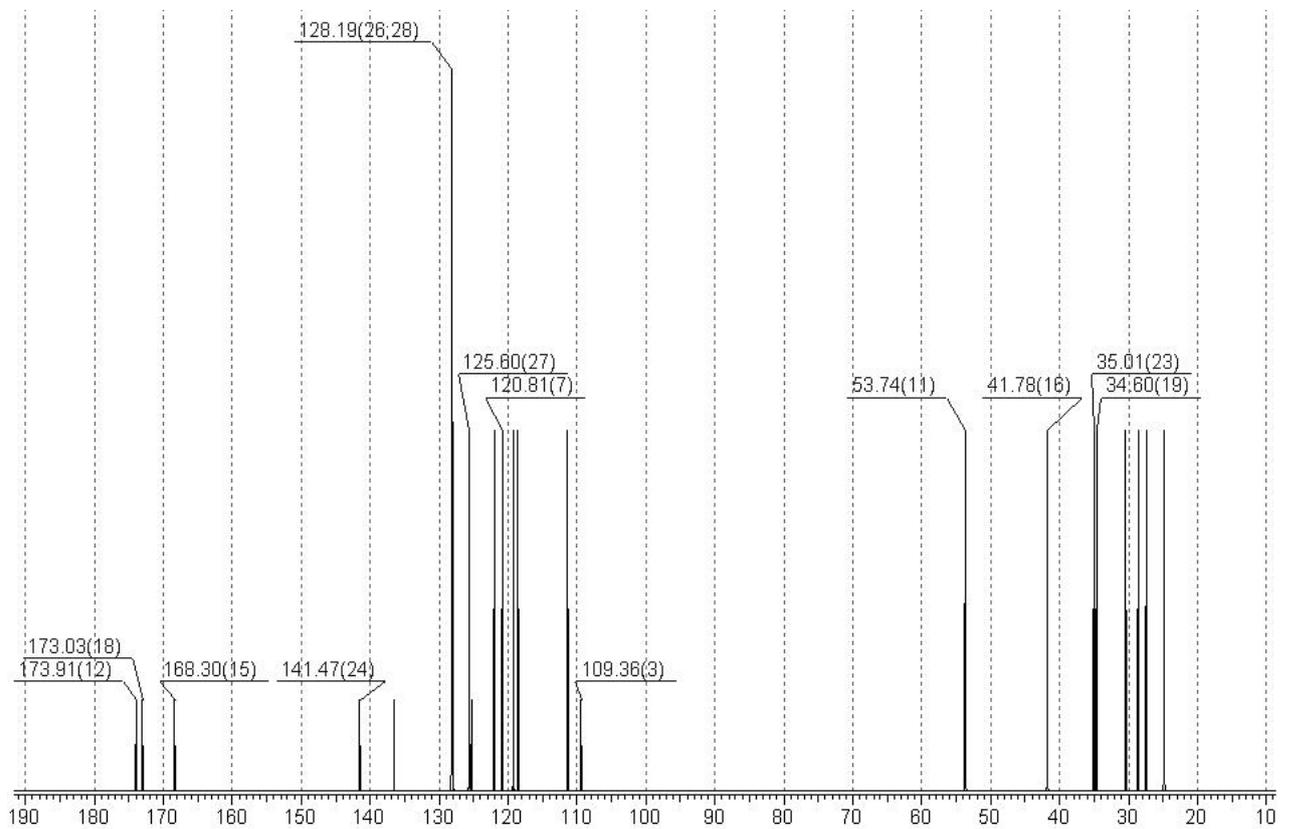


Рисунок 17. Структурная формула ГБ-115 (нумерация последовательная)



A

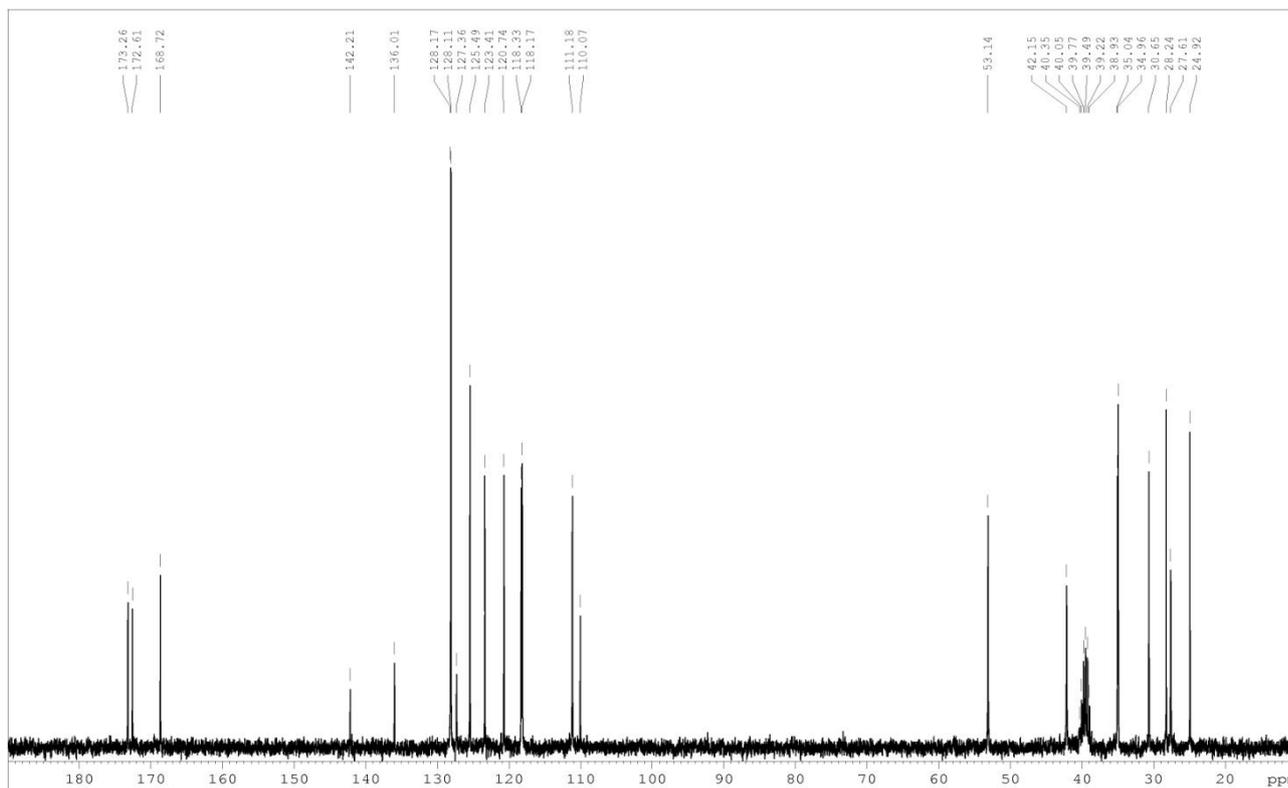


Рисунок 18. Спектры ЯМР ^{13}C ГБ-115 в DMSO-d₆. А – рассчитанный, Б – полученный

Таким образом представленные типичные спектры и их описание для исследуемых стандартных образцов необходимы для включения в нормативную документацию в раздел «Подлинность». Полученный спектр ЯМР ^{13}C ГБ-115 должен соответствовать рисунку и сигналам, представленным в нормативной документации.

4.3. Хроматографические методы для контроля качества стандартных образцов ГБ-115

Хроматографическая подвижность и чистота полученных стандартных образцов ГБ-115, исходных и промежуточных продуктов синтеза была изучена с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Определение остаточных органических растворителей в стандартных образцах проведено методом газо-жидкостной хроматографии.

4.3.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе образцов ГБ-115

Согласно литературным данным поглощение примесей и ГБ-115 в области длин волн от 200 нм до 230 нм выше, чем в интервале от 250 нм до 300 нм (рис. 13-14) [43]. Кроме того, в диапазоне длин волн 200-230 нм наблюдается совпадение максимумов поглощения ГБ-115 и примесей, поэтому детектирование посторонних примесей было решено проводить при длине волны 215 нм.

В оценке посторонних примесей была использована описанная ранее методика, разработанная сотрудниками ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова» [43].

Получают не менее пяти хроматограмм каждого из растворов. На рис. 18 представлена типичная хроматограмма испытуемых стандартных образцов.

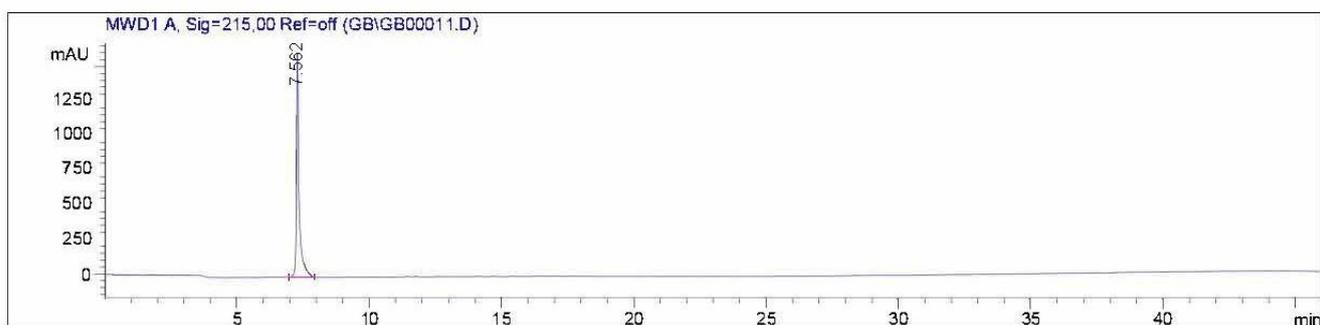


Рисунок 18. Типичная ВЭЖХ-хроматограмма стандартного образца ГБ-115

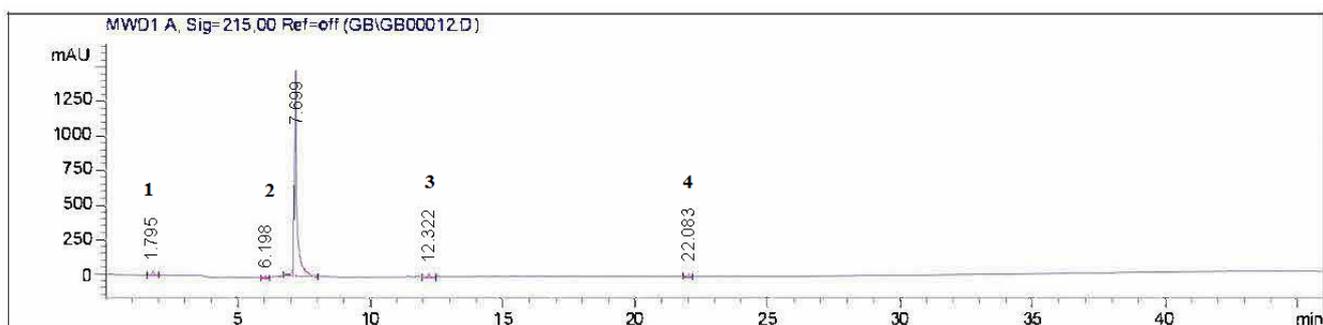


Рисунок 19. ВЭЖХ-хроматограмма модельной смеси примесей в системе ацетонитрил: вода с pH=3,15 (400: 450), длина волны детектора – 215 нм (1 – ТХ, 2 – ФГГ, 3 – ФГК, 4 – ГБ-111)

Таблица 24

Результаты валидации по показателю «Селективность»

| Длина волны детектора | Скорость потока подвижной фазы, мл/мин | Среднее процентное содержание аналита в испытуемом растворе, от заданного количества | Среднее значение [%] |
|-----------------------|--|--|----------------------|
| 210 | 0,9 | 97,5 | 98,45 |
| | 1,1 | 99,4 | |
| 220 | 0,9 | 98,3 | 99,20 |
| | 1,1 | 100,1 | |

На хроматограммах, полученных при введении образца подвижной фазы, отсутствуют пики с временами удерживания, соответствующими ГБ-115 и возможным примесям, что говорит о селективности метода.

| | |
|--|-------|
| <i>Средняя величина x</i> | 98,45 |
| <i>Стандартное отклонение s_x</i> | 1,153 |
| <i>Относительное стандартное отклонение</i> | 1,167 |

Устойчивость

Устойчивость, или робастность, системы испытывали при незначительном изменении параметров методики количественного определения. В данном случае Меняли длину волны детектора и скорость потока подвижной фазы.

Критерии допуска коэффициент вариации $\leq 3\%$ выполнен. Устойчивость метода удовлетворительная.

4.3.2. Газо-жидкостная хроматография в анализе стандартных образцов ГБ-115

Стандартные образцы ГБ-115 получают путем кристаллизации из этилового спирта при соотношении 1,6-1,7 с обработкой активированным углем. Таким образом этот растворитель может присутствовать в фармакопейной субстанции ГБ-115 и его необходимо контролировать в разрабатываемых стандартных образцах.

Нами разработана газохроматографическая методика определения остаточных органических растворителей с применением статического парофазного метода ГХ- HS на газовом хроматографе, снабженным HS-устройством для отбора проб (дозатором равновесного пара). В таблице № 25 представлены условия хроматографирования, в таблице № 26 параметры статического пробоотборника-HS.

Таблица 25

Хроматографические условия проведения анализа стандартных образцов ГБ-115

| | |
|--|--|
| Детектор | Пламенно-ионизационный детектор (ПИД). |
| Температура детектора | 230 °С |
| Температура инжектора | 210°С |
| Температура термостата колонки в режиме программирования | Начальная температура 40°С в течение 4 мин., затем повышение температуры со скоростью 15°С/мин. до 200°С и удерживается в течение 5 мин. |
| Газ носитель (азот) | Скорость потока 4,9 мл/мин. |
| Сплит-система | Деление потока 1:5 |

| | |
|---------|-------------------------------|
| Водород | Скорость потока - 30 мл/мин. |
| Воздух | Скорость потока - 300 мл/мин. |

Таблица 26

Параметры статического парофазного пробоотборника

| | |
|--|---------|
| Температура head space виалы | 85 оС |
| Время термостатирования (уравновешивания) head space виалы | 40 мин. |
| Температура линии переноса | 135 оС |
| НС-давление (давление наддува виалы) | 0,7 Мпа |
| Время нагнетания (подачи под давлением) | 5 мин. |
| Время отбора пробы | 10 сек |
| Объём вводимой дозы равновесного пара | 1 ,0 мл |

Методика проведения анализа.

Для оценки содержания остаточного этанола в стандартных образцах ГБ-115 предложен метод внутреннего стандарта. Внутренним стандартом был выбран н-пропиловый спирт, раствором сравнения – диметилсульфоксид.

1. Приготовление стандартных и испытуемых растворов.

1. Приготовление раствора внутреннего стандарта: в мерную колбу вместимостью 100 мл отмеривали 20 мл диметилсульфоксида, далее во взвешенную колбу помещали около 0,5 г (точная навеска) н-пропилового спирта, доводили объем раствора в колбе диметилсульфоксидом до метки, перемешивали

(раствор А). 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки тем же растворителем, перемешивали (раствор Б). Концентрация раствора внутреннего стандарта 0,5 мг/мл.

2. Приготовление раствора для определения поправочного коэффициента (раствор В): около 0,5 г (точная навеска) этанола и около 0,5 г (точная навеска) н-пропилового спирта помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, наполненную наполовину диметилсульфоксидом, доводили объем раствора в колбе до метки тем же растворителем, перемешивали. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора в колбе до метки тем же растворителем, перемешивали. Концентрации обоих веществ в растворе 0,5 мг/мл.

3. Приготовление раствора для проверки пригодности хроматографической системы (раствор С): около 0,05 г (точная навеска) этанола и около 0,05 г (точная навеска) н-пропилового спирта помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, наполненную наполовину диметилсульфоксидом, доводили объем раствора в колбе до метки тем же растворителем, перемешивали. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивали. Концентрации обоих веществ в растворе 0,05 мг/мл.

4. Контрольный раствор: 2,0 мл диметилсульфоксида помещали в head space виалу вместимостью 10 мл, герметично закупоривают крышками с тефлоновыми прокладками и обжимают горловины виал алюминиевыми крышками.

5. Приготовление испытуемых растворов стандартных образцов ГБ-115: около 0,2 (точная навеска) субстанции, предназначенной для получения стандартного образца, помещали в виалы для парофазной экстракции, прибавляли 2 мл раствора Б, перемешивали.

Растворы используют свежеприготовленными.

II. Проверка пригодности хроматографической системы.

В автоматическом режиме в указанных условиях (Таблицы № 18-19) в дозатор хроматографа вводится парогазовая фаза раствора С (раствора для проверки пригодности хроматографической системы) в объеме 1,0 см³. Раствор С хроматографируют последовательно в 6 повторностях. На хроматограммах регистрируют пики этанола и н-пропанола. Результаты определения считаются действительными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы»:

- порядок выхода пиков растворителей:

1- этанол; 2- н- пропанол; 3- диметилсульфоксид.

- эффективность колонки, рассчитанная по пику этанола, должна быть не менее 5 000 теоретических тарелок;

- разрешение между пиками этанола и н-пропанола должно быть не менее 2,0;

- коэффициент асимметрии каждого пика должен быть не более 1,5;

- относительное стандартное отклонение площади пика этанола (RSD)- не более 10,0%.

На рис. 20 представлена типичная хроматограмма раствора ППХС со следующими параметрами:

- время выхода пика этанола - 3,046 мин.;

- время выхода пика н-пропанола - 5,203 мин.;

- относительное время выхода этилацетата – 0,62;

- разрешение (n, n+1) – 12,53;

- асимметрия пика этанола - 1,04;

- число теоретических тарелок по пику этанола (ТТ) – 5320;

- относительное стандартное отклонение по площади пика этилацетата (RSD)- 9,13%.

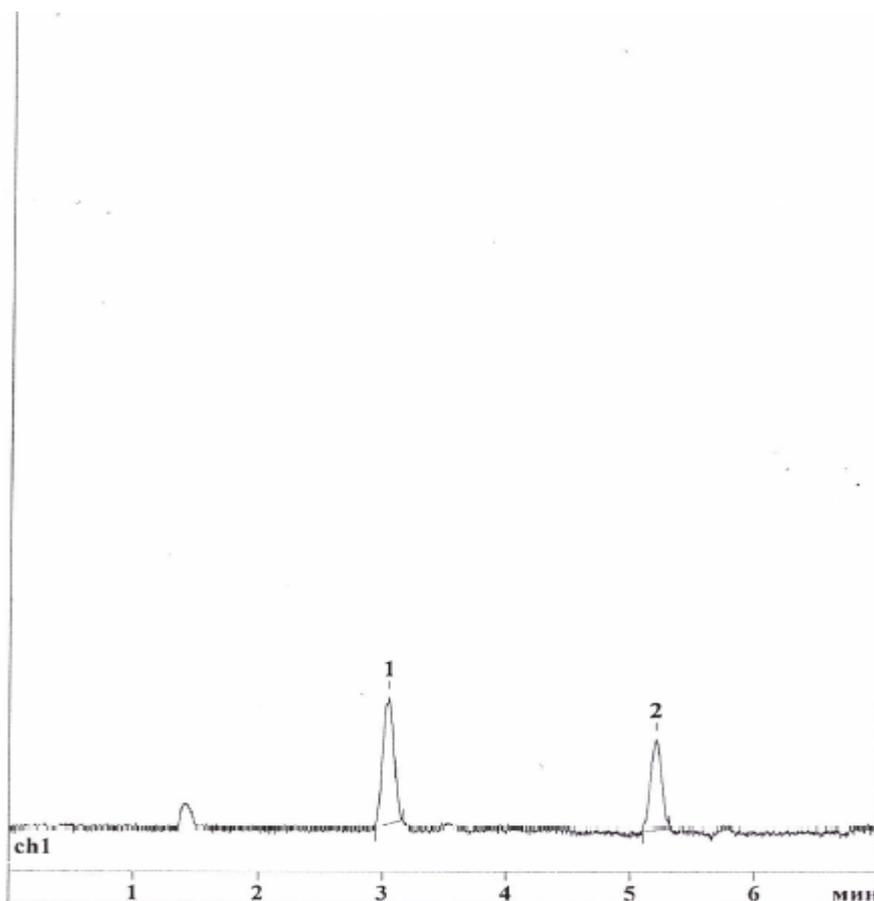


Рисунок 20. Типичная ГЖХ-хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы
(1- этанол; 2- н- пропанол)

Относительное стандартное отклонение площадей пика этанола (RSD) по 6 последовательным введениям раствора для проверки пригодности хроматографической системы рассчитывали с помощью программы Excel по данным, представленным в таблице № 27.

Таблица 27

Расчет относительного стандартного отклонения площадей пика этанола (RSD) в растворе для проверки пригодности хроматографической системы

| Файл хроматограммы | Площадь пика этанола, mV*сек |
|--|------------------------------|
| ZB230955.chw | 5,16 |
| ZB231031.chw | 4,73 |
| ZB231056.chw | 5,29 |
| ZB231138.chw | 4,87 |
| ZB231206.chw | 4,69 |
| ZB231237.chw | 4,82 |
| ZB231315.chw | 4,51 |
| | |
| <i>Среднее значение площади пика</i> | <i>4,87</i> |
| <i>Дисперсия</i> | <i>0,074</i> |
| <i>Стандартное отклонение</i> | <i>0,445</i> |
| <i>Относительное стандартное отклонение (RSD), %</i> | <i>9,13%</i> |

После проведения процедуры проверки пригодности хроматографической системы в описанных выше хроматографических условиях последовательно хроматографируют контрольный раствор, испытуемый раствор и стандартный раствор В. Были исследованы 3 различные серии стандартных образцов ГБ-115 для количественной оценки содержания в них остаточного органического

растворителя - этанола. Каждый стандартный раствор и каждый из испытуемых растворов каждой серии готовился в трех повторностях.

На рис.21 представлена типичная ГЖХ-хроматограмма стандартного раствора В.

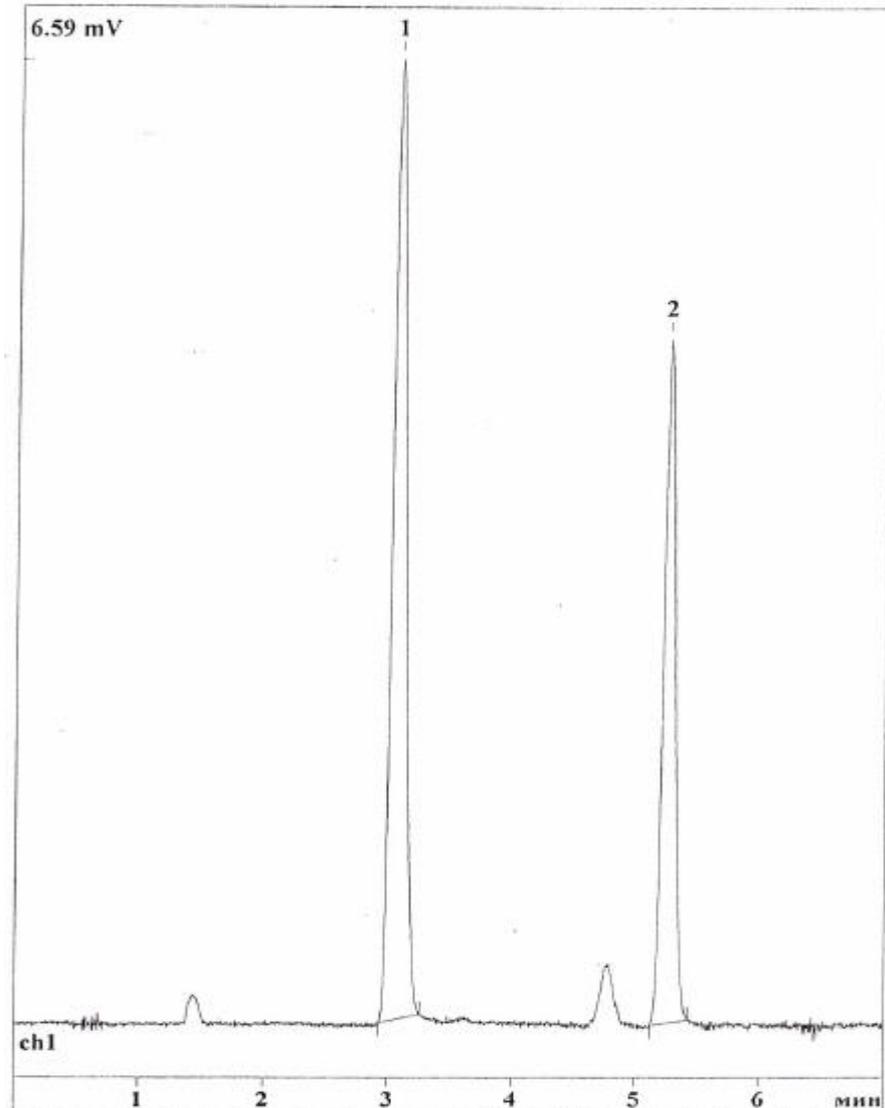


Рисунок 21. Типичная ГЖХ-хроматограмма стандартного раствора В
(1- этанол; 2- н- пропанол)

На рис.22 представлена типичная ГЖХ-хроматограмма исследуемых стандартных образцов ГБ-115.

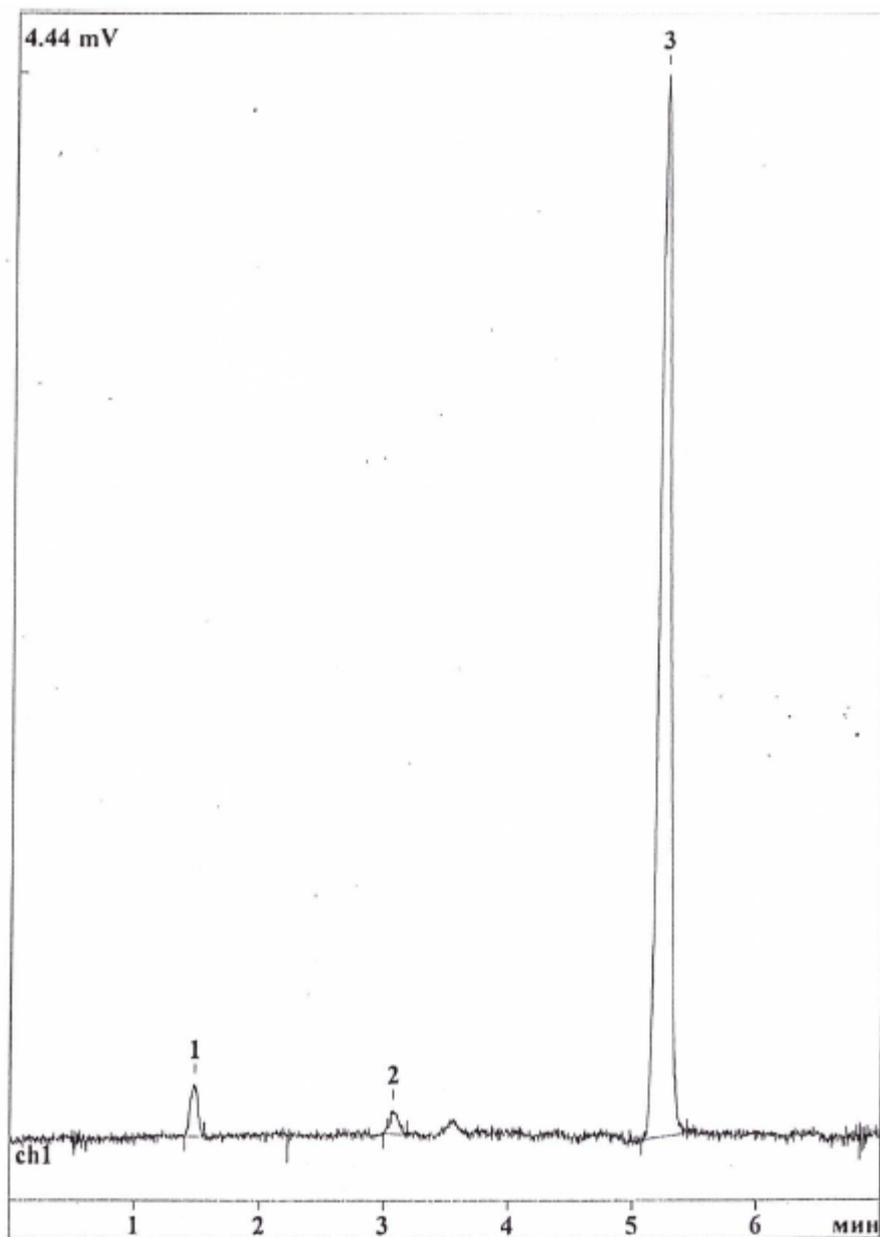


Рисунок 22. Типичная ГЖХ-хроматограмма испытуемого образца ГБ-115

(1- этанол; 2- н- пропанол; 3- диметилсульфоксид)

По полученным хроматограммам рассчитывали количественное содержание этанола в 3-х испытуемых сериях *ГБ-115* двумя альтернативными способами.

а. *Обработка полученных результатов с помощью компьютерной программы МультиХром для Windows версия 1.5.*

Для этого из раствора В, содержащего одинаковые концентрации этанола и н-пропанола (0,5 мг/мл), готовили 5 калибровочных растворов с концентрациями каждого из веществ 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 мг/мл. Каждый из калибровочных растворов хроматографировали 6 раз, вычисляя средние значения площадей, уравнение калибровочного графика и коэффициент корреляции R^2 . Калибровочный график (на рис.23) линеен в этом диапазоне концентраций и описывался уравнением:

$Y = 0,0104x - 0,0002$, где x - площадь пика этанола.

Коэффициент корреляции $R^2 = 0,9997$.

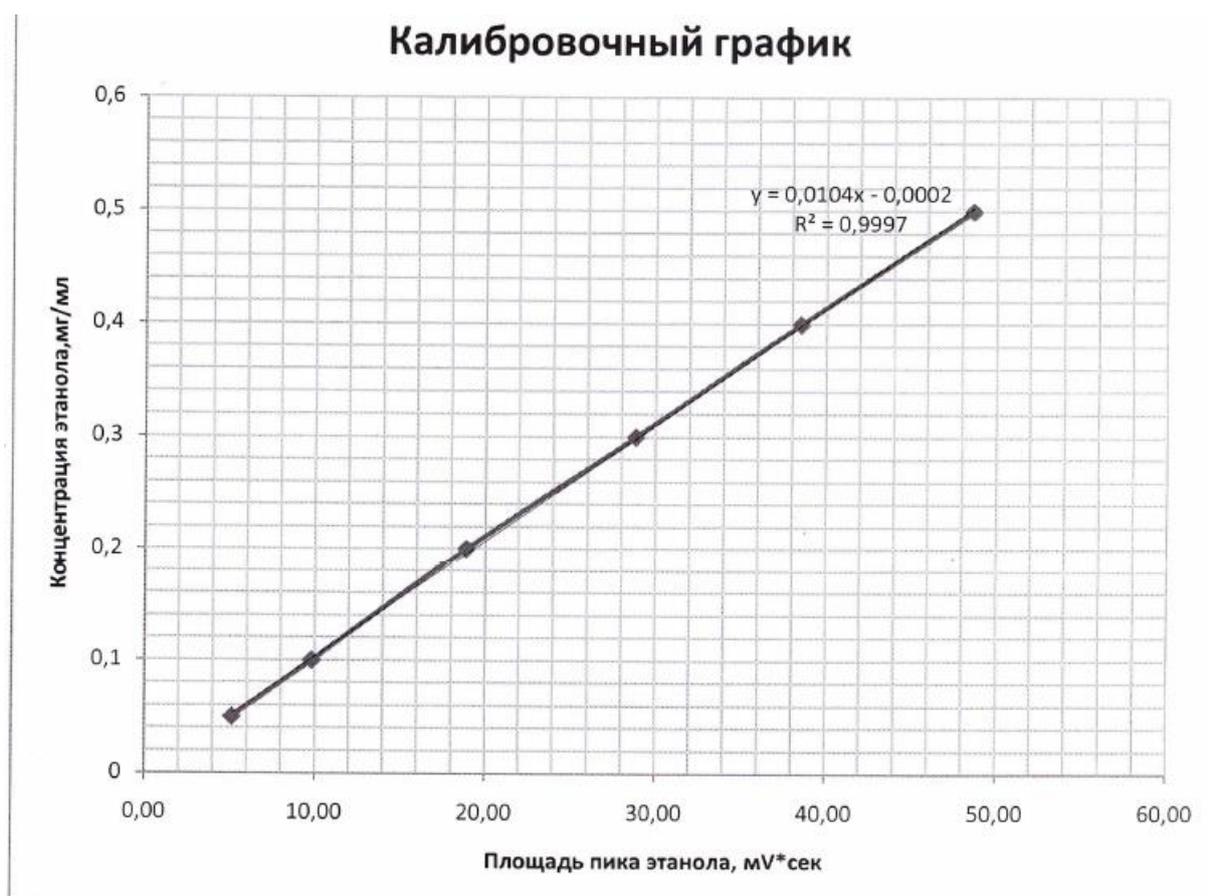


Рисунок 23. Калибровочный график для определения этанола в стандартных образцах ГБ-115 методом ГЖХ

б. Количественный расчет по формуле.

Содержание этанола в процентах ($X_i\%$) рассчитывали по формуле:

$$X_i\% = \frac{A_{\text{исп.}} \times C_{\text{ст}} \times V \times 100 \times 10}{A_{\text{ст}} \times m_{\text{исп.}}} = \frac{A_{\text{исп.}} \times 0,05 \times 2}{K \times 0,2}$$

где $A_{\text{исп.}}$ – отношение площадей пиков этанола и внутреннего стандарта (н-пропанола) на хроматограмме испытуемого раствора;

$A_{\text{ст}} = K$ – поправочный коэффициент (отношение площадей пиков этанола и н-пропанола на хроматограмме стандартного раствора В). Для этанола $K = 1,63$.

$C_{\text{ст}}$ – концентрация этанола в стандартном растворе В, %;

$m_{\text{исп}}$ – масса навески анализируемой пробы, г;

V – Объем растворителя (диметилсульфоксида), взятый для растворения анализируемой пробы, мл.

Результаты определения содержания этанола в стандартных образцах ГБ-115 представлены в Таблице 28.

Таблица 28

Содержания этанола (%) в стандартных образцах ГБ-115

| № п/п | Номер серии | Содержания этанола, % ± RSD |
|-------|-------------|-----------------------------|
| 1. | I | 0,052 ± 0,014 |
| 2. | II | 0,078 ± 0,011 |
| 3. | III | 0,062 ± 0,013 |

Селективность

На хроматограммах, полученных при введении ДМСО без содержания этанола и н-пропанола, наблюдается единичный пик с временем удерживания, соответствующим ДМСО; прочие пики отсутствуют, что говорит о селективности метода.

Линейность

С целью оценки линейности методики осуществлялось построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика готовили калибровочные модельные смеси. Готовили 5 калибровочных образцов, содержащие 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 мг/мл этанола соответственно и 0,1 мг/мл внутреннего стандарта – н-пропанола. Проводили анализ калибровочных образцов, и по полученным данным строили калибровочный график с помощью программы Microsoft Excel 2010. Оценивали зависимость концентрации этилацетата в калибровочном образце (ось X) от отношения площади хроматографического пика этанола к площади хроматографического пика внутреннего стандарта. При этом определяли характер зависимости, тип аппроксимации, достоверность аппроксимации и коэффициенты соответствующего уравнения регрессии. Представленные данные свидетельствуют о том, что для определяемого вещества калибровочные графики описываются линейной функцией с высоким показателем достоверности аппроксимации. Коэффициент корреляции составил 0,99965, что соответствует требованиям НД (не менее 0,999).

Был выполнен расчёт концентраций этанола по уравнению калибровочной зависимости, после чего полученные результаты сравнивались с фактическими, а затем были рассчитаны значения относительной погрешности.

Таблица 29

Концентрации этанола по уравнению калибровочной зависимости

| $C_{\text{факт}}$, мг/мл | | 0,05 | 0,1 | 0,2 | 0,3 | 0,4 |
|---------------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| Калибровочная кривая № 1 | Отношение площади пика этанола к площади пика ВС | 0,0716 | 0,1262 | 0,2411 | 0,3479 | 0,4688 |
| | $C_{\text{расчит}}$, мг/мл | 0,051 | 0,099 | 0,201 | 0,296 | 0,403 |
| | ε , % | 2,15 | -0,59 | 0,56 | -1,45 | 0,67 |

Полученные значения относительной погрешности соответствуют требованиям НД (не более 5%).

Правильность и прецизионность

Оценку показателей правильности и прецизионности осуществляли путём исследования образцов контроля качества (3 независимых образца каждой концентрации). Правильность и прецизионность определяли в течение 1 рабочего дня (внутри серии) и в течение нескольких дней (между сериями). Расчёт концентраций определяемых веществ в образцах контроля качества выполняли по уравнению калибровочного графика, полученного в составе текущей аналитической серии.

Таблица 30

Результаты оценки правильности и прецизионности методики (внутри серии)

| введено (мг/мл) | найдено (мг/мл) | найдено (мг/мл), среднее значение (n=5) | S.D. (n=5) | RSD, % (n=5) | ε , % | Критерий приемлемости |
|-----------------|-----------------|---|------------|--------------|-------------------|----------------------------------|
| 0,05 | 0,048 | 0,0479 | 0,002 | 3,33 | 4,20 | RSD < 5%, ε < 5%, |
| | 0,050 | | | | | |

| | | | | | | |
|-----|-------|--------|-------|-------------|-------------|----------------------------------|
| | 0,049 | | | | | |
| | 0,046 | | | | | |
| | 0,047 | | | | | |
| 0,2 | 0,208 | 0,2077 | 0,003 | 1,46 | 3,85 | RSD < 5%, ε < 5%, |
| | 0,207 | | | | | |
| | 0,211 | | | | | |
| | 0,210 | | | | | |
| | 0,203 | | | | | |
| 0,4 | 0,418 | 0,4087 | 0,006 | 1,56 | 2,17 | RSD < 5%, ε < 5%, |
| | 0,407 | | | | | |
| | 0,405 | | | | | |
| | 0,413 | | | | | |
| | 0,402 | | | | | |

Таблица 31

Результаты оценки правильности и прецизионности методики (между 2-мя сериями)

| введено (мг/мл) | найдено (мг/мл) | найдено (мг/мл), среднее значение (n=10) | S.D. (n=10) | RSD, % (n=10) | ε , % | Критерий приемлемости |
|--------------------|--------------------|--|----------------|---------------------|-------------------|--------------------------|
| 0,1 | 0,048 | 0,0477 | 0,001 | 3,10 | 4,59 | |
| | 0,050 | | | | | |

| | | | | | | |
|-----|-------|--------|-------|-------------|-------------|------------------------------------|
| | 0,049 | | | | | |
| | 0,046 | | | | | RSD < 5%, |
| | 0,047 | | | | | $\varepsilon < 5\%$, |
| | 0,049 | | | | | |
| | 0,048 | | | | | |
| | 0,047 | | | | | |
| | 0,045 | | | | | |
| | 0,048 | | | | | |
| 0,2 | 0,208 | 0,2068 | 0,004 | 2,07 | 3,40 | RSD < 5%, $\varepsilon < 5\%$, |
| | 0,207 | | | | | |
| | 0,211 | | | | | |
| | 0,210 | | | | | |
| | 0,203 | | | | | |
| | 0,209 | | | | | |
| | 0,212 | | | | | |
| | 0,208 | | | | | |
| | 0,198 | | | | | |
| | 0,203 | | | | | |
| 0,4 | 0,418 | 0,4064 | 0,006 | 1,46 | 1,59 | RSD < 5%, $\varepsilon < 5\%$, |
| | 0,407 | | | | | |
| | 0,405 | | | | | |
| | 0,413 | | | | | |
| | 0,402 | | | | | |

| | | | | |
|-------|--|--|--|--|
| 0,412 | | | | |
| 0,405 | | | | |
| 0,401 | | | | |
| 0,399 | | | | |
| 0,403 | | | | |

Правильность и прецизионность методики соответствуют требованиям НД (не более 5 %).

Устойчивость, или робастность, системы испытывали при незначительном изменении параметров методики определения. В данном случае меняли температуру детектора и скорость потока газа-носителя.

Таблица 32

Результаты по показателю «Устойчивость»

| Температура детектора | Скорость потока газа-носителя, мл/мин | Среднее процентное содержание аналита в испытуемом растворе, от заданного количества | Среднее значение [%] |
|-----------------------|---------------------------------------|--|----------------------|
| 220 | 4,7 | 98,1 | 98,50 |
| | 5,1 | 98,9 | |
| 240 | 4,7 | 101,4 | 100,35 |
| | 5,1 | 99,3 | |

| | |
|--|-------|
| Средняя величина \bar{x} | 99,43 |
| Стандартное отклонение s_x | 1,408 |
| Относительное стандартное | 1,416 |

Критерии допуска коэффициент вариации $\leq 3\%$ выполнен. Устойчивость метода удовлетворительная.

Контроль качества стандартных образцов ГБ-115 необходимо проводить по показателю «Остаточные органические растворители» с помощью метода ГЖХ. Норма – содержание этанола не более 0,1%.

4.4. Количественное определение стандартных образцов ГБ-115 методом Кьельдаля

Содержание ГБ-115 в стандартном образце (X%) рассчитывают по формуле:

$$X\% = \frac{(V_1 - V_2) \times 0,001401 \times K \times 434,52}{m_{\text{нав}} \times 56} \times 100\%$$

где

V_1 – объем кислоты хлористоводородной, пошедший на титрование испытуемого раствора, мл

V_2 - объем кислоты хлористоводородной, пошедший на титрование контрольного раствора, мл

56 – молекулярная масса азота, входящего в состав ГБ-115

434,52 – молекулярная масса ГБ-115

$m_{\text{нав}}$ – масса навески ГБ-115, г

1 мл кислоты хлористоводородной соответствует 0,001401 г азота.

Результаты количественного определения ГБ-115 методом Кьельдаля представлены в таблице 33.

Таблица 33

Результаты количественного определения стандартных образцов ГБ-115

| Номер серии | Количественное содержание, % | | | | | Среднее Значение, % |
|----------------|--|-------|-------|-------|--------|---------------------------|
| | | | | | | |
| I | 99,91 | 99,65 | 99,90 | 99,81 | 100,20 | 99,73 |
| II | 100,10 | 99,76 | 99,83 | 99,70 | 99,88 | 99,86 |
| III | 99,87 | 99,96 | 99,81 | 99,90 | 99,91 | 99,87 |
| | | | | | | |
| I | $n=5, \Delta x=99,73 \ s=0,272 \ \Delta\Delta x=0,34 \ (P=0,95)$ $\Delta x \pm \Delta\Delta x=99,73 \pm 0,34$, Доверит интервал $ср = 0,341\%$ | | | | | |
| II | $n=5, \Delta x=99,86 \ s=0,154 \ \Delta\Delta x=0,19 \ (P=0,95)$ $\Delta x \pm \Delta\Delta x=99,86 \pm 0,19$ Доверит интервал $ср = 0,19\%$ | | | | | |
| III | $n=5, \Delta x=99,87 \ s=0,06 \ \Delta\Delta x= 0,075 \ (P=0,95)$ $\Delta x \pm \Delta\Delta x=99,87 \pm 0,075$ Доверит интервал $ср = 0,075\%$ | | | | | |

Из результатов проведенного анализа стандартных образцов видно, что содержание ГБ-115 колеблется от 99,65 до 100,20 %. Результаты могут быть связаны с погрешностью самого метода количественного определения. Таким образом была установлена норма количественного содержания ГБ-115 в стандартных образцах не менее 99,5% и не более 100,5%.

Метод Кьельдаля является фармакопейным методом анализа, поэтому проведение его валидации не требуется, согласно требованиям ИСН.

4.5. Установление показателей качества и норм для стандартных образцов ГБ-115

После проведения полного фармакопейного анализа изучаемых стандартных образцов, могут быть сформулированы показатели качества, необходимые для включения в нормативную документацию, а также могут быть установлены нормы. Показатели качества и нормы для изучаемых стандартных образцов представлены в таблице № 34.

Таблица 34

Спецификация контроля качества стандартных образцов ГБ-115

| Показатели и методы | Результаты | | | Установленные норма качества для субстанции | Установленные нормы качества для СО |
|--|---|----|-----|---|---|
| | I | II | III | | |
| Описание Визуально | Белый или белый с кремоватым или желтоватым оттенком кристаллический порошок. | | | | |
| Растворимость ГФ XIII, Том 1, стр. 531 (ОФС.1.2.1.0005.15) | Практически нерастворим в воде, очень мало растворим в ацетоне, мало растворим в этаноле 95%, легко растворим в диметилсульфоксиде. | | | | |
| Подлинность | | | | | |
| УФ-спектрофотометрия | | | | 0,05% раствор в спирте в области от 250 | 0,04% раствор в спирте в области от 250 до 350 нм |

| | | | |
|---|--|--|---|
| | | до 350 нм должен иметь 2 максимума поглощения при 282±2нм и 290±2нм | должен иметь 2 максимума поглощения около 282±2нм и 290±2нм, а также минимум около 287±0,2. |
| ИК-спектрометрия | | ИК-спектр стандартного образца должен совпадать с ИК- спектром на прилагаемом рисунке. | ИК-спектр стандартного образца должен совпадать с ИК- спектром на прилагаемом рисунке. |
| ЯМР ¹³ С спектроскопия | | Показатель отсутствует | ЯМР-спектр стандартного образца должен совпадать с ЯМР-спектром прилагаемого рисунка. |
| Прозрачность ГФ XIII, Том 1, стр. 542 | Раствор 0,5 г препарата в 10 мл этилового спирта должен быть прозрачным | Прозрачный или не более эталонного раствора I (5 % раствор в этаноле) | Раствор 0,5 г препарата в 10 мл этилового спирта должен быть |

| | | | | | |
|--|--|---------------------|-----------------|---|---|
| (ОФС.1.2.1.0007.15) | | | | | прозрачным |
| Цветность ГФ XIII, Том 1, стр. 545 (ОФС.1.21.0008.15) | Раствор, приготовленный для теста «Прозрачность», должен быть бесцветным | | | Бесцветный или не более GY6 (5 % раствор в этаноле) | Раствор, приготовленный для теста «Прозрачность», должен быть бесцветным |
| Температура плавления, °С ГФ XIII, Том 1, стр. 560 (ОФС.1.2.1.0011.15) | 177- 178 | 177,5 - 178,5 | 177,5- 179,0 | От 177,0 до 182,0 | От 177 до 179 с разложением |
| Удельное вращение, ° ГФ XIII, Том 1, стр. 605 (ОФС.1.2.1.0018.15) | -9,3 | -9,0 | -10,0 | От -8,5 до -10,5 | От -8,5 до -10,5 |
| Вода, % ГФ XIII, Том 1, стр. 719 (ОФС.1.2.3.0002.15) | 0,05 | 0,10 | 0,09 | Показатель отсутствует | Не более 0,2 |
| Сульфатная зола, % ГФ XIII, Том 1, стр. 714 | 0,045 | 0,067 | 0,044 | Не более 0,1 | Не более 0,1 |

| | | | | | |
|---|---------------------|---------------------|------------------|---|---|
| (ОФС.1.2.2.2.0014.15) | | | | | |
| Тяжелые металлы ГФ XIII, Том 1, стр. 708 (ОФС.1.2.2.2.0010.15) | 0,001 | 0,001 | 0,001 | Не более 0,001% | Не более 0,001% |
| Остаточные органические растворители ГЖХ | 0,052 ± 0,014 | 0,078 ± 0,011 | 0,062 ± 0,013 | Показатель отсутствует | Этанол не более 0,1 % |
| Посторонние примеси ВЭЖХ | Не обнаружено | | | Индивидуально й примеси не более 0,5%. Суммарное содержание примесей не более 1% | Суммарное содержание единичных примесей не более 0,1% |
| Количественное содержание Метод Кьельдаля | 99,73 | 99,66 | 99,57 | От 99 до 101% | Не менее 99,5% и не более 100,5% |

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Изучено современное состояние и перспективы совершенствования системы обеспечения качества ЛС и определены основные тенденции развития стандартизации ЛС пептидной структуры в Российской Федерации и за рубежом.
2. Проведены исследования по изучению физико-химических свойств и разработке методик анализа стандартных образцов Дилепта и ГБ-115 с помощью методов ИК-спектроскопии, УФ-спектрофотометрии и ЯМР-спектроскопии для подтверждения их подлинности. Обоснована необходимость комплексной идентификации стандартных образцов Дилепта и ГБ-115 с применением спектральных методов анализа. Для надежной идентификации в разделы «Подлинность» включены три методики: УФ-спектрофотометрии (описаны минимумы и максимумы поглощения УФ-спектров), ИК-спектры и спектры ЯМР C^{13} должны соответствовать прилагаемым рисункам.
3. Охарактеризовано качество стандартных образцов ГБ-115 и Дилепта по общим показателям фармакопейного анализа (описание, растворимость, удельное вращение, температура плавления, вода, сульфатная зола, тяжелые металлы) и установлены нормы для включения в фармакопейные статьи.
4. Проведен хроматографический анализ чистоты стандартных образцов ГБ-115 и Дилепта по показателю «Посторонние примеси» с помощью метода ВЭЖХ. Установлены нормы для включения в фармакопейные статьи – суммарное содержание единичных примесей - не более 0,1 %.
5. Разработаны и валидированы методики оценки фармакопейных стандартных образцов ГБ-115 и Дилепта по показателю «Остаточные органические растворители» с помощью метода ГЖХ; установлены нормы по данному разделу. Проведена апробация методики на трех сериях стандартных образцов

ГБ-115 – содержание этанола не превышает 0,1 %. Стандартные образцы Дилепта оценены по показателю «Остаточные органические растворители» - содержание этилацетата не более 0,2 %.

6. Проведено количественное определение стандартных образцов ГБ-115 и Дилепта методом Къельдаля. Установлены нормы по показателю «Количественное определение» - не менее 99,5% и не более 100,5%. Доказана возможность их использования в качестве фармакопейных стандартных образцов.
7. Разработаны нормативные документы на фармакопейные стандартные образцы Дилепта и ГБ-115.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЛС – лекарственное средство

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГБ-111- этиловый эфир N-(6-фенилгексаноил)-глицил-L-триптофана

ГБ-115 - амид N-(6-фенилгексаноил)-глицил-L-триптофана

ГЖХ - газожидкостная хроматография

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия

НФ - неподвижная фаза

ОР – остаточный органические растворитель

ППХС - проверка пригодности хроматографической системы

ПФ - подвижная фаза

СО - стандартный образец

ТСХ - тонкослойная хроматография

ТХ – этиловый эфир L-триптофана хлорогидрат

УФ-СФМ – ультрафиолетовая спектрофотометрия

ФС - фармакопейная статья

ФГГ – N-(6-фенилгексаноил)глицин

ФГК – 6-фенилгексановая кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Леонтьев Д. А. Фармацевтические стандартные образцы/ Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: в 3 томах на русском языке/ Под ред. Члена-корр. НАН Украины Георгиевского В. П. – Харьков: изд. НТМТ, – 2012. – Т. 3
2. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Багирова В.Л. Основные аспекты совершенствования фармакопейного анализа// Хим.-фарм. журн. – 2000. - № 11.- С.46-48
3. Арзамасцев А.П., Дорофеев В.Л., Садчикова Н.П. Государственные стандартные образцы лекарственных веществ (проект общей фармакопейной статьи)// Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. – МЗ РФ, 2000. - № 3. – С. 24-26
4. Арзамасцев А.П., Дорофеев В.Л., Садчикова Н.П. Положение о государственных стандартных образцах лекарственных веществ // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. – МЗ РФ, 2000. - № 3. – С. 27-28
5. Арзамасцев А.П., Дорофеев В.Л., Садчикова Н.П. Общие рекомендации по разработке, производству и распределению Государственных стандартных образцов лекарственных веществ// Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. – МЗ РФ, 2000. - № 3. – С. 29-35
6. 61-ФЗ от 12 апреля 2010 г. «Об обращении лекарственных средств».
7. 429-ФЗ от 22 декабря 2014 г. «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств».
8. European Pharmacopoeia 7th Edition. / European Department for the Quality of Medicines. Strasbourg, France.
9. European Pharmacopoeia 8th Edition. / European Department for the Quality of

Medicines. Strasbourg, France.

10. Петров А., Сысуев Е. Новикова Н., Макарова И. Перспективы создания и использования государственных стандартных образцов для проведения анализа лекарственных препаратов на примере триазавирина
11. Леонтьев Д.А. Гризодуб А.И. Обеспечение стран СНГ фармакопейными стандартными образцами. / «Фармацевтическая отрасль» - апрель № 2 (31). – 2012. – С. 106-109.
12. ISO - the International Organization for Standardization. Reference materials - Guidance on, and keywords used for, RM categorization. Стандартные образцы. Рекомендации и ключевые слова, используемые для классификации СО. 2009.03.15.
13. European Pharmacopoeia Chemical Reference Substance, CRS. EDQM. 2014.
14. The United States Pharmacopeia 33 – National Formulary 28, Reissue 2010.
15. GLP «*Good Laboratory Practice*», Надлежащая лабораторная практика. 01.03. 2010. ГОСТ Р-53434-2009.
16. Распоряжение Министра здравоохранения от 4 июня 2003, приложение № 1, Дз. У. № 116, поз. 1103.
17. The International Pharmacopoeia. 4-th ed., Vol.1-2, WHO, Geneva, 2006; The International Pharmacopoeia. 4-th ed., Vol.1-2, including First Suppl. WHO, Geneva, 2008
18. Certificate of USP Prednisone Tablets Lot Q1L136. December 31, 2013.
19. <http://apps.who.int/phint/en/p/about/> Дата обращения 31.10.2015
20. <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/> Дата обращения 31.10.2015
21. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients Q7 10 November 2000.
22. ISO - the International Organization for Standardization. ISO Guide 30:1992 - Термины и определения, употребляемые в связи со стандартными образцами (Terms and definitions used in connection with reference materials). 1992-11-12
23. ISO - the International Organization for Standardization. Guide 31:2000 -

- Содержание сертификатов и этикеток (Reference materials - Contents of certificates and labels). 2000-01-01.
- 24.ISO - the International Organization for Standardization. Guide 32:1997 - Калибровка в аналитической химии и использование сертифицированных стандартных образцов (Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials). 01.12.1997.
- 25.ISO - the International Organization for Standardization. Guide 33:2000 - Применение сертифицированных стандартных образцов (Uses of certified reference materials). 2000.01.01.
- 26.ISO - the International Organization for Standardization. Guide 34:2009 - Общие требования, касающиеся компетенции производителей стандартных образцов (General requirements for the competence of reference material producers) 2009.12.01.
- 27.ISO - the International Organization for Standardization. Guide 35:2006 - Правила сертификации стандартных образцов (Reference materials - General and statistic principles for certification). 2006.01.15.
- 28.VIM, 2008 и ISO/IEC Guide 99:2010.
- 29.Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации (МГС) Interstate council for standardization, metrology and certification. Межгосударственный стандарт ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2005. 2005-05-15.
- 30.<http://www.ich.org/home.html> Дата обращения 31.10.2015.
- 31.Q3A (R2). Impurities in New Drug Substances and Products. ICH harmonized tripartite guideline (25 October 2006), [Электронный ресурс], Режим доступа: [http: /2 www. ich.org](http://2 www.ich.org). Дата обращения 31.10.2015.
- 32.Q3B (R2) Impurities in new drug products. ICH harmonized tripartite guideline (2 June 2006), [Электронный ресурс], Режим доступа: [http: /2 www. ich.org](http://2 www.ich.org). Дата обращения 31.10.2015.
- 33.Q3C (R5) Impurities: Guideline for residual solvents. ICH harmonized tripartite guideline (4 February 2011), [Электронный ресурс], Режим доступа: [http: /2 www. ich.org](http://2 www.ich.org). Дата обращения 31.10.2015.

34. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIII Издание, 2016 (электронный ресурс).
35. European Pharmacopoeia 6th Edition. / European Department for the Quality of Medicines. Strasbourg, France. 2008.
36. British Pharmacopoeia 2009. / London. H.M. Stationary Office. 2009.
37. Арзамасцев А. П., Сенов П. Л. Стандартные образцы лекарственных веществ. М. : Медицина. – 1978. - 248 с.
38. Дорофеев В.Л., Арзамасцев А.П. Стандартные образцы для фармакопейного анализа. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. Т.8. № 5. 2010. 6-10 с.
39. Кирьянова Е.П. Дизайн, синтез и изучение связи структуры и анксиолитической активности N-ацилдипептидных аналогов холецистокинина-4. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук. Москва. 2008. 24 с.
40. Кирьянова Е.П., Кузнецова Е.А., Никитин С.В. Синтез замещенного дипептида ГБ-115, потенциального селективного анксиолитика. // Химико-фармацевтический журнал. Т. 45. №2. 2011. 41-45 с.
41. Колик Л.Г., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Изучение анксиолитических свойств антагониста ССК-2 рецепторов. // Международная научная конференция «Новые лекарственные средства: синтез, технология, фармакология, клиника». Минск. 14-16 ноября. 2001. Тезисы докладов. 71 с.
42. Патент РФ 2227144 (2004). Бюл. изобрет. №11. 2004.
43. Клумова В.С., Грушевская Л.Н., Авдюнина Н.И., Пятин Б.М., Сергеева М.С., Гаевая Л.М., Дуденкова М.Е./ Химико-фармацевтический журнал. 2011. Т.45. № 10. С.53-56.
44. Колик Л.Г. Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Генетическая зависимость психотропных эффектов оригинального пептидного антагониста

центральных холецистокининовых рецепторов. // Медицинская генетика Москва. 2005. 4. 5. 206-207 с.

45. Колик Л.Г. Экспериментальная оценка антидепрессивных свойств ГБ-115. // журн. Экпер. и клин. фармакол. 2010. 51 с.
46. Колик Л.Г., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Фармакогенетическое исследование анксиолитических свойств новых антагонистов холецистокининовых рецепторов у животных с различным уровнем эмоциональности. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. том 135. №5. 519-523 с.
47. Колик Л.Г., Жуков В.Н., Середенин С.Б. Характер проявления антиноцицептивных и анксиолитических свойств соединения ГБ-115 в аспекте взаимодействия холецистокининовой и опиоидергической систем. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2007. том 70. №2. 8-11 с.
48. Колик Л.Г. Экспериментальное изучение антидепрессивных свойств ГБ-115. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2011. том 74. №1. 3-5 с.
49. Шипаева Е.В., Коваленко Л.П., Хайдуков С. др., // Бюл. эксперим. биол. мед. 45 (5). 2008. 548-551 с.
50. Сорокина А.В., Алексеева С.В., Немова Е.П. и др. Доклиническое исследование безопасности дипептидного соединения ГБ-115. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2010. том 73. №6 29-32 с.
51. Колик Л.Г. Исследование анксиолитических и антиалкогольных свойств новых антагонистов ССК-2 рецепторов у инбредных животных с различной эмоциональностью. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва. 2002. с. 33
52. Константинопольский М.А., Чернякова И.В., Гудашева Т.А. Новые пептидные соединения ГБ-115 и дилепт как корректоры зависимости от

опиатов: экспериментальное изучение и перспективы клинического применения. // журн. Экспер. и клин. фармакол. 2010. с. 53

53. Ретюнская М.В., Кудрин В.С., Клодт П.М., Ус К.С., Гудашева Т.А., Островская Р.У. Новый трипептоидный аналог нейротензина, дилепт, оказывает селективное влияние на оборот дофамина в прилежащем ядре и гипоталамусе // Экспериментальная и клиническая фармакология – 2005. - Т.68.-№6.-С.15-18.
54. Гусев М.В., Грушевская Л.Н., Авдюнина Н.И., Пятин Б.М., Прокофьева В.И./ Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2009. Т. 7. № 2. С. 38-41.
55. Островская Р.У., Ретюнская М.В., Гузевых Л.С., Гудашева Т.А. Трипептидный аналог нейротензина дилепт сочетает нейролептическую активность с положительным мнемотропным действием // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2005. – Т.68.-№1.-С.3-6.
56. С.Б. Середенин, Т.А. Воронина, Т.А. Гудашева и др., Патент РФ №2091390 (1997)
57. Gudasheva T.A., Voronina T.A., Ostrovskaya R.U. et al., Synthesis and anti-amnesic activity of a series of N-acylprolyl-containing dipeptides // J.Eur.Med.Chem.-1996.V.31 №2. – P.151-157.
58. Gudasheva T.A., Voronina T.A., Ostrovskaya R.U. et al. Design of acylprolyltyrosine «Tripeptoid» analogue of neurotensin as potential atypical antipsychotic agents // J.Med.Chem. -1998.-V.41.-P.284-290.
59. Применение спектроскопии ЯМР ¹H и ¹³C в анализе стандартных образцов для лекарственных средств пептидной структуры дилепт и ГБ-115. / Гегечкори В.И., Кокорекин В.А., Щепочкина О.Ю., Пятин Б.М., Грушевская Л.Н., Авдюнина Н.И., Гаевая Л.М. // Биофармацевтический журнал. 2016. Т. 8. № 3. С. 37-43.
60. Применение спектральных методов при разработке стандартных образцов для лекарственных средств пептидной структуры. /

Гегечкори В.И., Щепочкина О.Ю., Грушевская Л.Н., Пятин М., Байбуртский Ф.С. // Фармация. 2016. № 1. С. 3-6.

61. Основы аналитической химии. В 2 кн. кн. 2 Методы химического анализа: Учебник для вузов. Под ред. Ю.А. Золотова. М. Высшая школа. 2004. с. 503
62. Харитонов Ю.Я. Аналитическая химия. М. Высшая школа. 2005. Т.2. с. 559
63. British Pharmacopoeia 2007. / London. H.M. Stationary Office. 2007.
64. British Pharmacopoeia 2009. / London. H.M. Stationary Office. 2009.
65. European Pharmacopoeia 5th Edition. / European Department for the Quality of Medicines. Strasbourg, France. 2005.
66. European Pharmacopoeia 6th Edition. / European Department for the Quality of Medicines. Strasbourg, France. 2008.
67. Peptide and protein drug analysis. Ed. By E. Reud. / New York. Marcel Dekker Inc. 2000. p. 885
68. The United States Pharmacopoeia 29th revision. / National formular 24th edition (USP 29-NF24). 2009.
69. The United State Pharmacopoeia 30th revision. / National formular 25th edition (USP 30 NF 25). 2007.
70. Государственная Фармакопея СССР: вып.1. Общие методы анализа. МЗ СССР. 11-е изд. доп. М. Медицина. 1987.
71. Фармацевтическая химия: учебник / под ред. Г.В. Раменской. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. -467 с.
72. The 15th Edition of the Japanese Pharmacopoeia. / Ministerial Notification of the Ministry of Health. 2009.
73. Bishop C.A., Harding D.R.K., Meyer L.J. et al. 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. / J. Chromatogr. 1980. V. 195. 181-186 pp.

74.Desiderio D.M. Mass spectrometric analysis of neuropeptidergic systems in the human pituitary and cerebrospinal fluid. / J Chromatogr. B. Biomed sci. appl. 731. 1999. 3-22 pp.

75.Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М. Химия. 1987. 120-173 с.

76.Карпова Л.К., Шемякин Ф.М. Применение реакции образования гидроксамовых кислот и гидроксаматов металлов в анализе лекарственных и биологически активных веществ. // Фармация. 1973. №1 76 с.

77.Кувырченкова И.С. Гидроксиламина гидрохлорид как универсальный реагент в фармацевтическом анализе. // Фармация. 2001. №2. 39-41 с.

78.Шабаров Ю.С. Органическая химия. М. Химия. 2000. 277-344 с.

79.Государственная Фармакопея СССР. 10-е изд. М. Медицина. 1968. 1078 с.

80.Горпинченко Н.В. Исследования в области фармацевтического анализа нового ноотропного препарата пептидной структуры. Дисс. канд. фарм. наук. Московская Медицинская Академия им. И.М. Сеченова. НИИ Фармакология РАМН. М. 2001. с. 157

81.Гусев М.В., Степаненко О.Б., Пятин Б.М. и др. Изучение физико-химических свойств нового нейролептика пептидной структуры – дилепта. // Материалы 4 Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». Москва. 2006. 25 с.

82.Денеш И. Титрование в неводных средах. М. Мир. 1971. с. 386

83.Гусев М.В., Пятин Б.М., Грушевская Л.Н. и др. – Разработка методики количественного определения субстанции нового оригинального

нейролептика дилепт. // Тезисы докладов XIV Российского Национального конгресса «Человек и лекарство». Москва. 2007. 815 с.

84. Арзамасцев А.П. Состояние и тенденции развития стандартизации и методов контроля качества лекарственных средств: современное состояние и перспективы развития. // матер. Межд. Науч. Симп. Ашхабад. 1991. 50-52 с.
85. Бернштейн И.Я., Колинский Ю.А. Спектрофотометрический анализ в органической химии. Л. Химия. 1986. с. 383
86. Браун Д., Флойд А., Сейнзбери М. Спектроскопия органических веществ. М. Мир. 1982. 300 с.
87. Gorog S., Babjak M., Gazdag M. et al. // Are ultraviolet and visible spectroscopy and spectrophotometry obsolete methods pharmaceutical analysis? / Acta Pharm Hung. 1999. vol. 69. №2. 60-68 pp.
88. Золотов Ю.А. Аналитическая химия. М. Высшая школа. 2000. Т.2 с. 494
89. Арзамасцев А.П. Ультрафиолетовые и инфракрасные спектры лекарственных веществ. Атлас. М. Медицина. 1981. с. 176
90. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Титова А.В. Современное состояние проблемы применения ИК-спектроскопии в фармацевтическом анализе лекарственных средств. // Химико-фармацевтический журнал 2008. №8. 26-30 с.
91. Белоусова Г. М., Михеева Н. Н. Методы контроля в синтезе. // Химико-фармацевтический журнал. 1979. №2. 106-108 с.
92. Беликов В.Г. Состояние и перспективы развития физико-химических исследований в фармацевтическом анализе. // Фармация. 1982. Т.31. №4. 54-64 с.
93. Арзамасцев А.П. Состояние и тенденции развития стандартизации и методов контроля качества лекарственных средств: современное состояние

- и перспективы развития. // матер. Межд. Науч. Симп. Ашхабад. 1991. 50-52 с.
94. Наканиси К. Пер. с англ. Инфракрасные спектры и строение органических соединений М. Мир. 1965. с. 216
95. Смит А. Прикладная ИК-спектроскопия. Пер. с англ. М. Мир. 1982. с. 328
96. Браун Д., Флойд А., Сейнзбери М. Спектроскопия органических веществ. // М. Высшая школа. 1971. 264 с.
97. Казицина Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК-, ЯМР- и масс спектроскопии в органической химии. М. Изд-во МГУ. 1979. с. 236
98. Kalinkova G.N. Infrared spectroscopy in pharmacy. / *Vibrational Spectroscopy*. 1999. Vol. 19. №2. 307 – 320 pp.
99. Брицке М.Э. Атомно-абсорбционный спектрохимический анализ. М. Химия. 1972. 224 с.
100. Дероум Э. Современные методы ЯМР для химических исследований. М. Мир. 1992. с. 403
101. Карташов В.С. Современное состояние и перспективы использования спектроскопии ЯМР в фармацевтическом анализе. // *Хим.-фарм. журнал*. 1996. Т.30. №5. 59-62 с.
102. Kahle C., Deubner R., Schollmayer C., Scheiber J. NMR Spectroscopic and Molecular Modeling Studies on Cyclodextrin–Dipeptide Inclusion Complexes. / *European Journal of Organic Chemistry*. 2005. Issue 8. 1578-1589 pp.
103. Ретюнская М.В., Гузевых Л.С., Бондаренко Н.А. и др. Медиаторный анализ механизма действия атипичного нейролептика дипептидной структуры дилепта. // *Фармакология и токсикология*. 2003. Т.11 527 – 531 с.

104. Kaiser E., Colescott R.L., Boss-inger C.D. and Cook P.I. *Anal. Biochem.* 1970. 34. 2. 595-598 pp.
105. Kalinkova G.N. *Infrared spectroscopy in pharmacy. / Vibrational Spectroscopy.* 1999. Vol. 19. №2. 307 – 320 pp.
106. Хроматография: практическое приложение метода. Под ред. Э. Хефтмана. М. Мир. 1986. Т.1. с. 336
107. Lough W.J., Wainer I.W. *High Performance Liquid Chromatography. Fundamental principles and practice. / UK. Blackie.* 1996. p. 99
108. Hancock W.S., Bishop C.A., Battersby J.E., Harding D.R.K., Hearn M.T.W. *High-pressure liquid chromatography of peptides and proteins. XX. The use of cationic reagents for the analysis of peptides by high-pressure liquid chromatography. / J. Chromatogr.* 1979. V. 168. 377-384 pp.
109. Hancock W.S., Bishop C.A., Meyer L.J. et al. *High-pressure liquid chromatography of peptides and proteins. VI. Rapid analysis of peptides by high-pressure liquid chromatography with hydrophobic ion-pairing of amino groups. / J. Chromatogr.* 1978. V.161. 291-298 pp.
110. Hancock W.S., Bishop C.A., Prestige R.L. et al. *Reversed-phase high-performance liquid chromatography of peptides and proteins with ion-pairing reagents. / Science.* 1978. V. 200. №4346. 1168-1170 pp.
111. Hearn M.T.W., Grego B., Hancock W.S. *High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. XX. Investigations of the effect of pH and ion-pair formation on the retention of peptides on chemically-bonded hydrocarbonaceous stationary phases. / J. Chromatogr.* 1979. V. 185. 429-444 pp.
112. Chiva K., Vilaseca M., Giralt E. et al. *An HPLC-ESMS study on the solid phase assembly of c-terminal proline peptides. / Journal of peptide science an official publication of the European Peptide Society.* 1999. Vol. 3. 131-140 pp.

113. Couletz J.R., Hann C.S. - In: New Techniques in amino Acid, peptide and protein analysis. / Eds. Niederweiser A. and Pataki G. Ann Arbor, M 1. Ann Arbor Sci. Publ. 1971. 75 p.
114. Mant C.T., Hodges R.S. High performance liquid chromatography of peptide and proteins: separation, analysis and conformation. / Fl. CRC Press. 1991. p. 950
115. Mant C.T., Hodges R.S. High performance liquid chromatography of peptide and proteins: separation, analysis and conformation. / Fl. CRC Press. 1991. p. 950
116. Messana I., Loffredo F., Inzitary R. et al. The coupling of RP-HPLC and ESI-MS in the study of small peptides and proteins secreted in vitro by human salivary glands that are soluble in acidic solution. / Eur. J. Morphol. 2003. V.6. p. 103
117. Moffat F., Senkas P., Ricretts D. Advances towards the quantitative analysis of peptides and proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography in the absence of a pure reference samples. / Chromatogr. 2000. V.42. p.235

ПРИЛОЖЕНИЕ

«Утверждаю»

Врио Директора ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова»,

д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН

А.Д. Дурнев

«10» 01/2017 2017 г

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: методики контроля качества стандартного образца Дилепта.

Кем предложен: Гегечкори В.И., аспирантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Образовательного Департамента Института Фармации и Трансляционной медицины ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

Кем и где выдано: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8.

Цель внедрения: Обеспечение надлежащего контроля стандартного образца, усовершенствование методик контроля качества субстанции Дилепта и его лекарственных форм с использованием стандартного образца.

Результаты внедрения: Предложенные методики используются в аналитической группе химико-технологической лаборатории опытно-технологического отдела для контроля стандартного образца Дилепта.

Руководитель опытно-технологического отдела
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»,
д. фарм. наук, профессор



Пятин Б.М.

«Утверждаю»

Врио Директора ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова»,
д.м.н., профессор, чл.-корр. РАН

А.Д. Дурнев

«16»  2017 г**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

Предмет внедрения: методики контроля качества стандартного образца ГБ-115.

Кем предложен: Гегечкори В.И., аспирантом кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Образовательного Департамента Института Фармации и Трансляционной медицины ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России

Кем и где выдано: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, г. Москва, ул. Балтийская, д.8.

Цель внедрения: Обеспечение надлежащего контроля стандартного образца, усовершенствование методик контроля качества субстанции и лекарственных форм ГБ-115 с использованием стандартного образца.

Результаты внедрения: Предложенные методики используются в аналитической группе химико-технологической лаборатории опытно-технологического отдела для контроля стандартного образца ГБ-115.

Руководитель опытно-технологического отдела
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»,
д. фарм. наук, профессор



Пятин Б.М.