

**ПЯТИГОРСКИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ –
ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

Волокитина Дарья Сергеевна

**Разработка способов анализа и стандартизация нового биологически
активного соединения производного хиназолин-4(3H)-ОНА
ноотропного действия**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор
Лазарян Джон Седракович

Пятигорск – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Краткая характеристика лекарственных средств ноотропного действия и их химическая классификация	11
1.1.1. Химическая классификация ноотропных средств	12
1.1.2. Характеристика нового БАС ноотропного действия производного хиназолин-4(3 <i>H</i>)-она	13
1.1.3. Синтез VMA–10–13	13
1.2. Применение в медицине ЛС производных хиназолина	14
1.3. Методы фармацевтического анализа ЛС производных хиназолина.	18
1.3.1. Химическая структура и физические свойства	18
1.3.2. Химические методы анализа	24
1.3.3. Спектроскопические методы анализа	26
1.3.3.1. Спектрометрия в инфракрасной области спектра	26
1.3.3.2. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра	27
1.3.4. Хроматографические методы анализа	30
1.3.4.1. Метод тонкослойной хроматографии	30
1.3.4.2. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии	30
1.3.4.3. Метод газовой хроматографии	36
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1	37
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1. Характеристика объектов, вспомогательных материалов, оборудования и реактивов	38
2.1.1. Оборудование	39
2.1.2. Растворители	40
2.1.3. Реактивы	41
2.1.4. Титрованные растворы	42

2.1.5. Индикаторы	42
2.2. Методы исследования	43
ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА СУБСТАНЦИИ VMA–10–13	45
3.1. Определение основных физико-химических показателей качества субстанции VMA–10–13	45
3.1.1. Описание	45
3.1.2. Определение растворимости	45
3.1.3. Определение температуры плавления	46
3.1.4. Определение pH и кислотности или щелочности	47
3.1.5. Определение потери в массе при высушивании	49
3.1.6. Сульфатная зола и тяжелые металлы	49
3.1.7. Определение примеси неорганических анионов (хлориды)	50
3.2. Исследование спектральных свойств VMA–10–13	50
3.2.1. Спектрометрия в инфракрасной области	51
3.2.2. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой области	53
3.2.2.1. Исследование УФ-спектров поглощения VMA–10–13	53
3.2.2.2. Использование вторых производных в исследовании УФ- спектров поглощения VMA–10–13	57
3.3. Определение подлинности субстанции VMA–10–13	59
3.3.1. Использование спектральных методов	59
3.3.2. Использование химических реакций	59
3.4. Определение родственных примесей в субстанции VMA–10–13 ...	61
3.4.1. Использование метода тонкослойной хроматографии	61
3.4.2. Использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии	68
3.5. Определение остаточных органических растворителей в субстанции VMA-10-13 методом газовой хроматографии	77
3.6. Количественное определение субстанции VMA–10–13	83

3.6.1. Метод кислотно-основного титрования в неводных средах	83
3.6.2. Метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой области	92
3.7. Нормы качества субстанции VMA-10-13	100
3.8. Установление срока годности субстанции VMA-10-13	101
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3	104
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ ТВЕРДОЙ ДОЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ VMA-10-13 – ТАБЛЕТОК «ХИНАЗОТРОП»	106
4.1. Определение основных фармацевтико-технологических показателей качества таблеток «Хиназотроп»	107
4.2. Разработка методик определения подлинности таблеток «Хиназотроп»	108
4.2.1. Метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой области	108
4.2.2. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии	110
4.3. Определение родственных примесей	111
4.4. Разработка методик количественного определения VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп»	113
4.4.1. Метод производной спектрофотометрии	113
4.4.2. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии	121
4.5. Определение однородности дозирования таблеток «Хиназотроп»	128
4.6. Разработка методики определения показателя «Растворение»	129
4.7. Нормы качества таблеток «Хиназотроп»	132
4.8. Установление срока годности таблеток «Хиназотроп»	132
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4	135
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	136
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	138
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	139
ПРИЛОЖЕНИЯ	154

Приложение 1 – Лекарственные средства ноотропного действия, зарегистрированные в Российской Федерации	155
Приложение 2 – Проект ФС VMA-10-13, субстанция	162
Приложение 3 - Проект ФС «Хиназотроп», таблетки 25 мг	173
Приложение 4 - Акт о внедрении результатов научных исследований по разработке проекта ФС на субстанцию VMA-10-13	183
Приложение 5 - Акт о внедрении результатов научных исследований по разработке проекта ФС на «Хиназотроп», таблетки 25 мг	184
Приложение 6 - Акт о внедрении результатов научных исследований в учебный процесс аспирантуры	185

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В настоящее время увеличилось число заболеваний, связанных с нарушениями мозгового кровообращения, нарушениями памяти и умственной деятельности головного мозга. Также увеличился объем информации, которую нужно переработать и запомнить, возросла нагрузка на нервную систему.

Несмотря на наличие большого разнообразия ноотропных средств и различие механизмов их действия, эффективность существующих препаратов считается недостаточной. Поэтому активно ведется поиск новых более активных и безопасных соединений с ноотропной активностью.

С этой целью в Волгоградском государственном медицинском университете (ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России) под руководством профессора Озерова А.А. было синтезировано биологически активное соединение производное хиназолина, обладающее выраженным ноотропным и антигипоксическим действием: 3-[2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3*H*)-он (лабораторный шифр – VMA-10-13).

Для внедрения в медицинскую практику нового БАС необходимо глубокое исследование его физико-химических свойств, обоснование и разработка методик анализа и норм качества для стандартизации субстанции и лекарственной формы VMA-10-13.

Степень разработанности темы исследования. VMA-10-13 – принципиально новое соединение производное хиназолина, фармацевтический анализ и стандартизация субстанции и лекарственной формы (таблеток) VMA-10-13 до настоящего времени не проводились.

Цель исследования. На основе изучения физико-химических свойств разработать методики анализа и нормы качества для стандартизации нового БАС ноотропного действия VMA-10-13 в субстанции и лекарственной форме.

Задачи исследования. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1) изучить физико-химические свойства и спектральные характеристики VMA-10-13, определить основные фармакопейные показатели качества субстанции;

2) разработать методики идентификации и количественного определения субстанции VMA-10-13 химическими и физико-химическими методами;

3) исследовать хроматографические характеристики и разработать методики определения родственных примесей и остаточных органических растворителей в субстанции VMA-10-13;

4) определить фармацевтико-технологические показатели качества и разработать методики анализа для стандартизации твердой дозированной лекарственной формы (таблеток) VMA-10-13;

5) исследовать стабильность при хранении в естественных условиях и установить сроки годности субстанции и таблеток VMA-10-13;

6) обосновать нормы качества и разработать нормативную документацию на субстанцию и таблетки VMA-10-13.

Научная новизна. Впервые проведено химико-фармацевтическое изучение нового БАС производного хиназолин-4(3*H*)-она. Определены физико-химические свойства и спектральные характеристики, разработаны и валидированы методики подтверждения подлинности и количественного определения субстанции VMA-10-13. Найдены оптимальные условия определения возможных родственных примесей в субстанции методом ВЭЖХ. Разработаны методики анализа для стандартизации таблеток VMA-10-13. Установлены нормы качества, исследована стабильность и определены сроки годности субстанции и таблеток VMA-10-13.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты исследования позволяют расширить знания о химических и физико-химических свойствах нового БАС производного хиназолин-4(3*H*)-она и

могут служить теоретической базой для разработки методик анализа других производных хиназолина.

По результатам исследований разработаны методики анализа, обоснованы нормы качества и оформлены проекты нормативной документации на субстанцию и таблетки VMA-10-13.

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты исследования физико-химических свойств, спектральных характеристик и определения основных фармакопейных показателей качества субстанции VMA-10-13;

- обоснование, разработка и валидация методик подтверждения подлинности и количественного определения субстанции VMA-10-13 химическими и физико-химическими методами;

- результаты разработки и валидации методик определения родственных примесей и остаточных органических растворителей в субстанции VMA-10-13;

- обоснование, разработка и валидация методик анализа для стандартизации таблеток VMA-10-13;

- результаты исследования стабильности и установление срока годности субстанции и таблеток VMA-10-13;

- обоснование норм качества и разработка нормативной документации на субстанцию и таблетки VMA-10-13.

Методология и методы исследования. Работа выполнена в соответствии с требованиями ГФ XIV издания, также были учтены рекомендации зарубежных фармакопей и руководства под редакцией Н.В. Юргеля - «Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств». В работе использованы физико-химические (ИК-спектрометрия, УФ-спектрофотометрия, ВЭЖХ, ГХ), химические (кислотно-основное титрование в неводной среде) и фармацевтико-технологические методы исследований. Статистическая обработка полученных результатов проведена в соответствии с требованиями ГФ XIV.

Степень достоверности научных положений и выводов. Работа выполнена на современном научно-методическом уровне. Экспериментальные исследования проведены с использованием современного сертифицированного оборудования, разработанные методики валидированы, анализ экспериментальных данных проведен с использованием методов статистической обработки, что позволяет считать полученные результаты достоверными.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на 47 международной научной конференции Евразийского Научного Объединения: «Наука и современность» (Москва, 2019); IV, V всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Беликовские чтения» (Пятигорск, 2015, 2016); межрегиональном научно-инновационном конкурсе молодых ученых «У.М.Н.И.К.» (Ставрополь, 2015); 74, 75 открытых научно-практических конференциях молодых ученых и студентов ВолгГМУ «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Пятигорск, 2016, 2017); научно-практической конференции «Синтез и анализ лекарственных средств синтетического и растительного происхождения» (Пятигорск, 2017). Апробация работы проведена на расширенном заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии совместно с Проблемной комиссией Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. (Протокол № 2 16.04.2019).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Планируется включение субстанции VMA-10-13 в программу доклинических исследований в рамках Федеральной целевой программы «Развитие медицинской и фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия (пункты 2 и 3).

Личное участие автора в получении научных результатов.

Основные экспериментальные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором или при его непосредственном участии. Личный вклад включает выбор и обоснование диссертационной темы, публикации, выступления на научных конференциях. Автором выполнены исследования по установлению физико-химических и химических свойств субстанции VMA-10-13, на основе которых разработаны методики подтверждения подлинности, оценки чистоты и количественного определения субстанции и лекарственной формы (таблеток) VMA-10-13. Систематизированы полученные результаты, составлены проекты НД.

Внедрение результатов исследования. Разработанные методики анализа субстанции и таблеток, нашли практическое применение и внедрены в работу аналитической группы химико-фармацевтического и научно-производственного отделов НИИ фармакологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Фрагменты диссертационной работы внедрены в учебный процесс аспирантуры по специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия» Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в том числе 4 из Перечня ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 185 страницах машинописного текста, содержит 46 таблиц, 32 рисунка. Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, главы «Объекты и методы исследования», двух глав экспериментальной части, общих выводов, списка литературы и приложений. Список литературы включает 139 источников, в том числе 61 – на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Краткая характеристика лекарственных средств ноотропного действия и их химическая классификация

В современном мире человек подвержен стрессам, неблагоприятным факторам окружающей среды, постоянным нервно-психическим напряжениям - все это заставляет организм снижать мозговую активность, способность к обучению и запоминанию информации [18, 45, 72].

Одной из основной причиной смертности в мире является нарушение мозгового кровообращения, а его профилактика и лечение - актуальная задача медицины. Ежегодно в мире отмечается около полмиллиона случаев инсульта, из них 70-80% приходится на ишемический инсульт. Серьезной проблемой является высокая смертность среди таких больных, причиной которой являются, как сам инсульт, так и его осложнения – острая коронарная недостаточность, тромбоэмболия легочной артерии. Только около четверти пациентов способны возвратиться к прежней жизни [42, 57].

Эффективным направлением помощи пациентам с нарушениями мозгового кровообращения является назначение препаратов, способствующих нормализации метаболизма головного мозга, в частности ноотропных средств [18, 42, 45, 57].

Основными механизмами действия ноотропных средств, считают влияние их на метаболические и биоэнергетические процессы в нервной клетке и взаимодействие с нейромедиаторными системами мозга. Нейрометаболические стимуляторы улучшают проникновение через ГЭБ и утилизацию глюкозы (в коре головного мозга, гипоталамусе и мозжечке), повышают обмен нуклеиновых кислот, усиливают синтез АТФ, белка и РНК [42, 45].

Из основных эффектов, которые оказывают ноотропные препараты на организм человека, можно выделить психостимулирующее, антидепрессивное и седативное действия. Они улучшают память, уменьшают раздражительность и эмоциональную возбудимость, снижают головные

боли и головокружения, оказывают противопаркинсоническое и противоэпилептическое действия [46, 68, 72].

Согласно определению Всемирной организации здравоохранения, ноотропные препараты – это средства, которые повышают внимание, улучшают способность к обучению, повышают умственную деятельность, а также устойчивость головного мозга к агрессивным воздействиям [68, 72].

В настоящее время в группе препаратов ноотропного действия отсутствует единая классификация, которая бы определяла их различие, как по химическому строению, так и по механизму действия.

Основные сведения о зарегистрированных в Российской Федерации ЛС ноотропного действия [31, 61, 68] приведены в приложении 1.

1.1.1. Химическая классификация ноотропных средств

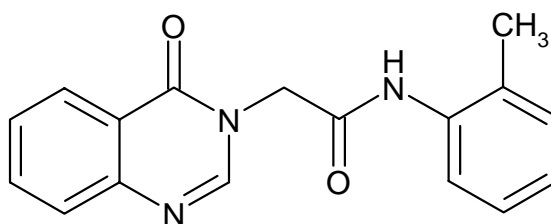
Как следует из данных приложения 1, по химическому строению ЛС ноотропного действия можно подразделить на следующие группы:

- производные аминокислот (гамма-аминомасляная кислота и её производные - никотиноил гамма-аминомасляная и аминофенилмасляная, глутаминовая кислота, гопантенная кислота, глицин и его производное - этиловый эфир N-фенилацетил-L-пропилглицина);
- производные пирролидона (пирацетам и фонтурацетам);
- производные пиридоксина (пиритинол и биотредин);
- производные диметиламиноэтанола (деанола ацеглумат);
- производные холина (цитиколин и холина альфосцерат);
- нейропептиды и их аналоги (семакс);
- производные кофермента Q (идебенон);
- полипептиды коры головного мозга скота;
- производные янтарной кислоты.

Следует отметить, что среди приведенных групп ЛС ноотропного действия отсутствуют лекарственные вещества производные хиназолина.

1.1.2. Характеристика нового БАС ноотропного действия производного хиназолин-4(3*H*)-она

Последнее время высокими темпами ведется исследовательская деятельность, связанная с поиском и изучением новых ноотропных препаратов [80]. Перспективными в плане разработки новых высокоэффективных, селективных и безопасных ноотропных средств являются производные хиназолина, структурно близкие к эндогенным пиримидиновым основаниям [53]. С этой целью в Волгоградском государственном медицинском университете (ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России) было синтезировано новое БАС – производное хиназолин-4(3*H*)-она: 3-[2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3*H*)-он (лабораторный шифр – VMA-10-13):



Доклинические исследования показали перспективность применения данного вещества как ноотропного и антигипоксического средства [53, 54].

По степени ноотропного и антигипоксического действия новое БАС, применяется в значительно более низких дозах, превосходит фенибут, в еще большей степени, пирацетам, и сопоставимо с фенотропилом. По выраженности антигипоксического действия оно статистически значимо превосходит пирацетам и не уступает мексидолу [50, 53, 54].

1.1.3. Синтез субстанции VMA-10-13

Синтез VMA-10-13 был осуществлен в НИИ фармакологии ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России под руководством профессора А.А. Озерова по следующей схеме: путем алкилирования незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамидом в среде безводного диметилформамида в присутствии карбоната калия. Реакция алкилирования

протекает исключительно по положению N³ хиназолинового ядра, другие изомеры не образуются [53].

Методика синтеза: смесь 2,0 г хиназолин-4(3H)-она, 4,0 г безводного карбоната калия и 50 мл диметилформамида перемешивают при температуре 100–105°C в течение 30 мин, добавляют 2,8 г 2-хлор-N-(2-метилфенил)ацетамида и перемешивают при той же температуре в течение 1 часа. Охлаждают до комнатной температуры, фильтруют, фильтрат выдерживают при температуре 0–5°C в течение 1 суток, выделившийся осадок отфильтровывают, промывают холодным диметилформамидом, водой и сушат на воздухе. Перекристаллизовывают из диметилформамида и получают соединение VMA-10-13. Схема синтеза приведена на рисунке 1.

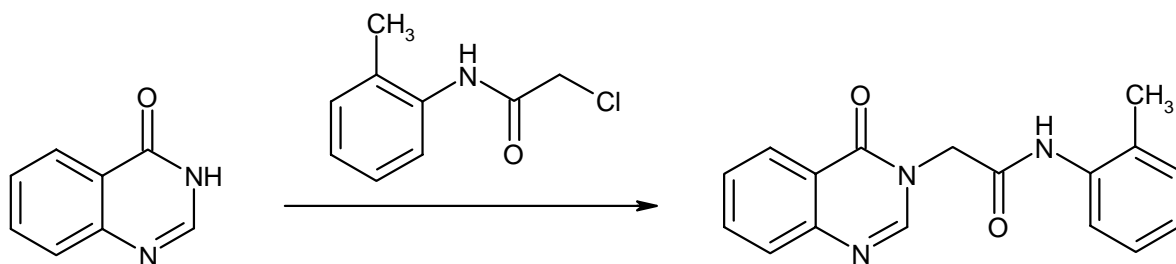


Рисунок 1 – Схема синтеза субстанции VMA-10-13

Структура полученного соединения подтверждена авторами с помощью спектра ПМР [53], снятом в ДМСО-d₆, δ, м.д.: 2,19 с (3H, CH₃); 4,86 с (2H, CH₂); 7,02 т (7 Гц, 1H, H⁶); 7,33-7,52 м (4H, фенил); 7,66 д (8 Гц, 1H, H⁸); 7,81 т (7,5 Гц, 1H, H⁷); 8,11 д (7 Гц, 1H, H⁵); 8,33 с (1H, H²); 9,77 с (1H, NH).

1.2. Применение в медицине ЛС производных хиназолина

По химической структуре хиназолин относится к группе бензодиазинов, в котором гетероциклическое кольцо пиримидина конденсировано с бензольным [22, 36, 80, 82, 86, 115].

Известны несколько природных алкалоидов, содержащих хиназолиновое кольцо, например, соединения типа вазицина, эводиамина, фебрифугина [22, 52, 82, 115]. Известен также антибиотик эхиномицин – пептидное производное хиноксалин-2-карбоновой кислоты [22]. Среди них

встречаются и физиологически активные соединения, но, из-за низкого терапевтического эффекта, в медицине их не применяют.

Одним из известных представителей производных хиназолина, оказывающим седативное и снотворное действие, является метаквалон [124]. Его применение достигло своего пика в начале 1970-х годов для лечения бессонницы и как успокаивающий и мышечный релаксант. В настоящее время в Российской Федерации оборот метаквалона запрещен (входит в перечень наркотических и психотропных средств – список I).

В то же время многие из производных хиназолина нашли применение в медицинской практике (таблицы 1) в качестве эффективных и безопасных терапевтических и профилактических средств, обладающих широким спектром фармакологической активности [31, 61, 124].

Таблица 1 – Применение в медицине ЛС производных хиназолина

МНН	Торговые наименования	1 - фармакологическое действие 2 - формы выпуска
1	2	3
Алфузозин (Alfuzosin)	Алфупрост МР Дальфазретард Дальфаз СР	1 – альфа-адреноблокатор, влияет на обмен веществ в предстательной железе, корректор уродинамики 2 – таблетки покрытые оболочкой 5; 10 мг
Доксазозин (Doxazosin)	Артезин Доксапростан Зоксон Камирен Кардура Тонокардин	1 – гипотензивное, сосудорасширяющее, гиполипидемическое, спазмолитическое 2 – таблетки 1; 2; 4 мг; таблетки покрытые пленочной оболочкой 4; 8 мг
Празозин (Prazosin)	Празозин Польпрессин	1 – вазодилатирующее, гипотензивное, антидиуретическое 2 – таблетки 1; 2; 5 мг
Теразозин (Terazosin)	Сетегис Корнам Теразозин	1 – вазодилатирующее, антидиуретическое, гиполипидемическое 2 – таблетки 1; 2; 5; 10 мг
Гефитиниб (Gefitinib)	Иресса	1 – противоопухолевое средство – ингибитор протеинкиназы 2 – таблетки, покрытые пленочной оболочкой 250 мг

1	2	3
Эрлотиниб (Erlotinib)	Тарлениб Тарцева	1 – противоопухолевое средство-ингибитор протеинтирозинкиназы 2 – таблетки покрытые пленочной оболочкой 25; 50; 100; 150 мг
Анагрелид (Anagrelide)	Агрилин Тромборедуктин	1 – антиагрегант, ингибирует агрегацию тромбоцитов и эритроцитов 2 – капсулы 0,5; 1 мг
Метолазон (Metolazone)	Зароксолин Метеникс Ксурет	1 – мочегонное, тиазидный диуретик 2 – таблетки 10 мг
Кетансерин (Ketanserin)	Серефрекс, Сурексал, Суфроксал	1 – вазодилататор, серотонинергическое средство 2 – таблетки 20; 40 мг; 0,5% раствор для инъекций в ампулах

К фармакологической группе альфа-адреноблокаторов [65] относятся алфузозин, доксазозин, празозин и теразозин. Данные препараты относятся к селективным α_1 -адреноблокаторам, они препятствуют прохождению сосудосуживающих импульсов через адренергические синапсы и вызывают расширение артериол и прекапилляров [23, 32, 47, 92]. Другим их эффектом, блокады α_1 -адренорецепторов, является улучшение уродинамики при доброкачественной гиперплазии предстательной железы [31, 47, 124].

Алфузозин селективно блокирует постсинаптические α_1 -адренорецепторы в зоне предстательной железы и уретры. Применяют для лечения функциональных проявлений доброкачественной гиперплазии предстательной железы [116, 127].

Доксазозин также избирательно блокирует постсинаптические α_1 -адренорецепторы, что приводит к расслаблению гладких мышц периферической сосудистой сети и предстательной железы. Применяют для лечения легкой и умеренной гипертонии и при лечении симптоматической доброкачественной гиперплазии предстательной железы [32, 79, 92, 101, 117].

Празозин оказывает выраженное гипотензивное действие без значительного повышения частоты сердечных сокращений. Снижает общее периферическое сопротивление сосудов, расширяет емкостные и резистивные сосуды. Оказывает одновременно артерио- и венорасширяющее действие. Применяют при разных формах артериальной гипертензии [93, 126].

Теразозин избирательно блокирует α_1 -адренорецепторы гладкой мускулатуры предстательной железы и шейки мочевого пузыря [23, 47]. Применяется в медицине для лечения артериальной гипертензии и аденомы предстательной железы [47, 102, 139].

Кетансерин является специфическим антагонистом HT_2 -рецепторов, оказывает умеренное альфа-адреноблокирующее действие, вызывает расширение кровеносных сосудов и оказывает антигипертензивное действие. Применяют при лечении артериальной гипертензии, для купирования гипертонических кризов, а также при нарушениях периферического кровообращения [112].

Производные хиназолина также нашли применение и в качестве противоопухолевых ЛС. Так к ингибиторам протеинкиназ относятся gefitinib и erlotinib [33, 61, 71, 105, 106, 109, 124], которые применяются при немелкоклеточном раке легкого.

К группе антиагрегантов относится анагрелид, который тормозит синтез фосфодиэстеразы, ингибирует гипердозирование мегакариоцитов. Применяют для лечения эссенциальной тромбоцитемии, представляющей собой злокачественное заболевание крови [83, 138].

Среди других ЛС производных хиназолина можно выделить метолазон – тиазидный диуретик, применяется при задержке жидкости в организме, при сердечной недостаточности или расстройстве почек, его также используют для лечения высокого артериального давления [110].

1.3. Методы фармацевтического анализа ЛС производных хиназолина

Нами был проведен анализ отечественной и зарубежной литературы, касающейся физико-химических свойств, методов качественного и количественного определения производных хиназолина в виде фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, включенных в Государственную Фармакопею Российской Федерации XIV издания и зарубежные фармакопеи (Европейскую, Британскую, Соединенных Штатов и Японскую).

1.3.1. Химическая структура и физические свойства

Химическое строение и физические свойства фармацевтических субстанций производных хиназолина представлены в таблице 2.

По химическому строению производные хиназолина можно подразделить на несколько групп [22, 82, 86, 115].

Первая группа - производные 4-амино-6,7-диметоксихиназолина содержащие во 2-м положении заместители различной гетероциклической структуры (алфузозин, буназозин, доксазозин, празозин, теразозин). Фармацевтические субстанции этих веществ используются в виде солей - гидрохлоридов и мезилата (доксазозина мезилат). По внешнему виду они представляют собой белые или почти белые (до желтовато- или кремовато-белого цвета) кристаллические порошки. Растворимость веществ в воде варьирует в довольно широких пределах, так, алфузозина гидрохлорид легко растворим, теразозин гидрохлорид умеренно растворим, остальные вещества очень мало или практически нерастворимы в воде. Они мало или очень мало растворимы в этаноле, практически нерастворимы в таких органических растворителях, как метиленхлорид, ацетон, диэтиловый эфир, хлороформ, гексан. В то же время они умеренно растворимы в диметилсульфоксиде и диметилформамиде.

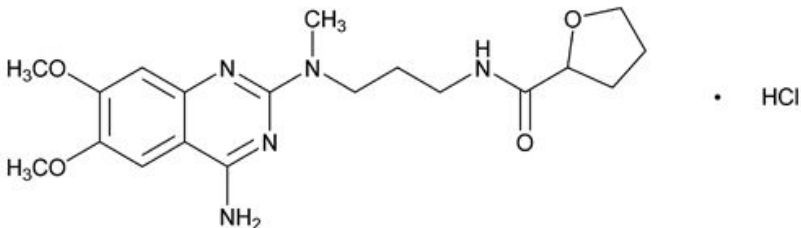
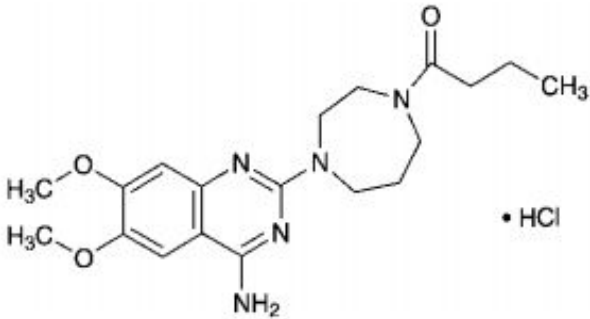
Вторая группа объединяет вещества производные хиназолин-4-она, имеющие в положении 4 хиназолинового цикла оксогруппу.

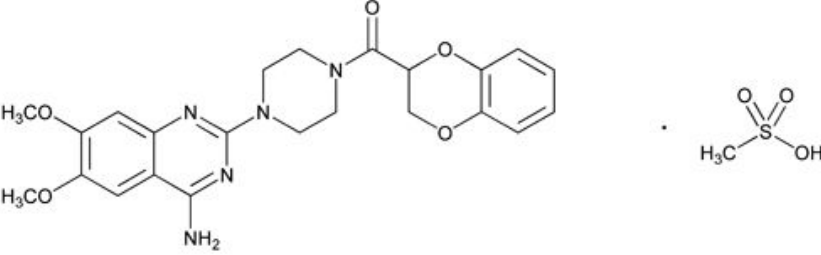
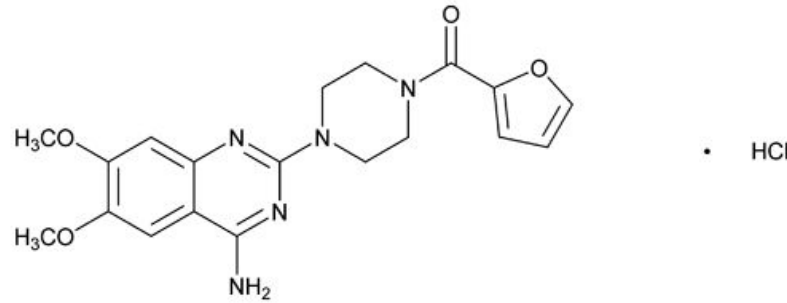
Представителями данной группы являются афлоквалон и метолазон, отличающиеся друг от друга степенью гидрирования хиначолинового цикла. Фармацевтические субстанции этих веществ используются в виде оснований. По внешнему виду они представляют собой от белого до светло-желтого цвета кристаллические порошки, очень мало или практически нерастворимые в воде, мало растворимые в этаноле, умеренно растворимые в метаноле.

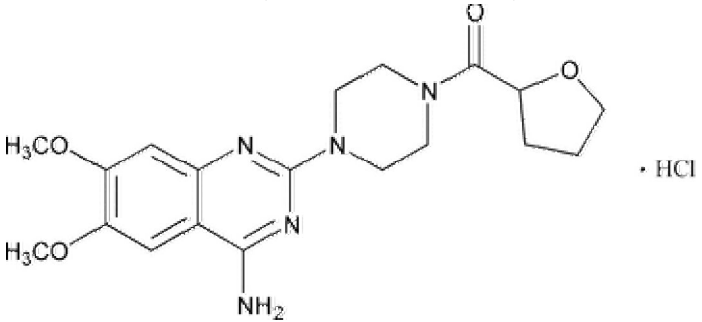
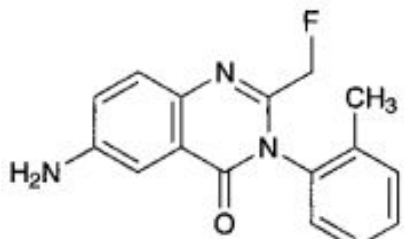
К третьей группе можно отнести анагрелид гидрохлорид, по химическому строению представляющий собой продукт конденсации хиначолина и имидазола. Фармацевтическая субстанция анагрелида гидрохлорида по внешнему виду представляет собой порошок от белого до бледно-розоватого цвета, умеренно растворимый в диметилсульфоксиде и диметилформамиде, очень мало растворимый в воде [123, 125].

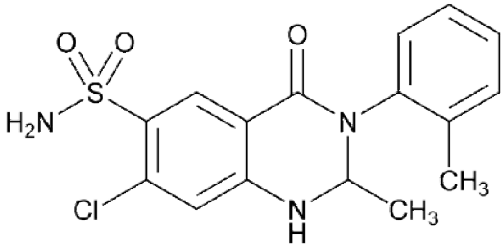
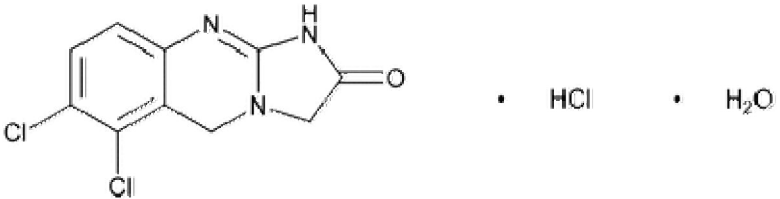
По литературным данным, все производные хиначолина представляют собой тугоплавкие вещества с температурой плавления от 230 до 290 °С [22, 82, 86, 115]. В зарубежных фармакопеях определение температуры плавления данных веществ не приводится, что, по всей вероятности, связано с тем, что из-за сложной структуры процессу плавления предшествует разложение соединений производных хиначолина.

Таблица 2 – Химическое строение и физические свойства фармацевтических субстанций производных хиназолина

Название и химическая структура	Описание	Растворимость	НД
1	2	3	4
<p data-bbox="338 328 748 408">Алфузолина гидрохлорид (Alfuzosin hydrochloride)</p>  <p data-bbox="132 699 954 818"><i>(RS)-N-[3-[(4-Амино-6,7-диметоксихиназолин-2-ил)(метил)амино]-пропил] тетрагидрофуран-2-карбоксамид гидрохлорид</i></p>	<p data-bbox="994 448 1346 612">Белый или почти белый, кристаллический порошок, мало гигроскопичен</p>	<p data-bbox="1373 491 1928 655">Легко растворим в воде, умеренно растворим в этаноле (96%), практически нерастворим в метиленхлориде</p>	<p data-bbox="2007 512 2078 632">[91, 107, 135]</p>
<p data-bbox="338 834 748 914">Буназолина гидрохлорид (Bunazosin hydrochloride)</p>  <p data-bbox="163 1270 920 1351"><i>4-Амино-2-(4-бутаноил-1,4-дiazепан-1-ил)-6,7-диметоксихиназолинмоногидрохлорид</i></p>	<p data-bbox="994 1050 1346 1129">Белый кристаллический порошок</p>	<p data-bbox="1373 967 1928 1214">Очень легко растворим в муравьиной кислоте, мало растворим в воде и метаноле, очень мало растворим в этаноле и практически нерастворим в диэтиловом эфире</p>	<p data-bbox="2007 1070 2078 1110">[114]</p>

1	2	3	4
<p>Доксазозина мезилат (Doxazosin mesilate)</p>  <p><i>4-Амино-2-[4-[(2,3-дигидро-1,4-бензодиоксин-2-ил)карбонил]пиперазин-1-ил]-6,7-диметоксихиназолина метансульфонат</i></p>	<p>Белый или почти белый кристаллический порошок</p> <p>От белого до желтовато-белого цвета кристаллический порошок</p>	<p>Мало растворим в воде, мало растворим в метаноле, практически нерастворим в ацетоне</p> <p>Легко растворим в муравьиной кислоте, очень мало растворим в метаноле и в воде</p> <p>Легко растворим в диметилсульфоксиде, мало растворим в воде и метаноле, очень мало растворим в этаноле</p>	<p>[91,107]</p> <p>[135]</p> <p>[114]</p>
<p>Празозина гидрохлорид (Prazosin hydrochloride)</p>  <p><i>4-Амино-6,7-диметокси-2-[4-(2-фурил)пиперазин-1-ил]хиназолина гидрохлорид</i></p>	<p>Белый или почти белый порошок</p> <p>Белый кристаллический порошок</p>	<p>Очень мало растворим в воде, мало растворим в этаноле и метаноле, практически нерастворим в ацетоне</p> <p>Мало растворим в воде, метаноле, диметилформамиде и диметилацетамиде, очень мало растворим в этаноле, практически нерастворим в хлороформе и ацетоне</p> <p>Мало растворим в метаноле, очень мало растворим в этаноле и практически нерастворим в воде</p>	<p>[91,107]</p> <p>[135]</p> <p>[114]</p>

1	2	3	4
<p>Теразозин гидрохлорид дигидрат (Terazosin hydrochloride dihydrate)</p>  <p><i>1-(4-Амино-6,7-диметокси-2-хиназолинил)-4-[(тетрагидро2-фуранил)карбонил] пиперазина гидрохлорид дигидрат</i></p>	<p>Белый или слегка желтоватый, кристаллический порошок</p>	<p>Умеренно растворим в воде, мало растворим в метаноле, очень мало растворим в этаноле, практически нерастворим в ацетоне</p>	<p>[91,107]</p>
<p>Афлоквалон (Afloqualone)</p>  <p><i>6-Амино-2-фторметил-3-(2-толил)-3Н-хиназолин-4-он</i></p>	<p>От белого до светло-желтого цвета кристаллический порошок</p>	<p>Растворим в ацетонитриле, мало растворим в этаноле и практически нерастворим в воде</p>	<p>[114]</p>

1	2	3	4
<p>Метолазон (Metolazone)</p>  <p><i>7-хлор-1,2,3,4-тетрагидро-2-метил-4-оксо-3-о-толил-6-хиназолинсульфонамид</i></p>	<p>Белый или слегка желтоватый, кристаллический порошок</p>	<p>Очень мало растворим в воде, умеренно растворим в метаноле, мало растворим в этилацетате, очень мало растворим в метиленхлориде</p>	<p>[91,107,135]</p>
<p>Анагрелида гидрохлорид (Anagrelide Hydrochloride)</p>  <p><i>6,7-Дихлор-1,5-дигидроимидазо[2,1-<i>b</i>]хиназолин-2(3H)-она гидрохлорид монодигидрат</i></p>	<p>От белого до бледно-розоватого цвета порошок</p>	<p>Умеренно растворим в диметилсульфоксиде и диметилформамиде, очень мало растворим в воде</p>	<p>[135]</p>

1.3.2. Химические методы анализа

Простейшие незамещенные хиназолины являются слабыми органическими гетероциклическими основаниями [22, 82, 86, 115, 122]. Хиназолин имеет константу ионизации порядка $2 \cdot 10^{-11}$. С неорганическими кислотами хиназолин образует устойчивые одноосновные соли. Реакция образования комплекса с сулемой обычно служит для целей идентификации данных соединений. При длительном нагревании с концентрированной хлористоводородной кислотой хиназолин гидролитически расщепляется, образуя о-аминобензальдегид. Хиназолины устойчивы к окислению, однако при окислении в жестких условиях происходит разрушение бензольного кольца и образование пиримидин карбоновых кислот. Также данные вещества нитруются в положении 6 бензольного кольца [22, 82, 86, 115].

Для производных 2- и 4-алкилхиназолинов свойственны типичные реакции, связанные с наличием алкильных групп в орто- и пара-положениях по отношению к гетероциклическому атому азота. Метильная группа, занимающая это положение, должна легко конденсироваться с альдегидами, образуя винильную или замещенную винильную группу. Алкильные группы в положениях 2 и 4 хиназолинового цикла легко окисляются до карбоксильных групп [22, 82, 86, 115].

Оксопроизводные хиназолина – хиназолин-4(3*H*)-он и хиназолин-2,4(1*H*,3*H*)-дион также достаточно легко вступают в реакции электрофильного замещения, которые протекают сначала в положении 6, а затем в положении 8 бензольного ядра [22, 82, 86, 115].

Хиназолонны представляют собой высокоплавкие кристаллические соединения, не растворимые в воде и большинстве органических растворителей, но растворимые в водных щелочах. Обычно они нерастворимы в разбавленных растворах сильных кислот, но иногда растворяются в концентрированных сильных кислотах. 2- и 4-хиназолонны образуют устойчивые монохлоргидраты, хлорплатинаты, хлораураты и пикраты. Циклическая система хиназолоннов устойчива к окислению,

восстановлению и гидролизу, а другие реакции приводят к разрушению цикла [22, 82, 86, 115].

Однако согласно данным рассмотренной нормативной документации для подтверждения подлинности производных хиназолина химические реакции практически не используются, так как не дают характерного аналитического эффекта.

Среди немногочисленных способов идентификации с помощью химических реакций можно отметить следующие. Для подтверждения подлинности буназозина гидрохлорида используют реакцию кислотного гидролиза с образованием бутиловой кислоты, идентифицируемой по характерному запаху [114]. Вещества, являющиеся гидрохлоридами, дополнительно идентифицируют по хлорид-иону [91, 107, 114, 135]. Доксазозина мезилат – с помощью реакций на мезилат-ион [114].

В то же время химические методы анализа нашли применение для количественного определения фармацевтических субстанций производных хиназолина.

Производные хиназолина, проявляющие слабые основные свойства [122] алфузозина гидрохлорид ($pK_A = 7,3$) и празозина гидрохлорид ($pK_A = 7,24$), титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты в среде протогенных растворителей. Так, алфузозина гидрохлорид титруют в смеси безводной уксусной кислоты и уксусного ангидрида (1:1), а празозина гидрохлорид – безводной муравьиной кислоты и уксусного ангидрида (2:3). Конечная точка титрования при этом определяется потенциометрическим способом [91,107]. Добавление уксусного ангидрида существенно улучшает условия титрования в среде безводной уксусной кислоты за счет увеличения кислотности и диэлектрической проницаемости среды [2, 34].

Для определения буназозина гидрохлорида используют вариант обратного титрования в среде безводной уксусной кислоты, при котором избыток 0,1 М раствора хлорной кислоты оттитровывают 0,1 М раствором

натрия ацетата с потенциометрической индикацией точки эквивалентности [114].

Для количественного определения производных хиनाзолина, являющихся солями сильных кислот, также используется метод алкалометрии (вариант вытеснения слабого органического основания). Этим методом определяют теразозина гидрохлорид дигидрат в среде метанола путем титрования 0,1 М раствором натрия гидроксида с потенциометрической индикацией точки эквивалентности [114]. Доксазозина мезилат титруют в смеси диметилформамид – вода (2:1) 0,1 М раствором натрия гидроксида с индикатором фенолфталеином [73].

Также для количественного определения производных хиназолина, имеющих в 4-положении первичную аминогруппу, применяют метод нитритометрии. Этим методом определяют афлоквалон путем титрования 0,1 М раствором натрия нитрита с потенциометрической или амперометрической индикацией точки эквивалентности [114].

В литературе описан кондуктометрический метод определения альфузозина гидрохлорида, основанный на образовании ионного ассоциата с анионами тетрафенилбората [84].

1.3.3. Спектроскопические методы анализа

Спектроскопические методы анализа нашли широкое применение в анализе производных хиназолина, как в виде фармацевтических субстанций, так и лекарственных препаратов. Чаще всего используются методы спектрометрии в инфракрасной области спектра и спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях.

1.3.3.1. Спектрометрия в инфракрасной области спектра

Спектрометрия в инфракрасной области спектра – фармакопейный метод анализа, который позволяет связать параметры спектра со структурой вещества [24, 25, 26, 28]. Этот метод широко используется для установления структуры лекарственных веществ и для подтверждения их подлинности [38, 66, 113, 133, 136].

ИК-спектр представляет собой зависимость пропускания или поглощения от длины волны или частоты колебаний электромагнитного излучения. В фармацевтическом анализе выделяют следующие области исследования ИК-спектров: ближнюю область – от 780 до 2500 нм (от 0,78 до 2,5 мкм), среднюю область – от 2,5 до 25 мкм (от 4000см^{-1} до 400 см^{-1}) и дальнюю область – от 25 до 400 мкм [24, 25, 26, 28].

Наиболее часто в фармацевтическом анализе для установления подлинности субстанций лекарственных веществ используется средняя область. Это обусловлено высокой специфичностью и информативностью получаемых спектров [113, 133, 136].

Метод ИК-спектрометрии широко используется для подтверждения подлинности рассматриваемых производных хиназолина в субстанциях. Так ИК-спектры субстанций алфузозина гидрохлорида [91, 107, 135], анагрелида гидрохлорида [135], афлоквалона и буназозина гидрохлорида [114], доксазозина мезилата и празозина гидрохлорида [73, 91, 107, 114, 135], теразозина гидрохлорида и метолазона [91, 107, 135], снятые на диске с калия бромидом в диапазоне от 4000 см^{-1} до 400 см^{-1} по положению полос поглощения должны полностью соответствовать спектрам их стандартных образцов.

1.3.3.2. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой области спектра широко используется в фармацевтическом анализе [5, 9, 10, 38, 64]. Метод представлен в ведущих фармакопеях мира [26, 28, 91, 107, 114, 135]. Основные направления применения метода [8, 11]: идентификация органических соединений, количественный анализ и определение светопоглощающих примесей.

Как известно, избирательное поглощение в ультрафиолетовой и видимой областях спектра обусловлено присутствием групп-хромофоров.

Также на положение полос поглощения влияет наличие р,π-сопряжения хромофоров с ауксохромными группировками [5, 10, 38, 64, 82].

В нормативной документации метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой области спектра применяется для подтверждения подлинности субстанций лекарственных веществ производных хиназолина.

В таблице 3 приведены условия и спектральные характеристики производных хиназолина в УФ-области, используемые для подтверждения их подлинности.

Таблица 3 – Спектральные характеристики в УФ-области лекарственных веществ производных хиназолина

Лекарственное вещество	Растворитель	Спектральные характеристики	Ссылка
Афлоквалон	Этанол	Совпадение со спектром стандартного образца	[114]
Буназозина гидрохлорид	0,01 М НСl	Совпадение со спектром стандартного образца	[114]
Доксазозина мезилат	Метанол – 0,01 М НСl	$\lambda_{\max} = 246, 330$ и 342 нм $\lambda_{\min} = 226$ и 293 нм <i>Плечи:</i> в интервалах $278 - 282$ нм и $316 - 322$ нм	[73]
	Метанол – 0,01 М НСl	Совпадение со спектром стандартного образца	[114]
Празозина гидрохлорид	Метанол – 0,01 М НСl	При $\lambda_{\max} = 247$ нм $A_{1\text{см}}^{1\%} = 1320 - 1400$ При $\lambda_{\max} = 330$ нм $A_{1\text{см}}^{1\%} = 260 - 280$ При $\lambda_{\max} = 343$ нм $A_{1\text{см}}^{1\%} = 240 - 265$	[91, 107]
	Метанол – 0,01 М НСl	Совпадение со спектром стандартного образца	[114]
Метолазон	Метанол	Совпадение со спектром стандартного образца	[135]

В зарубежной литературе также имеются сведения о применении различных вариантов спектрофотометрии для количественного определения производных хиназолина в субстанциях и лекарственных формах.

Спектрофотометрия в УФ-области используется для количественного определения таблеток доксазозина мезилата в среде 0,01 М HCl при 245 нм (в диапазоне концентраций 2–10 мкг/мл) [98], метолазона в субстанции и таблетках в среде 0,1 М NaOH при 236,5 нм (в диапазоне концентраций 2–12 мкг/мл) [87], празозина гидрохлорида в субстанции и таблетках в среде метанола при 246 нм (в диапазоне концентраций 5–80 мкг/мл) [129].

Для количественного определения производных хиназолина также используется экстракционно-фотометрический метод [11].

Так, алфузолина гидрохлорид в субстанции и лекарственных препаратах определяли путем экстракции в виде комплексов ионных пар (ионных ассоциатов) с красителями бромкрезоловым фиолетовым, бромфеноловым синим и бромтимоловым синим при 407, 413 и 412 нм соответственно [85]. Доксазозина мезилат в таблетках определяли путем образования комплекса ионных пар с эозином в ацетатном буфере при 547 нм [81]. Празозина гидрохлорид определяли по реакции образования азокрасителя с натриевой солью 1,2-нафтохинон-4-сульфоновой кислоты [128], после экстракции смесью хлороформ – н-бутанол (3:1) измеряли поглощение при 400 нм, а также на образовании бинарного комплекса с красителем бенгальским розовым при 572 нм [104]. Бромфеноловый синий использовали для определения теразозина гидрохлорида в таблетках после экстракции образовавшегося комплекса хлороформом [130].

В анализе производных хиназолина нашел применение и метод производной спектрофотометрии. Производную первого порядка использовали при количественном определении алфузолина в субстанции и лекарственных препаратах [99]. Производную спектрофотометрию первого и второго порядка использовали для одновременного определения метолазона и рамиприла в комбинированной лекарственной форме при 285 нм и 212 нм в среде метанола [131], одновременной оценки двухкомпонентной лекарственной смеси метолазона и спиронолактона [137], теразозина гидрохлорида в таблетках [132].

1.3.4. Хроматографические методы анализа

Хроматографические методы анализа занимают важное место в стандартизации и контроле качества фармацевтических препаратов, в том числе и производных хиназолина.

1.3.4.1. Метод тонкослойной хроматографии

Метод тонкослойной хроматографии [26, 28, 91, 107, 114, 135] является фармакопейным в странах Европы, США, Японии и Российской Федерации.

Японская фармакопея при определении посторонних примесей в субстанции доксазозина мезилата методом ТСХ рекомендует подвижную фазу: вода–уксусная кислота–4-метил-2-пентанон [114].

С помощью метода ТСХ подтверждают подлинность субстанции празозина гидрохлорида, используя подвижную фазу: диэтиламин–этилацетат [91, 107, 135].

1.3.4.2. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

Высокоэффективная жидкостная хроматография – инструментальный метод анализа, с помощью которого происходит разделение смеси веществ, переносимых под давлением с помощью подвижной фазы (в качестве которой выступает жидкость) по колонке, заполненной неподвижной фазой–сорбентом [19, 69, 75]. Общие фармакопейные статьи по ВЭЖХ представлены во всех ведущих фармакопеях мира [26, 28, 91, 107, 114, 135].

Анализ отечественной и зарубежной НД показал, что основными способами применения ВЭЖХ при контроле качества производных хиназолина являются: подлинность, количественный анализ и определение примесей.

Примеры и условия использования метода ВЭЖХ в контроле качества производных хиназолина приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Использование метода ВЭЖХ в контроле качества производных хиназолина

Лекарственное вещество	Форма выпуска	Показатель	Условия проведения	Ссылка
1	2	3	4	5
Алфузозина гидрохлорид	Субстанция	Посторонние примеси	<i>Подвижная фаза:</i> тетрагидрофуран–ацетонитрил–раствор натрия перхлората <i>Скорость потока:</i> 1,5 мл/мин <i>Детектор:</i> УФ, 254 нм	[91, 107]
		Посторонние примеси Количественное определение		[135]
	Таблетки	Подлинность Посторонние примеси Количественное определение		[91, 135]
Анагрелида гидрохлорид	Субстанция, капсулы	Подлинность Посторонние примеси Количественное определение	<i>Подвижная фаза:</i> ацетонитрил–фосфорный буфер <i>Скорость потока:</i> 1,2 мл/мин <i>Детектор:</i> УФ, 254 нм	[135]
Афлоквалон	Субстанция	Посторонние примеси	<i>Подвижная фаза:</i> ацетонитрил–фосфорный буфер <i>Детектор:</i> УФ, 254 нм	[114]
Буназозина гидрохлорид	Субстанция	Посторонние примеси	<i>Подвижная фаза:</i> р-р лаурилсульфата натрия–уксусная кислота–ацетонитрил <i>Детектор:</i> УФ, 254 нм	[114]

1	2	3	4	5
Доксазозина мезилат	Субстанция	Родственные примеси	<i>Подвижная фаза:</i> ацетатный буфер–метанол <i>Скорость потока:</i> 1,0 мл/мин <i>Детектор:</i> УФ, 254 нм	[73]
		Посторонние примеси Количественное определение	<i>Подвижная фаза А:</i> 1% фосфорная кислота <i>Подвижная фаза В:</i> 1% фосфорная кислота–ацетонитрил <i>Скорость потока:</i> 0,8 мл/мин <i>Детектор:</i> УФ, 210 нм	[91, 107]
		Количественное определение	<i>Подвижная фаза:</i> 0,05 М калия дигидрофосфат–метанол–ацетонитрил <i>Детектор:</i> УФ, 246 нм	[114]
		Подлинность Посторонние примеси Количественное определение	<i>Подвижная фаза:</i> фосфорная кислота–ацетонитрил–вода <i>Скорость потока:</i> 0,8 мл/мин <i>Детектор:</i> УФ, 210 нм	[135]
Празозина гидрохлорид	Субстанция	Посторонние примеси	<i>Подвижная фаза:</i> метанол–раствор натрия пентансульфоната и тетраметиламмония гидроксида <i>Скорость потока:</i> 1,0 мл/мин <i>Детектор:</i> УФ, 254 нм	[91, 107, 114, 135]

1	2	3	4	5
Метолазон	Субстанция	Посторонние примеси Количественное определение	<i>Подвижная фаза А:</i> р-р калия дигидрофосфата <i>Подвижная фаза В:</i> метанол <i>Скорость потока:</i> 1,5 мл/мин <i>Детектор:</i> УФ, 230 нм	[91, 107]
		Подлинность Посторонние примеси Количественное определение	<i>Подвижная фаза:</i> фосфатный буферный раствор с рН 3,0–метанол–ацетонитрил <i>Скорость потока:</i> 1,0 мл/мин <i>Детектор:</i> УФ, 230 нм	[135]
	Таблетки	Количественное определение	<i>Подвижная фаза:</i> фосфатный буферный раствор с рН 3,0–метанол–ацетонитрил <i>Скорость потока:</i> 1,1 мл/мин <i>Детектор:</i> УФ, 235 нм	[135]
Теразозина гидрохлорид	Субстанция	Посторонние примеси	<i>Подвижная фаза:</i> триэтиламин– ацетонитрил–цитратный буфер <i>Скорость потока:</i> 1,0 мл/мин	[91, 107]
		Подлинность Количественное определение	<i>Подвижная фаза:</i> ацетонитрил– цитратный буфер <i>Скорость потока:</i> 1,0 мл/мин <i>Детектор:</i> УФ, 254нм	[135]
	Таблетки, капсулы	Подлинность Количественное определение	<i>Подвижная фаза:</i> ацетонитрил– вода–ледяная уксусная кислота <i>Скорость потока:</i> 2,5 мл/мин <i>Детектор:</i> УФ, 254нм	[135]

Как следует из данных таблицы 4, метод ВЭЖХ получил наиболее широкое применение в монографиях USP. При анализе субстанций производных хиназолина данный метод используется для подтверждения подлинности, определения посторонних примесей и количественного определения.

BP и EP предлагают методики ВЭЖХ для определения посторонних примесей в субстанциях производных хиназолина, а также для количественного определения доксазозина мезилата и метолазона.

JP рекомендует использование метода ВЭЖХ для определения посторонних примесей в субстанциях буназозина гидрохлорида, празозина гидрохлорида и афлоквалона, а также количественного определения доксазозина мезилата.

В зарубежной литературе описаны методики количественного определения производных хиназолина в субстанциях и лекарственных препаратах. Для количественного определения алфузозина гидрохлорида в фармацевтических препаратах разработана методика высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой [118], мобильную фазу (тетрагидрофуран – ацетонитрил–буфер с pH 3,5) закачивали со скоростью потока 1,5 мл/мин, а элюирование контролировали при 254 нм [89].

Для определения доксазозина мезилата в фармацевтических препаратах была разработана методика ВЭЖХ на колонке Chromolith RP-C18 [121] с использованием смеси фосфатного буфера и метанола, детектировали при 251 нм, время удерживания препарата составляло 3,8 мин [95].

Методика жидкостной хроматографии высокого давления с обращенной фазой была разработана для количественной оценки доксазозина мезилата в таблетках. Анализ проводили на Phenomenex C18 (250 мм x 4,6 мм, 5 мкм) [121] с подвижной фазой, состоящей из ацетонитрила и триэтиламина, доведенной до pH 3,5 ортофосфорной кислотой при скорости потока 1,0 мл/мин. Детектирование проводили при 254 нм. В качестве внутреннего стандарта был использован празозин. Время удерживания

доксазозина мезилата и празозина составляло 3,5 и 4,7 мин соответственно [119].

Для определения анагрелида гидрохлорида в субстанции и дозированной лекарственной форме была разработана методика обратной фазовой жидкостной хроматографии с использованием колонки Inertsil ODS-3V C18 (150 × 4,6 мм, 5 мкм) [121], с подвижной фазой 0,1% раствор триэтиламина и ацетонитрил с изократическим элюированием при скорости потока 1 мл/мин [120]. Было установлено, что время удерживания анагрелида гидрохлорида составляет 6,985 мин. Предлагаемый способ давал хорошее разрешение анагрелида гидрохлорида и продуктов его разложения.

Для анализа метолазона в субстанции и фармацевтических препаратах разработана методика с мобильной фазой из смеси буфера, метанола и ацетонитрила в соотношении 65:28:7. Анализ проводили при длине волны 235 нм со скоростью потока 1,1 мл/мин, время удерживания метолазона равно 12,568 мин [134].

Простая и точная методика с обращенной фазой разработана для определения эрлотиниба в лекарственных формах. Использовали колонку Merck C18 с подвижной фазой [121], состоящей из дигидрофосфата калия и ацетонитрила с рН 5,0 [96]. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин, длина волны детектирования 246 нм, время удерживания эрлотиниба составляло 4,54 мин.

В работе [88] описана методика ВЭЖХ для определения празозина, теразозина и доксазозина в присутствии продуктов их разложения с использованием колонки C-18 [121]. В качестве подвижной фазы для празозина и теразозина использовалась смесь: вода–ацетонитрил–метанол–ледяная уксусная кислота–диэтиламин и ацетонитрил–вода–ледяная уксусная кислота–диэтиламин для доксазозина. Обнаружение проводилось при 254 нм.

Таким образом, современные публикации показывают перспективность использования метода ВЭЖХ для анализа производных хиназолина в

субстанциях и лекарственных препаратах. С использованием различных вариантов метода ВЭЖХ возможно проводить идентификацию, количественное определение и определение родственных примесей.

1.3.4.3. Метод газовой хроматографии

В основе метода газовой хроматографии лежит принцип разделения летучих соединений при распределении веществ между двумя фазами: подвижной – инертным газом или паром и неподвижной – твердый сорбент или жидкость, нанесенная на твердый носитель или внутренние стенки колонки [14, 49, 56].

В зарубежных фармакопеях описаны варианты и условия использования метода парофазной газовой хроматографии в предельных и количественных тестах определения остаточных органических растворителей в различных объектах [91, 107, 114, 135]. При определении остаточных растворителей в веществах растворимых в воде, навеску испытуемого образца растворяют в воде. Во втором варианте проподготовки, для веществ нерастворимых в воде, навеску испытуемого образца растворяют в N,N-диметилформамиде. При контроле содержания N,N-диметилформамида, навеску испытуемого образца растворяют в 1,3-диметил-2-диметил-2-имидазолидоне.

При проведении хроматографического анализа используют: колонку кварцевую капиллярную 30 м x 0,32 мм или 30 м x 0,53 мм; газ-носитель – азот или гелий; пламенно-ионизационный детектор; температура блока ввода проб – 140 °С; температура детектора – 250 °С.

Следует отметить, что для определения остаточных растворителей могут быть использованы также и другие валидированные методики.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. Анализ литературных данных показал актуальность исследований по созданию новых эффективных и безопасных ноотропных препаратов. Одним из перспективных их представителей является синтезированное в НИИ фармакологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России производное хиназолин-4(3*H*)-она – VMA-10-13. Для внедрения в медицинскую практику необходимо глубокое исследование физико-химических свойств, а также обоснование и разработка методик анализа для его стандартизации.

2. Литературные данные по методам анализа производных хиназолина свидетельствуют о том, что для определения подлинности ЛС производных хиназолина наиболее часто используются методы ИК-спектromетрии, УФ-спектрофотометрии, ТСХ и ВЭЖХ.

3. При определении чистоты ЛС производных хиназолина используются методы ТСХ и ВЭЖХ (родственные примеси), а также метод ГХ (остаточные органические растворители).

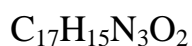
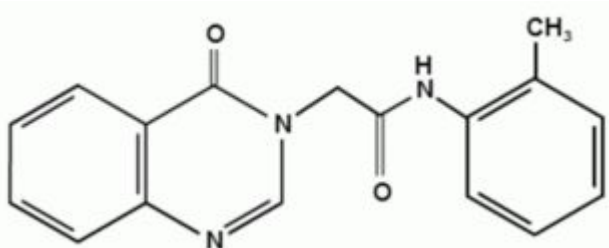
4. В количественном анализе фармацевтических субстанций производных хиназолина отдается предпочтение методам неводного титрования и ВЭЖХ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика объектов, вспомогательных материалов, оборудования и реактивов

Объектами исследований являлись образцы субстанции нового БАС обладающего ноотропной и противогипоксической активностью:



М.м. 293,33

По химической структуре субстанция относится к производным хиназолина: 3-[2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил]-хиназолин-4(3*H*)-он (лабораторный шифр VMA-10-13).

Также в нашем распоряжении имелись образцы исходных продуктов синтеза VMA-10-13, которые могут присутствовать в субстанции в виде родственных примесей: незамещенный хиназолин-4(3*H*)-он и 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамид.

В качестве стандартного образца (СО) использовалась субстанция VMA-10-13, дважды перекристаллизованная из диметилформамида. Хроматографическая чистота СО была установлена в ходе разработки методики определения родственных примесей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (раздел 3.4.2). Количественное содержание VMA-10-13 в СО было определено методом кислотно-основного титрования в неводных средах (раздел 3.6.1) и составило $99,85 \pm 0,20$ %.

Образцы пяти опытных (лабораторных) серий субстанции VMA-10-13 были синтезированы в НИИ фармакологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Все исследования проводились на пяти сериях субстанций. Изучение физико-химических свойств и разработку методик анализа проводили на

кафедре фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Твердая дозированная лекарственная форма - таблетки «Хиназотроп» изготовлена в лаборатории твердых лекарственных форм кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России под руководством профессора А.М. Шевченко. При разработке технологии таблеток использовали вспомогательные вещества, разрешенные к медицинскому применению и отвечающие требованиям соответствующих НД.

2.1.1. Оборудование

В экспериментальной части диссертационной работы нами были использованы следующие приборы и оборудование:

Спектрофотометр СФ-104 с программным обеспечением UVWIN для Windows («Аквилон», г. Москва);

Хроматографическая система для ВЭЖХ «Стайер» (компания «Аквилон», Россия);

Колонка Luna C-18, 4,6*150 мм с размером частиц 5 мкм;

рН-метр-иономер «Эксперт-001»;

Инфракрасный спектрофотометр ФУРЬЕ – ФСМ 1201;

Весы лабораторные ВЛ-124 (НПП0.005.004 РЭ);

Прибор для определения температуры плавления ПТП(М);

Облучатель хроматографический УФС 254/365 (ЗАО «Сорбполимер», г. Краснодар);

Пластинки для хроматографирования «Сорбфил» ПТСХ-П-А-УФ аналитические размером 10×10 ТУ-26-11-17-89;

Центрифуга лабораторная с принадлежностями SIGMA 2-16P («Сигма Лаборцентрифуген ГмбХ», Германия);

Ультразвуковая ванна Jeken PS-20 (3,2 л);

Бензиловый спирт	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Бутанол	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Вода очищенная	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Гексан	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Гептан	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Диметилформаид	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Диметилсульфоксид	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Диэтиламин	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Изопропанол	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Метанол	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Муравьиная кислота	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Нитробензол	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Пиридин	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Пропанол	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Спирт изопропиловый	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Спирт этиловый 96%	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Спирт метиловый	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Толуол	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Уксусный ангидрид	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Уксусная кислота безводная	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Хлороформ	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Циклогексан	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Четырёххлористый углерод	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Этилацетат	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Эфир	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15

2.1.3. Реактивы

Реактивы, использованные для работы:

Азотная кислота концентрированная	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Реактив Фреде	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15

Реактив Драгендорфа	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Аммония ванадата раствор 0,5 % в серной кислоте концентрированной	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Реактив Марки	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Кобальта нитрата раствор 5%	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Железа(III) хлорида раствор 3%	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Серебра нитрата раствор 2%	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Йод	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Реактив Ван-Урка	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Фосфорной кислоты раствор 0,05М	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15

2.1.4. Титрованные растворы

Титрованные растворы, использованные для работы:

0,1 М раствор хлорной кислоты	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0002.15
0,1 М раствор натрия гидроксида	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0002.15
0,1 М раствор хлористоводородной кислоты	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0002.15
0,01 М раствор натрия гидроксида	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0002.15
0,01 М раствора хлористоводородной кислоты	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0002.15

2.1.5. Индикаторы

Индикаторы, использованные для работы:

Фенолового красного раствор 0,1 %	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15
Метилового красного спиртовой раствор 0,1%	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.3.0001.15

Реактивы и титрованные растворы, использованные при разработке методик, описаны в ГФ XIV, том 1.

2.2. Методы исследования

Исследования субстанции проводили с помощью следующих методов анализа описанных в ГФ XIV, том 1.

ОФС.1.1.0006.15. Фармацевтические субстанции.

Описание. Раздел составлен в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 1, ОФС.1.1.0006.15.

Растворимость субстанции VMA-10-13 проводили с учетом требований ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0005.15.

Температуру плавления определяли капиллярным методом в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0011.18.

Определение *pH-раствора* проводили в соответствии с требованиями XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0004.15 *Ионометрия.*

Потерю в массе при высушивании определяли в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0010.15.

Сульфатную золу и тяжелые металлы определяли по методикам ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.2.2.0014.15; ОФС.1.2.2.2.0012.15.

Хлориды определяли согласно требованиям ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.2.2.0009.15.

Спектрометрия в инфракрасной области выполнялась на ИК- спектрофотометре ФУРЬЕ – ФСМ 1201 в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.1.0002.15.

Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях выполнялась в соответствии с требованиями с ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.1.0003.15.

Тонкослойную хроматографию определяли восходящим методом согласно требованиям ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.2.0003.15.

Анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии проводили в соответствии с ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.2.0005.15.

Остаточные органические растворители определяли в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 1, ОФС.1.1.0008.15, методом газовой хроматографии в соответствии с ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.2.0004.15.

Кислотно-основное титрование в неводных средах проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.3.0014.15.

Потенциометрическое титрование субстанции VMA-10-13 проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.19.0002.15. Определяли с помощью рН-метра-иономера «ЭКСПЕРТ–001» с комбинированным стеклянным электродом ЭСК-10605.

Валидацию методик осуществляли в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 1, ОФС.1.1.0012.15.

Статистическую обработку результатов химического эксперимента проводили с помощью компьютерной программы Excel 2010 (Microsoft Office 2010) версия 14.0.7015.1000 Standard (июль 2013) в соответствии с ГФ XIV, том 1, ОФС.1.1.0013.15.

Исследования таблеток «Хиназотроп» проводили в соответствии с требованием ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.1.0015.15 *Таблетки*.

Внешний вид таблеток определяли в соответствии с ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.1.0015.15.

Однородность массы дозированных лекарственных форм для таблеток «Хиназотроп» проводили в соответствии с ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.2.0009.15.

Распадаемость таблеток «Хиназотроп» проводили в соответствии с ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.2.0013.15.

Однородность дозирования проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.2.0008.18.

Растворение таблеток «Хиназотроп» проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.2.0014.15 на приборе «Вращающаяся корзинка».

Сроки годности лекарственного средства устанавливали в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 1, ОФС.1.1.0009.18.

ГЛАВА 3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА СУБСТАНЦИИ VMA-10-13

Одним из основных этапов создания нового ЛС является изучение его физико-химических свойств, на основе которых проводится разработка методик фармацевтического анализа и нормирование показателей его качества.

3.1. Определение основных физико-химических показателей качества субстанции VMA-10-13

В соответствии с требованиями ОФС.1.1.0006.15 [28], основными физико-химическими показателями качества фармацевтических субстанций являются: «Описание», «Растворимость», «Температура плавления», «рН и Кислотность или щелочность», «Прозрачность раствора, цветность раствора», «Потеря в массе при высушивании», «Сульфатная зола», «Удельный показатель поглощения».

Испытание «Прозрачность раствора, цветность раствора» нами было исключено, так как прогнозируемой лекарственной формой VMA-10-13 являются таблетки.

3.1.1. Описание

В соответствии с ОФС.1.1.0001.15 [28], все 5 лабораторных серий субстанции VMA-10-13 представляют собой: аморфный порошок белого цвета с розоватым оттенком, со слабым характерным запахом [51].

3.1.2. Определение растворимости

Растворимость определяли с учетом требований ОФС.1.2.1.0005.15 [28]. При определении растворимости [51] использовали растворители разной полярности с различным значением диэлектрической проницаемости (ϵ) [44]. Результаты исследования представлены в таблице 5.

В проект НД на субстанцию VMA-10-13 нами включено определение растворимости в растворителях с широким диапазоном полярности: в воде (очень мало растворим), в спирте 96% (мало растворим), в хлороформе (практически нерастворим).

Таблица 5 – Результаты определения растворимости субстанции VMA-10-13

Растворитель	ϵ	Растворимость в частях	Растворимость в терминах ГФ XIV
Спирт 96%	27	1: 1000	Мало растворим
Вода	80	1: 10000	Очень мало растворим
Диметилформаид	37	1: 90	Умеренно растворим
Диметилсульфоксид	45	1:100	Умеренно растворим
Муравьиная кислота	57	1:30	Растворим
0,1 М раствор хлористоводородной кислоты	-	1: 10000	Очень мало растворим
0,1 М раствор натрия гидроксида	-	1: более 10000	Практически нерастворим
Хлороформ	5,1	1: более 10000	Практически нерастворим
Ацетон	21,3	1: более 10000	Практически нерастворим
Ацетонитрил	38	1: более 10000	Практически нерастворим

3.1.3. Определение температуры плавления

Определение температуры плавления по ОФС.1.2.1.0011.18 [28] проводили капиллярным методом с помощью прибора ПТП (таблица 6).

Таблица 6 – Результаты определения температуры плавления

Серия	№ опыта	Температура плавления, °С	Среднее значение, °С (с разложением)
001	1	257 – 259	257,3 – 259,3 ($\Delta\bar{X} = \pm 1,4$)
	2	258 – 260	
	3	257 – 259	
002	1	259 – 260	259,3 – 260,7 ($\Delta\bar{X} = \pm 1,4$)
	2	260 – 261	
	3	259 – 261	
003	1	258 – 261	257,7 – 260,7 ($\Delta\bar{X} = \pm 1,4$)
	2	257 – 260	
	3	258 – 261	
004	1	258 – 260	258,0 – 260,0 ($\Delta\bar{X} = \pm 2,5$)
	2	259 – 261	
	3	257 – 259	
005	1	257 – 259	257,3 – 259,3 ($\Delta\bar{X} = \pm 1,4$)
	2	257 – 259	
	3	258 – 260	

Полученные результаты позволили нормировать интервал температуры плавления субстанции VMA-10-13 от 257 до 261 °С (с разложением) [51].

3.1.4. Определение рН и кислотности или щелочности

Так как субстанция VMA-10-13 очень мало растворима в воде для определения рН готовили водную вытяжку. Измерение рН водной вытяжки субстанции потенциометрическим методом (ОФС.1.2.1.0004.15) [28], проводили на 5 лабораторных сериях субстанции (таблица 7).

Таблица 7 – Результаты определения рН раствора субстанции VMA-10-13

Серия	№ опыта	рН-раствора	Среднее значение
001	1	6,96	6,96 ± 0,02
	2	6,95	
	3	6,97	
002	1	6,85	6,85 ± 0,04
	2	6,87	
	3	6,84	
003	1	6,90	6,90 ± 0,01
	2	6,90	
	3	6,89	
004	1	6,80	6,80 ± 0,04
	2	6,82	
	3	6,79	
005	1	6,95	6,96 ± 0,01
	2	6,96	
	3	6,96	

Согласно современным требованиям, проведение прямого измерения рН для контроля протолитических примесей, является предпочтительным только в тех случаях, когда раствор вещества проявляет буферные свойства. В остальных случаях предпочтительно проведение кислотно-основного титрования (кислотность или щелочность) [63]. Испытание кислотность или щелочность применяется также в том случае, если исследуемая субстанция не гидролизуется или нерастворима в воде [62].

Так как исследуемая субстанция не гидролизуется, очень мало растворима в воде и не имеет буферных свойств, для определения

содержания протолитических примесей в проект НД нами было включено испытание «Кислотность или щелочность».

Исходя из полученного значения рН (таблица 7), для определения показателя «Кислотность или щелочность» мы использовали индикатор – 0,1% раствор фенолового красного (переход окраски от желтой к красной в интервале рН 6,8 – 8,4).

Для приготовления испытуемого раствора 1,5 г субстанции взбалтывали в течение 15 мин с 30 мл воды очищенной, свободной от углерода диоксида, и фильтровали через бумажный фильтр. Далее определение проводили следующим образом. К 20 мл фильтрата прибавляли 0,05 мл 0,1 % раствора фенолового красного. При появлении желтого окрашивания (избыточная кислотность) раствор титровали 0,01 М раствором натрия гидроксида до красного окрашивания. При появлении красного окрашивания (избыточная щелочность) раствор титровали 0,01 М раствором хлороводородной кислоты до желтого окрашивания.

Результаты титрований 5 лабораторных серий субстанции VMA-10-13 приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты определения кислотности или щелочности

Серия	$V_{0,01 \text{ M NaOH}}$, мл	$V_{0,01 \text{ M HCl}}$, мл
001	0,05	-
002	0,10	-
003	0,10	-
004	0,05	-
005	0,05	-

На основании полученных результатов установлено нормативное требование и предложена методика определения «Кислотности или щелочности» субстанции VMA-10-13 (приложение 2).

3.1.5. Определение потери в массе при высушивании

Определение проводили по методике ОФС.1.2.1.0010.15 [28] (способ 1): около 0,5 г (точная навеска) субстанции VMA-10-13 в бюксах помещали в сушильный шкаф и высушивали при 100 ± 5 °С, до постоянной массы, результаты приведены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты определения потери в массе при высушивании

Серия	Навеска, г	Потеря в массе, %	Среднее значение, %
001	0,5191	0,366	$0,368 \pm 0,006$
	0,5172	0,367	
	0,5122	0,371	
002	0,5068	0,316	$0,319 \pm 0,008$
	0,5023	0,319	
	0,4967	0,322	
003	0,5041	0,357	$0,354 \pm 0,007$
	0,5071	0,355	
	0,5125	0,351	
004	0,5016	0,339	$0,336 \pm 0,007$
	0,5098	0,333	
	0,5051	0,337	
005	0,5193	0,193	$0,191 \pm 0,005$
	0,5234	0,191	
	0,5307	0,188	

Из полученных результатов следует, что нормируемая величина потери в массе при высушивании – не более 0,5%.

3.1.6. Сульфатная зола и тяжелые металлы

Испытания проводили по ОФС.1.2.2.2.0014.15 и ОФС.1.2.2.2.0012.15 [28]. Из полученных результатов (таблица 10) следует, что содержание сульфатной золы из навески 1 г субстанции VMA-10-13 во всех испытаниях не превышала 0,05 %, кроме того, исследуемая субстанция выдерживала испытания на тяжелые металлы в сравнении с 2 мл эталона (5 мкг/мл свинец-иона).

На основании полученных результатов установлены нормативные требования: сульфатная зола - не более 0,1%, тяжелые металлы - не более 0,001% в субстанции.

Таблица 10 – Результаты определения содержания сульфатной золы

Серия	Навеска, г	Сульфатная зола, %	Среднее значение, %	Тяжелые металлы
001	1,1192	0,0447	$0,0445 \pm 0,0004$	Не превышает эталон
	1,1257	0,0444		
	1,1278	0,0443		
002	1,0166	0,0393	$0,0395 \pm 0,0004$	Не превышает эталон
	1,0093	0,0396		
	1,0107	0,0396		
003	0,9178	0,0218	$0,0218 \pm 0,0003$	Не превышает эталон
	0,9137	0,0219		
	0,9241	0,0216		
004	1,1195	0,0357	$0,0358 \pm 0,0002$	Не превышает эталон
	1,1178	0,0358		
	1,1137	0,0359		
005	1,2618	0,0238	$0,0239 \pm 0,0004$	Не превышает эталон
	0,8316	0,0241		
	1,2496	0,0240		

3.1.7. Определение примеси неорганических анионов (хлориды)

Выбор контролируемых анионов определяется технологией получения субстанции. Так как одним из исходных веществ синтеза VMA-10-13 является 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамид, в проект НД нами был включен раздел по определению показателя «Хлориды». Определение проводили по методике ОФС.1.2.2.2.0009.15 [28]. Содержание хлоридов в эталонном растворе – 2 мкг/мл, что соответствует содержанию примеси в субстанции не более 0,01% (приложение 2).

3.2. Исследование спектральных свойств VMA-10-13

Спектроскопические методы занимают одно из важнейших мест при подтверждении подлинности и количественном анализе ЛС. В целях всестороннего изучения свойств 3-[2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил]-хинозолин-4(3H)-она были исследованы его УФ- и ИК-спектры, а также возможность использования полученных данных при разработке методик оценки качества субстанции VMA-10-13.

3.2.1. Спектрометрия в инфракрасной области

Метод ИК-спектрометрии широко используется для идентификации субстанций, так как совокупность всех полос поглощения ИК-спектра вещества определяет его индивидуальность [66, 113, 133, 136].

ИК-спектры были измерены для дисков, содержащих 1 мг СО VMA-10-13 и 200 мг калия бромиды, которые получали в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.1.0002.15, на приборе инфракрасный спектрофотометр ФУРЬЕ - ФСМ 1201 (рисунки 2 и 3).

В результате проведенных исследований нами были идентифицированы полосы поглощения [66, 70, 136]:

- вторичной амидной группы при $1680 - 1630 \text{ см}^{-1}$;
- в области 1658 см^{-1} полоса поглощения группы $\text{C}=\text{N}$ в цикле;
- в области 1174 см^{-1} полоса поглощения 1,2-замещенного бензольного кольца;
- пиримидиновой группы при $1580 - 1520 \text{ см}^{-1}$;
- в области 759 см^{-1} полосы поглощения относящиеся к конденсированным ароматическим группам 4-аминохиназолина;
- в области 1324 см^{-1} – относящиеся к азотсодержащим группам у бензольного кольца;
- слабых полос в области $1100-1200 \text{ см}^{-1}$, которые являются следствием деформационных колебаний $\text{C}-\text{N}$ связей;
- в области 2845 см^{-1} полоса поглощения валентных колебаний $\text{C}-\text{H}$ связи в CH_3- , CH_2- и $\text{CH}-$ группах;
- в области $3186-3295 \text{ см}^{-1}$ полосы поглощения соответствуют валентным колебаниям меж- и внутримолекулярных связей NH -групп.

По положению и интенсивности полос поглощения ИК-спектры всех 5 лабораторных серий субстанции VMA-10-13 были практически идентичны со спектром СО.

В связи со специфичностью в фармакопейном анализе ИК-спектра [113, 133], как способа идентификации любого соединения, спектральные

характеристики включены в проект НД на субстанцию VMA-10-13 (приложение 2).

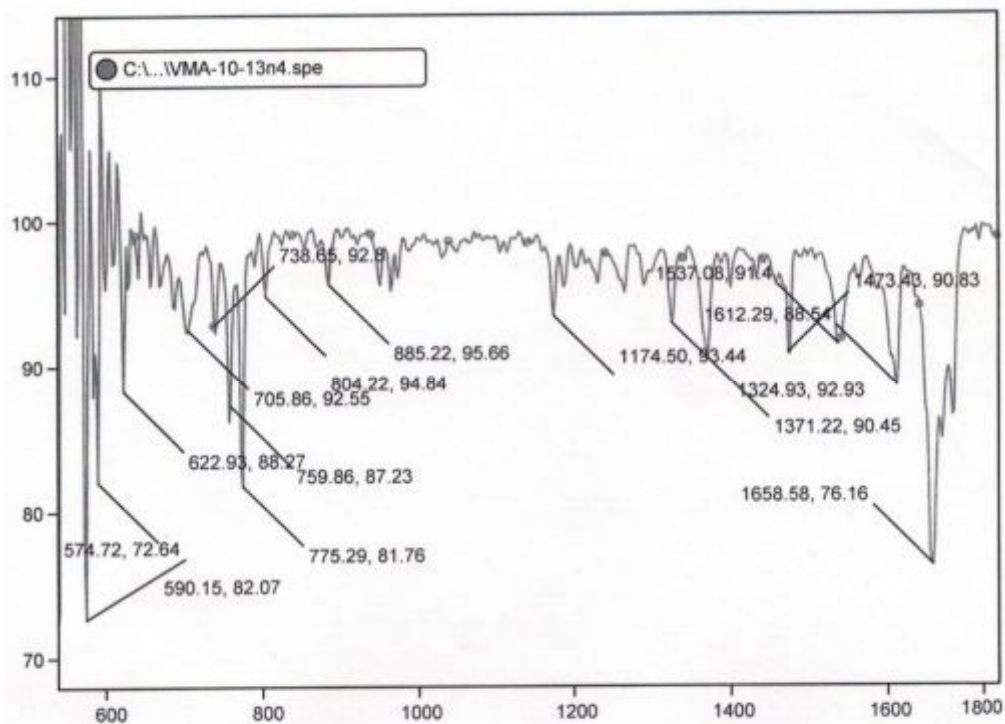


Рисунок 2 – ИК-спектр VMA-10-13 в области 600 – 1800 см⁻¹

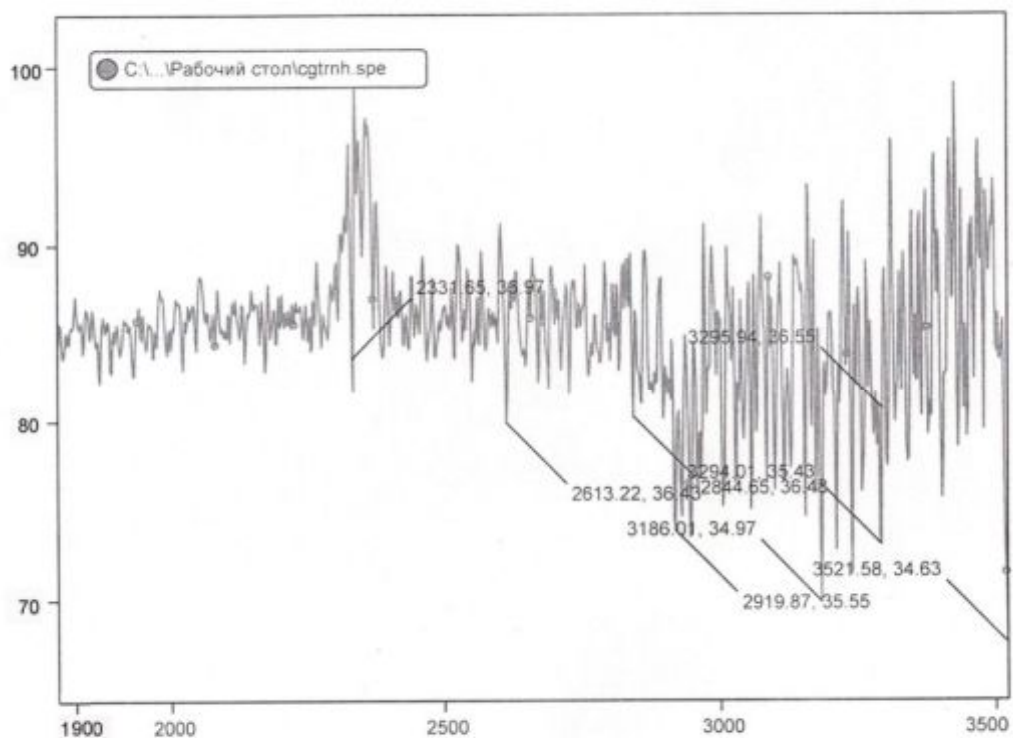


Рисунок 3 – ИК-спектр VMA-10-13 в области 1900 – 3500 см⁻¹

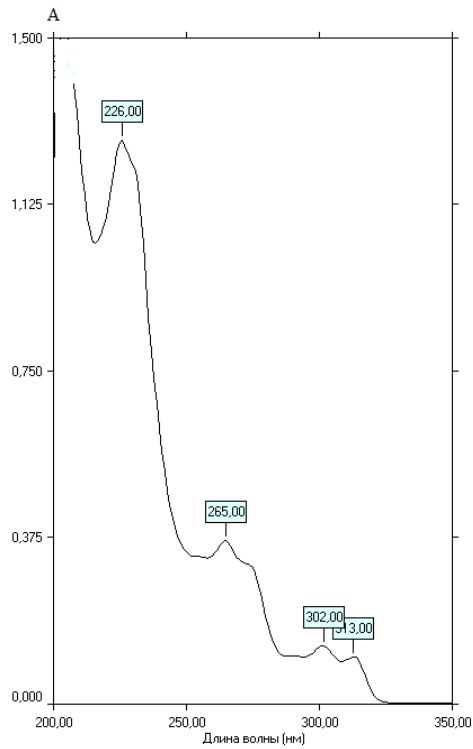
3.2.2. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой области

УФ-спектрофотометрия позволяет получить важную информацию об исследуемом веществе, что делает её одним из наиболее распространенных методов исследования органических соединений. В связи с этим, мы исследовали УФ-спектры поглощения VMA-10-13 и определили их некоторые параметры.

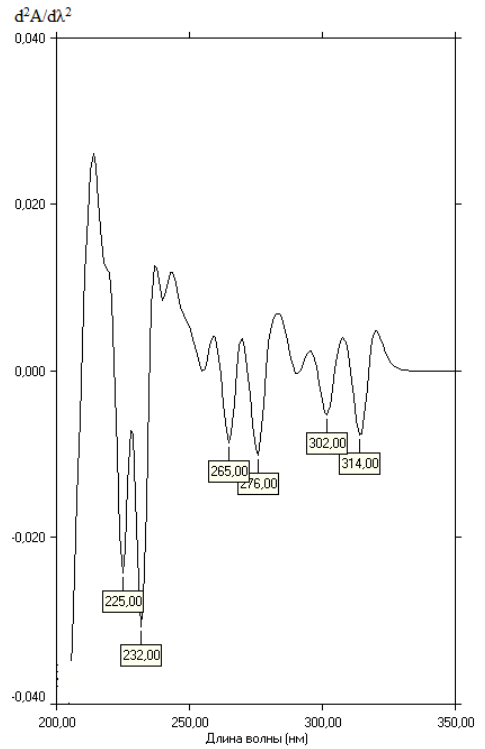
3.2.2.1. Исследование УФ-спектров поглощения VMA-10-13

Нами были исследованы УФ-спектры VMA-10-13 в спирте 96%, воде очищенной, 0,1 М растворе натрия гидроксида и 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты. Для приготовления испытуемых растворов 0,05 г СО VMA-10-13 (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта 96%, помещали на ультразвуковую баню на 15 мин, доводили объем раствора тем же растворителем до метки. По 1 мл полученного раствора переносили в четыре мерные колбы вместимостью 50 мл и доводили объем до метки спиртом 96%, водой очищенной, 0,1 М раствором натрия гидроксида и 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты.

Спектры поглощения полученных растворов измеряли в области 210–350 нм. Результаты исследования УФ-спектров поглощения спиртовых, нейтральных и щелочных растворов VMA-10-13 (рисунки 4 – 6) показали наличие четырех полос поглощения с максимумами при 226 ± 1 нм, 265 ± 1 нм, 302 ± 1 нм и 313 ± 1 нм. УФ-спектр поглощения VMA-10-13 в кислой среде (рисунок 7) отличается отсутствием полос поглощения с максимумами при 302 нм и 313 нм, вследствие протонирования атома азота хиначинолиновой системы [10, 38, 82], и батохромным сдвигом полос с максимумами 226 и 265 нм до значений 232 и 273 нм.

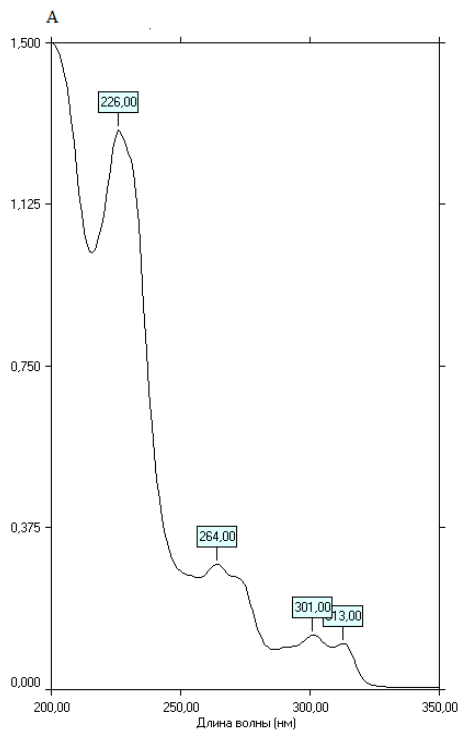


1

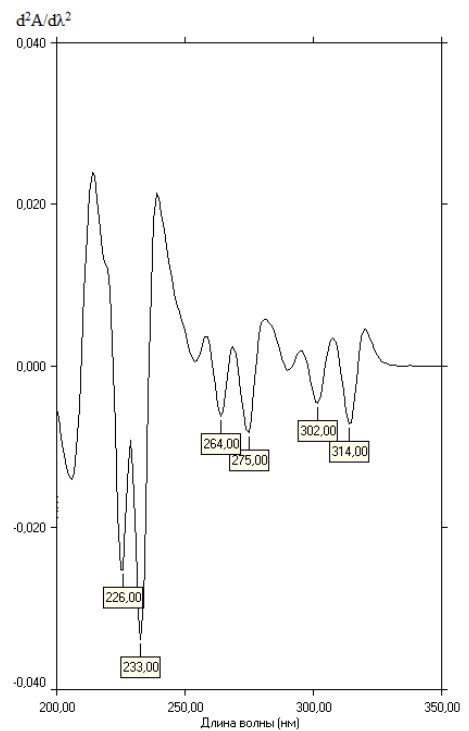


2

Рисунок 4 – УФ-спектр поглощения VMA-10-13 в спирте 96% (1) и его вторая производная (2)

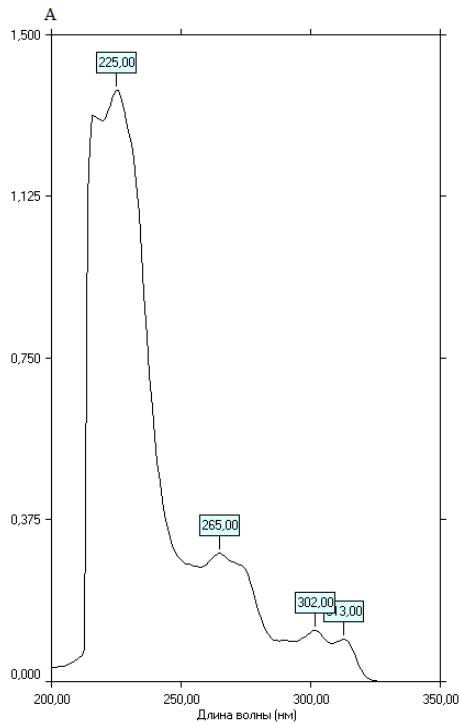


1

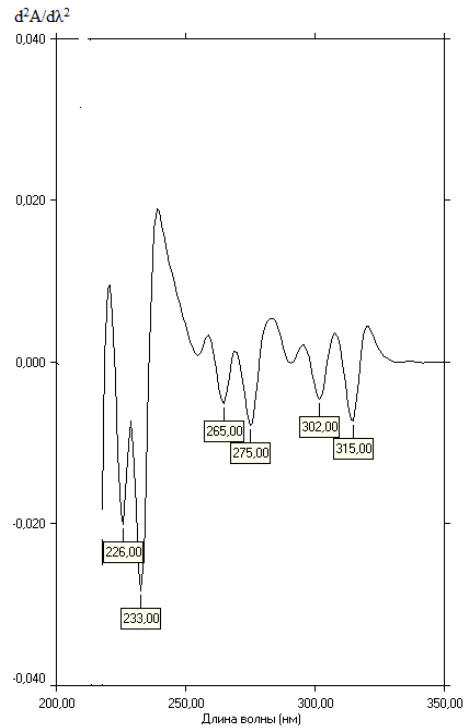


2

Рисунок 5 – УФ-спектр поглощения VMA-10-13 в воде очищенной (1) и его вторая производная (2)

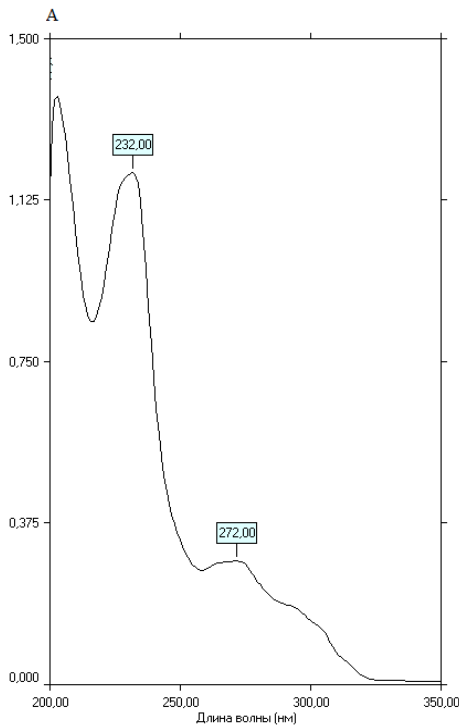


1

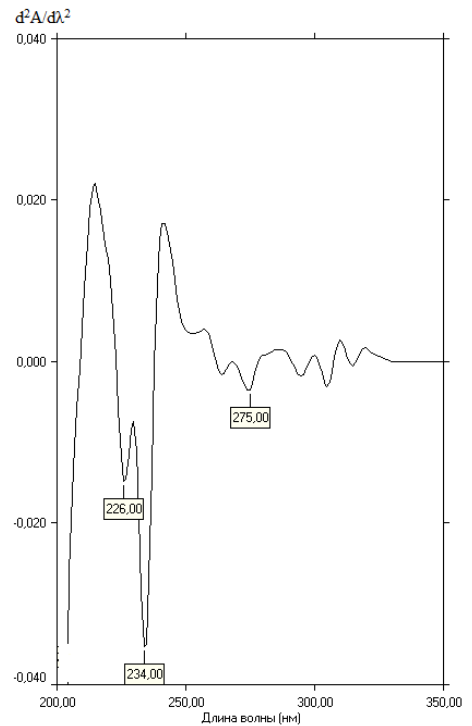


2

Рисунок 6 – УФ-спектр поглощения VMA-10-13 в 0,1 М растворе натрия гидроксида (1) и его вторая производная (2)



1



2

Рисунок 7 – УФ-спектр поглощения VMA-10-13 в 0,1 М растворе хлороводородной кислоты (1) и его вторая производная (2)

Основные оптические характеристики УФ-спектров поглощения VMA-10-13 приведены в таблице 11.

Таблица 11 – Оптические характеристики УФ-спектров поглощения

Растворитель	λ_{\max} , нм	ν_{\max} , см ⁻¹	ϵ	lg ϵ
спирт 95%	226	44248	37659	4,58
	265	37736	9570	3,98
	302	33113	3289	3,52
	313	31949	2667	3,43
вода очищенная	226	44248	38459	4,58
	264	37879	8622	3,94
	301	33223	3733	3,57
	313	31949	3141	3,50
0,1 М раствор NaOH	225	44444	40681	4,61
	265	37736	8800	3,94
	302	33113	3467	3,54
	313	31949	2844	3,45
0,1 М раствор HCl	232	43103	35259	4,55
	272	36765	8474	3,93

Одной из характерных особенностей УФ спектров веществ, содержащих в структуре шестичленные азотсодержащие ароматические гетероциклы (хиназолин), является их большое сходство с соответствующими ароматическими аналогами [82]. Поэтому УФ спектры производных хиназолина подобны спектрам бензола, имеющим три серии полос поглощения.

В то же время замещение группы =СН в ароматическом соединении на атом азота (=N-) незначительно влияет на положение полос поглощения и вызывает увеличение интенсивности полосы поглощения, которое можно рассматривать как следствие изменений молекулярных орбиталей при замещении =СН группы на атом азота. Таким образом, $\pi \rightarrow \pi^*$ -переход электронов, который обуславливает полосу в пределах 190-227 нм, следует отнести к разрешенным переходам, а полоса в пределах 260-284 нм является результатом запрещенного $\pi \rightarrow \pi^*$ -перехода. Наличие третьей полосы поглощения следует классифицировать как конъюгации в конъюгированной молекуле хиназолина [82]. Природа полос поглощения в пределах 300-320 нм

является *p*- π -конъюгацией, что подтверждается влиянием природы растворителя на положение, интенсивность и форму полос поглощения. Причина таких эффектов обусловлена тем, что взаимодействие между молекулой растворенного вещества и растворителя прежде всего меняет разность энергий между основным и возбужденным состояниями атомных группировок входящих в состав хромофора. В отличие от π - π -сопряжения *p*- π -сопряжение может быть подавлено различными способами, основанными на связывании неподеленной электронной пары и соответствующего исключения ее из *p*- π -взаимодействия. Так, электронные спектры поглощения *p*- π -сопряженных азотсодержащих соединений претерпевают существенные изменения даже в слабокислых растворах. Интенсивность соответствующих полос падает с ростом кислотности и при некотором значении pH раствора полосы совсем исчезают, подтверждая тем самым участие электронов неподеленных пар в соответствующих переходах. Падение интенсивности является обратимым, при подщелачивании кислых растворов интенсивность исследуемой полосы возрастает [64].

3.2.2.2. Использование вторых производных в исследовании УФ-спектров поглощения VMA-10-13

VMA-10-13, как и большинство других органических соединений, в растворах имеет широкие полосы поглощения. Уширение полос поглощения связано в основном с тем, что как основному, так и возбужденному состоянию соответствует набор различных колебательных состояний, в котором может существовать молекула.

Для разрешения сильно перекрывающихся спектральных линий и повышения избирательности качественного спектрофотометрического анализа успешно используется производная спектрофотометрия [8, 28, 38].

Основным положительным эффектом производных спектров является увеличение разрешения перекрывающихся в исходных спектрах полос и снижение влияния фона. Вторым преимуществом метода является резкое повышение контраста между полосами разной полуширины. Так

маловыраженное поглощение при дифференцировании подавляется, а поглощение характерных полос даже слабой интенсивности усиливается.

Для подтверждения правильности определения максимумов светопоглощения, а также выявления возможного перекрытия нескольких полос в УФ-спектрах поглощения VMA-10-13 нами исследованы вторые производные от исходных УФ-спектров поглощения (рисунки 4 – 7). Обработку УФ-спектров поглощения VMA-10-13 для получения их вторых производных ($d^2A/d\lambda^2$) проводили при помощи программного обеспечения спектрофотометра «UVWin 5».

Как следует из данных рисунков, вторые производные уточняют сведения о местонахождении экстремумов УФ-спектров поглощения VMA-10-13. При заданных условиях дифференцирования в УФ-спектрах поглощения спиртового, водного и щелочного растворов VMA-10-13 в области 220-240 нм и 260-280 нм обнаружены по две скрытые полосы при 233 ± 1 нм и 275 ± 1 нм. Аналогично в УФ-спектре поглощения кислого раствора в области 220-240 нм выявлены две скрытые полосы поглощения при 226 ± 1 нм и 234 ± 1 нм.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что УФ-спектры поглощения VMA-10-13 представляют собой суммарный контур поглощения, объединяющий несколько индивидуальных полос.

Таким образом, наличие в ультрафиолетовой области характерных максимумов поглощения, а также относительно высокие значения молярных показателей поглощения позволяет использовать метод УФ-спектрофотометрии для подтверждения подлинности и количественного определения субстанции VMA-10-13.

3.3. Определение подлинности субстанции VMA-10-13

Анализ нормативной документации (глава 1) показал, что для подтверждения подлинности фармацевтических субстанций приоритетными являются спектральные и химические методы.

3.3.1. Использование спектральных методов

Как было показано выше, для подтверждения подлинности субстанции VMA-10-13 могут быть использованы методы ИК-спектрометрии и спектрофотометрии в ультрафиолетовой области. Данные методики были включены нами в проект НД на субстанцию VMA-10-13 (приложение 2).

3.3.2. Использование химических реакций

При разработке химических реакций для подтверждения подлинности исходили из химических свойств функциональных групп и фрагментов структуры исследуемого БАС: третичной аминогруппы и амидной группы. Исходя из этого, предложен ряд реакций окисления и соле-, комплексообразования, отражающих химические свойства VMA-10-13 [67].

В реакциях окисления определение проводили по окрашенным продуктам со специальными реактивами на алкалоиды: азотной кислотой концентрированной, раствором аммония ванадата 0,5 % в серной кислоте концентрированной (реактив Манделина), раствором формальдегида в серной кислоте концентрированной (реактив Марки), раствором аммония молибдата в серной кислоте концентрированной (реактив Фреде).

Для определения чувствительности (открываемого минимума, мкг) каждой из вышеперечисленных реакций точные количества исходного раствора последовательно уменьшали до тех пор, пока взятый для выполнения реакции объем исходного раствора анализируемой субстанции еще давал видимый аналитический эффект. Для приготовления исходного раствора 0,1 г субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в спирте 96%, доводили объем тем же растворителем до метки и перемешивали (раствор А). Исследование проводили в фарфоровых чашках, в которые вносили от 0,5 до 10 мкл раствора А, высушивали и к сухому

остатку добавляли одну каплю реактива. Во всех опытах фиксировали аналитический эффект реакции. Результаты определения чувствительности проведенных реакций и их аналитические эффекты приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты определения чувствительности химических реакций на субстанцию VMA-10-13

Реактив	Чувствительность	Аналитический эффект
Реакции со специальными реактивами на алкалоиды		
Реактив Манделина	0,5 мкг	малиновое окрашивание
Реактив Марки	2 мкг	розовое окрашивание
Реактив Фреде	5 мкг	розовое окрашивание
Азотная концентрированная кислота	10 мкг	желтое окрашивание
Реакции соле-, комплексообразования		
Кобальта нитрата раствор 5%	5 мг/мл	творожистый осадок розового цвета
Железа(III) хлорида раствор 3%	8 мг/мл	творожистый осадок желтого цвета
Серебра нитрата раствор 2%	2 мг/мл	творожистый осадок белого цвета

В реакциях соле-, комплексообразования субстанция VMA-10-13 образует творожистые осадки с реактивами: железа(III) хлорида раствор 3%, кобальта нитрата раствор 5% и серебра нитрата раствор 2%.

Для определения чувствительности (минимально определяемой концентрации, мг/мл) каждой из вышеперечисленных реакций исходный 1 % раствор последовательно разбавляли до тех пор, пока взятый для выполнения реакции объем раствора анализируемой субстанции еще давал видимый аналитический эффект. Для приготовления исходного раствора 0,5 г субстанции помещали в мерную колбу на 50 мл, растворяли в диметилсульфоксиде, доводили объём тем же растворителем до метки и перемешивали (раствор А). Далее от 1 до 10 мл раствора А доводили до 10 мл диметилсульфоксидом и прибавляли 1 мл реактива. Во всех опытах

фиксируют результат реакции (таблица 12). Параллельно проводили контрольный опыт для подтверждения того, что образовавшиеся осадки возникают между исследуемой субстанцией и реактивом.

В проект НД на субстанцию VMA-10-13 мы включили наиболее чувствительные реакции с реактивом Манделина (0,5 мкг) и раствором серебра нитрата 2% (2 мг/мл).

3.4. Определение родственных примесей в субстанции VMA-10-13

Одним из этапов исследования БАС при разработке стандарта качества является идентификация и определение допустимого предела содержания родственных примесей по ОФС.1.1.0023.18 [28]. К родственным примесям можно отнести исходные вещества и полупродукты образующиеся на различных стадиях синтеза (технологические примеси), а также продукты деструкции действующего вещества.

Основываясь на схеме получения субстанции VMA-10-13 (раздел 1.1.3), вероятными родственными примесями являются исходные вещества – незамещенный хиназолин-4(3H)-он и алкилирующий агент – 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамид. Из методики синтеза следует, что возможной примесью в конечном продукте (и возможных продуктах его гидролиза в процессе хранения) может быть исходный хиназолин-4(3H)-он. При этом, примесь алкилирующего агента – 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамида маловероятна, так как это соединение легко растворимо в диметилформамиде и остается в фильтрате при перекристаллизации VMA-10-13 (раздел 1.1.3).

3.4.1. Использование метода тонкослойной хроматографии

Метод хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ) в настоящее время широко применяется в фармацевтическом анализе [1, 3, 74, 108]. С помощью данного метода можно установить подлинность изучаемого вещества, а также определить присутствие посторонних (родственных) примесей [1, 6, 20, 21]. Данный метод обладает высокой чувствительностью, специфичностью, простотой в выполнении, эффективностью, наглядностью результатов разделения, малым расходом реактивов, возможностью

единовременного разделения нескольких веществ на одной пластине [3, 108]. Поэтому в качестве предварительного метода для определения посторонних (родственных) примесей был использован метод ТСХ [6, 7, 20, 21].

На начальной стадии наших исследований решалась задача поиска оптимальных условий хроматографирования субстанции VMA-10-13: выбор состава подвижной фазы, способа детектирования пятен на хроматограмме, установление чувствительности используемых способов детектирования [20, 21, 108].

Хроматографирование проводили на пластинах Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ на алюминиевой подложке, которые имеют высокую степень активности, повышенную скорость и чувствительность к анализу, образуют равномерный слой.

Хроматографирование проводили по методике, описанной в ОФС.1.2.1.2.0003.15 [28], восходящим методом при комнатной температуре (15-25 °С) в камерах, насыщенных парами растворителей в течение 30 минут. На линию старта с помощью микрошприца наносили 10 мкл спиртовых растворов в концентрации 2,5 мг/мл. Хроматографирование в каждой системе растворителей и в системе отдельных растворителей проводили в 6 повторениях.

Зоны адсорбции изучаемого вещества на пластинах Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ детектировали с помощью реактива Драгендорфа, УФ-света, паров йода, реактива Ван Урка (п-диметиламинобензальдегид – железа(III) хлорид) [39,40,111]. Поиск наилучших условий идентификации исследуемой субстанции VMA-10-13 осуществляли путем изучения их хроматографической подвижности в индивидуальных растворителях с различной полярностью [44]. Полученные результаты хроматографической подвижности исследуемой субстанции VMA-10-13 и двух предполагаемых примесей в индивидуальных растворителях с разной диэлектрической проницаемостью [44] приведены в таблице 13.

Таблица 1 – Хроматографическая подвижность субстанции VMA-10-13 и двух предполагаемых примесей в индивидуальных растворителях

Растворитель	Диэлектрическая проницаемость	R _f субстанции	R _f незамещенного хиназолин-4(3H)-она	R _f 2-хлор-N-(2-метилфенил)ацетамида
1	2	3	4	5
Уксусная кислота	6,15	0	0	0,19±0,02
Бутанол	17,1	0	0,21±0,01	0
Пиридин	12,3	0	0	0
Муравьиная кислота	58,5	0	0	0,31±0,01
Толуол	2,3	0,18±0,02	0,25±0,02	Нет четкого сформированного пятна
Вода	81	0	0	0
Пропанол	22,8	0	0,15±0,01	0
Изопропанол	18,3	0	0	0
Ацетонитрил	37,5	0	0,95±0,01	0,78±0,01
Бензол	2,3	0,15±0,01	0	0
Циклогексан	2,0	0,95±0,01	Нет четкого сформированного пятна	0,85±0,01
Этилацетат	6,1	0,59±0,01	0,47±0,02	0,85±0,02
Четыреххлористый углерод	2,2	0,23±0,01	0	0
Гексан	1,89	0,11±0,02	0	0,24±0,02
Метанол	31,2	0	0	0
Хлороформ	5,2	0,70±0,01	0,63±0,02	0,60±0,02
Эфир	1,4	0,28±0,01	Нет четкого сформированного пятна	0
Раствор аммиака 25%	31,6	0	0	0
Диэтиламин	3,8	0,78±0,01	0,84±0,01	0,75±0,01
Ацетон	20,9	0	0	0,37±0,02
Гептан	1,92	0,37±0,01	0,32±0,02	0
Циклогексан	2,0	Нет четкого сформированного пятна	0,20±0,01	0,32±0,01

Как следует из таблицы 13, в апротонных растворителях значения R_f исследуемой субстанции VMA-10-13 находятся в пределах от 0,11 до 0,95, а в

протеолитических растворителях вещество проявляет нулевую подвижность. При оценке хроматограмм по форме зон исследуемых веществ и их расположению выбрана оптимальная система индивидуального растворителя (этилацетат), при использовании которого на хроматограмме образуются компактные четкие пятна, происходит оптимальное разделение субстанции VMA-10-13 от предполагаемых примесей, оптимальным временем проведения анализа и значением коэффициентов хроматографической подвижности.

Также нами были исследованы 6 подвижных фаз, состоящих из смесей нескольких растворителей (таблица 14).

Таблица 14 – Хроматографическая подвижность субстанции VMA-10-13 и двух предполагаемых примесей в смесях нескольких растворителей

Подвижная фаза	Соотношение растворителей	R _f субстанции	R _f незамещенного хиназолин-4(3H)-она	R _f 2-хлор-N-(2-метилфенил)ацетамида
хлороформ-этанол-раствор аммиака 25%	35:10:5	0,30±0,02	0	0
хлороформ-ацетон-раствор аммиака 25%	35:5:5	0,46±0,02	0,40±0,02	Нет четкого сформированного пятна
гексан-ацетонитрил	70:10	Нет четкого сформированного пятна	0,50±0,02	0,47±0,02
этилацетат-диэтиламин	95:5	0,77±0,02	0,86±0,01	0,30±0,02
хлороформ-гексан	20:80	0	0,30±0,02	0
раствор аммиака 25%-ацетон-хлороформ-бутанол	10:30:30:40	0,89±0,03	0,95±0,01	0,72±0,03

При оценке полученных хроматограмм установлено, что зоны исследуемых веществ не образуют четкие пятна, не происходит оптимального разделения субстанции VMA-10-13 от предполагаемых

примесей. Поэтому в дальнейшие исследования мы не включили использование в качестве подвижной фазы смеси нескольких растворителей.

После хроматографирования зоны адсорбции детектировали путем просмотра пластин в УФ-свете при 254 нм и с помощью специальных детектирующих реактивов: реактива Драгендорфа, паров йода, реактива Ван Урка [28, 39, 40, 111].

В результате детектирования зон адсорбции получены следующие результаты:

- реактив Драгендорфа – пятна оранжевого цвета;
- УФ-свет при 254 нм – пятна сине-фиолетового цвета;
- пары йода – четкого проявления пятен не наблюдали;
- реактив Ван Урка – четкого проявления пятен не наблюдали.

В найденных оптимальных условиях разделения с помощью индивидуального растворителя (этилацетат) определяли предел обнаружения изучаемого вещества VMA-10-13 на хроматографической пластине путем нанесения растворов в количестве от 0,25 до 2,0 мкг в пробе.

Согласно полученным результатам (таблица 15) универсальным и наиболее чувствительным проявителем зон адсорбции является УФ-свет при длине волны 254 нм.

Таблица 15 – Детекторы зон адсорбции и их предел обнаружения

Реагенты детекции	Предел обнаружения (мкг в пробе)
УФ-свет при 254 нм	0,5
Реактив Драгендорфа	5
Пары йода	10
Реактив Ван Урка (п-диметиламинобензальдегид- железа(III) хлорид)	-

Далее перед нами также стояла задача определения возможности обнаружения и установления предельного содержания вероятных примесей

незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она и 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамида в субстанции VMA-10-13 [7]. Для ее решения определяли чувствительность их обнаружения на хроматограмме при проведении анализа в описанных выше условиях.

На линию старта пластинки Сорбфил ПТСХ-АФ-В-УФ наносили по 10 мкл спиртовых растворов, содержащих 2; 1; 0,5; 0,25 мкг незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она и 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамида. Их предельно обнаруживаемое количество на хроматограмме составило 0,5 мкг.

Для установления предельного содержания родственных примесей готовили модельную смесь состава: 0,05 г СО VMA-10-13 растворяли в 50 мл спирта 96% (1000 мкг/мл), к полученному раствору добавляли по 0,5 мл 0,1% растворов незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она и 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамида в спирте 96%, что составило по 1% (10 мкг/мл) каждой примеси по отношению к содержанию VMA-10-13.

На линию старта хроматографической пластинки наносили 10 мкл 0,1 % (10 мкг) раствора СО VMA-10-13 в спирте 96%, 10 мкл раствора модельной смеси, в две другие точки по 10 мкл (1 мкг) 0,01 % растворов незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она и 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамида в спирте 96%. Пластинку с нанесенными пробами помещали в камеру с подвижной фазой (этилацетат) и хроматографировали восходящим способом. После достижения фронтом подвижной фазы линии финиша, пластину извлекали из камеры, сушили на воздухе и просматривали в УФ-свете при 254 нм. Пятна посторонних примесей на хроматограмме раствора модельной смеси, находящиеся на уровне пятен примесей 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамида и незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она, по совокупности величины и интенсивности окраски не превышали пятен растворов сравнения (рисунок 8).

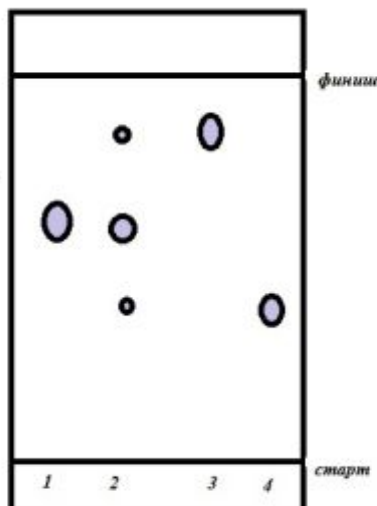


Рисунок 8 – Хроматограмма испытуемых растворов:

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1 – СО VMA-10-13 | 2 – модельная смесь |
| 3 – 2-хлор-N-(2-метилфенил)
ацетамид | 4 – незамещенный хиназолин-4(3H)-он |

Проведенный анализ 5 лабораторных серий субстанции VMA-10-13 показал, что примеси 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамида и незамещенного хиназолин-4(3H)-она не обнаружены. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что содержание 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамида и незамещенного хиназолин-4(3H)-он в анализируемых образцах менее 1,0 %.

Разработанная методика определения примесей в субстанции VMA-10-13 позволяет достоверно разделить и качественно идентифицировать основные потенциальные технологические примеси 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамид и незамещенный хиназолин-4(3H)-он.

Однако данная методика является полуколичественной, так как сравнение по величине и интенсивности пятен в анализируемом образце с аналогичными параметрами пятен веществ-свидетелей с известной концентрацией позволяет приблизительно оценить порядок содержания той или иной примеси. Для получения продукта высокого качества необходимо использовать методики, позволяющие не только быстро, но и с высокой

степенью правильности и достоверности давать количественную оценку содержания примесей в анализируемой субстанции VMA-10-13. Кроме того, методика обладает низкой чувствительностью, позволяет определить только более 1% предельного содержания примесей, поэтому было принято решение проводить дальнейшие исследования с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.

3.4.2. Использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии

Для определения родственных примесей (незамещенный хиназолин-4(3*H*)-он и 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамид) нами был использован метод ВЭЖХ [59], который широко используется при анализе фармацевтических субстанций на родственные примеси [19, 69, 75].

Для подтверждения специфичности методики (пригодности хроматографической системы) были проанализированы растворы индивидуальных веществ: СО VMA-10-13 и исследуемых примесей, а также модельные смеси, содержащие все три соединения в одном растворе.

Анализ проводили в следующих условиях:

- хроматографическая система для ВЭЖХ «Стайер» (компания «Аквилон», Россия);
- колонка Luna C-18, 4,6 x 150 мм с размером частиц 5 мкм [121];
- подвижная фаза: ацетонитрил (А) - кислота фосфорная 0,05М (Б);
- режим элюирования:
 - от 0–6 мин 10 % подвижной фазы А и 90 % подвижной фазы Б;
 - от 6–12 мин 40 % подвижной фазы А и 60 % подвижной фазы Б;
 - от 12–20 мин 90 % подвижной фазы А и 10 % подвижной фазы Б;
- скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл;
- детектор - спектрофотометрический;
- длина волны детектирования 226 нм;
- температура колонки – 25±2 °С;

- время регистрации хроматограммы – около 20 минут.

Идентификацию веществ на хроматограммах осуществляли путем сравнения времен удерживания анализируемого образца и стандартных образцов примесей. На хроматограммах индивидуальных веществ и их модельных смесей (рисунки 9, 10, 11, 12) наблюдали четкое разделение пиков анализируемых веществ. На хроматограмме холостой пробы (растворителя – спирта 96%) отсутствовали посторонние пики, мешающие определению анализируемых соединений.

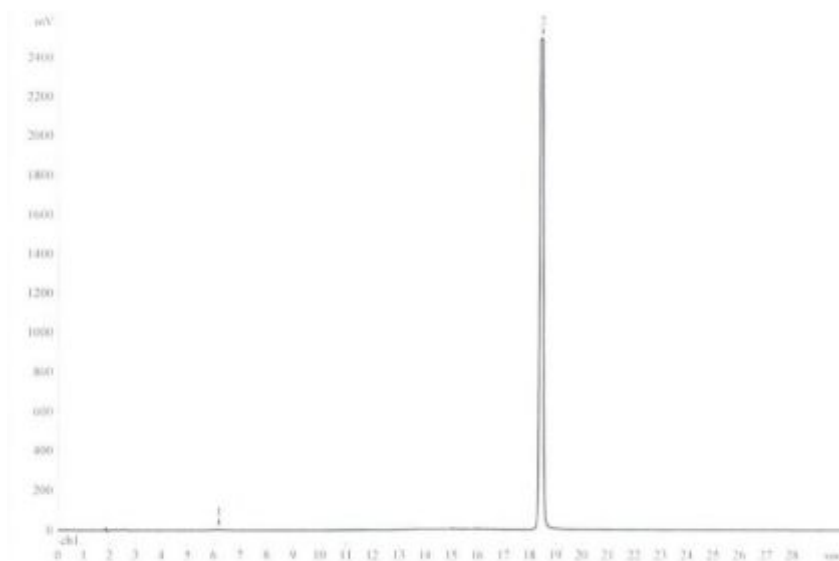


Рисунок 9 – Хроматограмма стандартного образца VMA-10-13

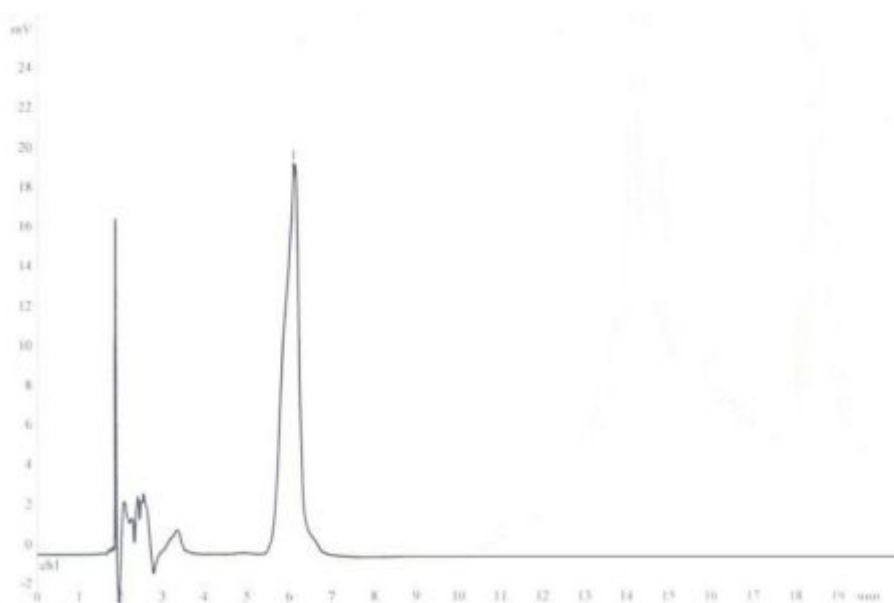


Рисунок 10 – Хроматограмма незамещенного хиназолин-4(3H)-она

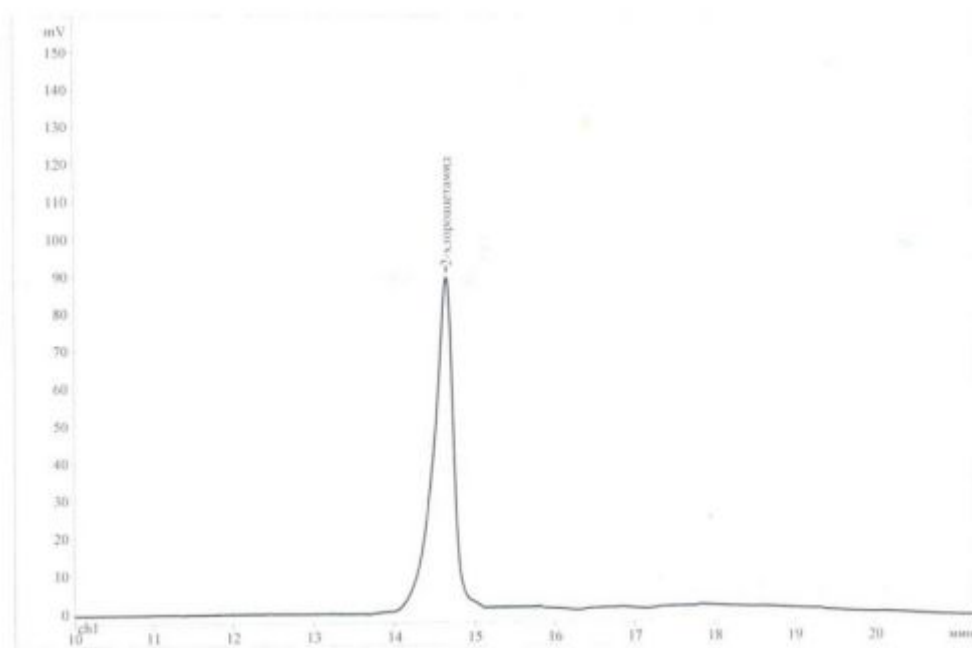


Рисунок 11 – Хроматограмма 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамида

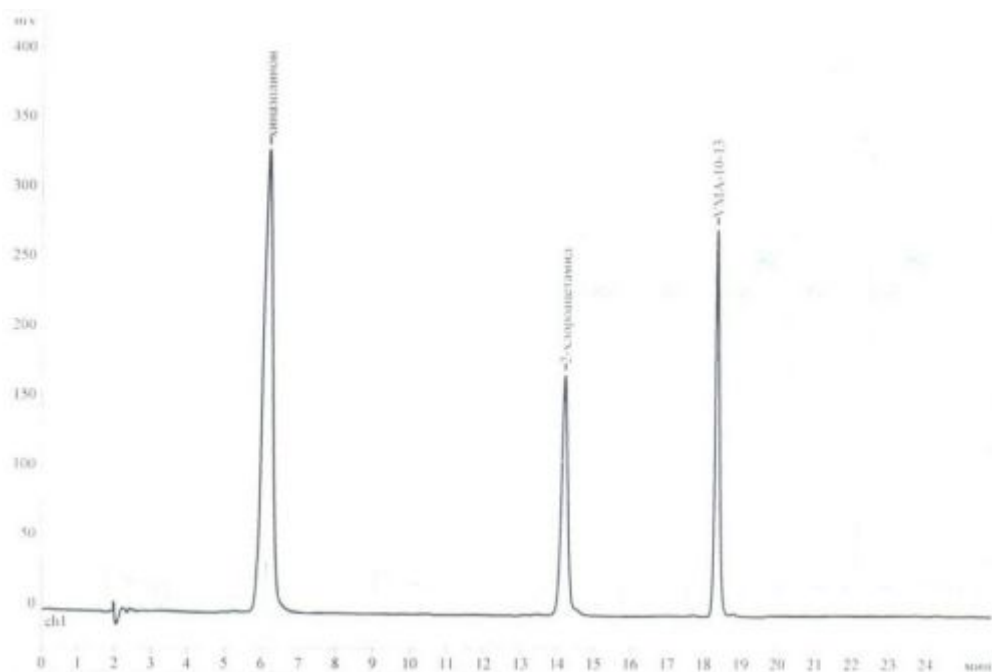


Рисунок 12 – Хроматограмма модельной смеси

При анализе модельной смеси были оценены параметры, характеризующие пригодность хроматографической системы [28, 75]: время удерживания ($t_{уд.}$), коэффициент разделения (R_s), коэффициент асимметрии (A_s), количество теоретических тарелок (N), а также относительное стандартное отклонение площадей пиков ($RSD, \%$). Расчет проводили по 6

хроматограммам испытуемых растворов с использованием системы сбора и обработки хроматографических данных Chromeleon (таблица 16).

Таблица 16 – Параметры пригодности хроматографической системы

Вещество	$t_{уд.}$, МИН	R_s	A_s	N	RSD %
Незамещенный хиназолин-4(3H)-он	6,2	80,48	1,13	1569	1,75
2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамид	14,4	3,76	1,07	249994	1,90
VMA-10-13	18,5	-	1,25	385224	1,85
Критерии приемлемости					
	-	≥ 2	0,8 – 1,5	≥ 1500	≤ 2

Коэффициент разделения (R_s) пика примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она и основного вещества составил 80,48, а для 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамида – 3,76, что свидетельствует о хорошем разделении (рекомендуемое значение R_s при определении содержания примесей не менее 2). Коэффициент асимметрии пика незамещенного хиназолин-4(3H)-она, характеризующий надежность определения границ пика, равен 1,13, а для 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамида – 1,07 (рекомендуемое значение – от 0,8 до 1,5). Относительное стандартное отклонение (RSD) площадей пиков исследуемых примесей для 6 последовательных хроматограмм составило не более 2%. Приведенные в таблице 16 данные свидетельствуют о приемлемом разрешении и воспроизводимости используемой хроматографической системы.

По разработанной методике нами был проведен анализ 5 лабораторных серий субстанции VMA-10-13 (таблица 17). При этом, примесь 2-хлор-N-(2-метилфенил) ацетамида не была обнаружена при анализе 5 лабораторных серий субстанции VMA-10-13, как методом ВЭЖХ, так и методом ТСХ (раздел 3.4.1). При дальнейших исследованиях данную примесь не определяли.

Таблица 17 – Результаты анализа лабораторных серий субстанции VMA-10-13 на содержание родственных примесей

Серия	Площадь пика (S) и время удерживания ($t_{уд}$)		
	VMA-10-13	Незамещенный хиназолин-4(3H)-он	2-хлор-N-(2-метилфенил)ацетамид
001	S= 25235,37 $t_{уд.} = 18,49$	S=32,81 $t_{уд.} = 6,32$	Не обнаружен
002	S= 25230,48 $t_{уд.}=18,53$	S=32,85 $t_{уд.} = 6,40$	Не обнаружен
003	S= 25239,37 $t_{уд.}=18,48$	S=32,80 $t_{уд.} = 6,11$	Не обнаружен
004	S= 25246,37 $t_{уд.} = 18,49$	S=32,79 $t_{уд.} =6,32$	Не обнаружен
005	S= 25246,37 $t_{уд.} = 18,49$	S=32,76 $t_{уд.} =6,35$	Не обнаружен

Для дальнейших исследований была приготовлена модельная смесь, состоящая из раствора СО VMA-10-13 (0,2 мг/мл) и незамещенного хиназолин-4(3H)-она (0,2 мкг/мл). Содержание примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она составляло 0,1 % по отношению к VMA-10-13. Хроматограмма раствора приготовленной модельной смеси приведена на рисунке 13.

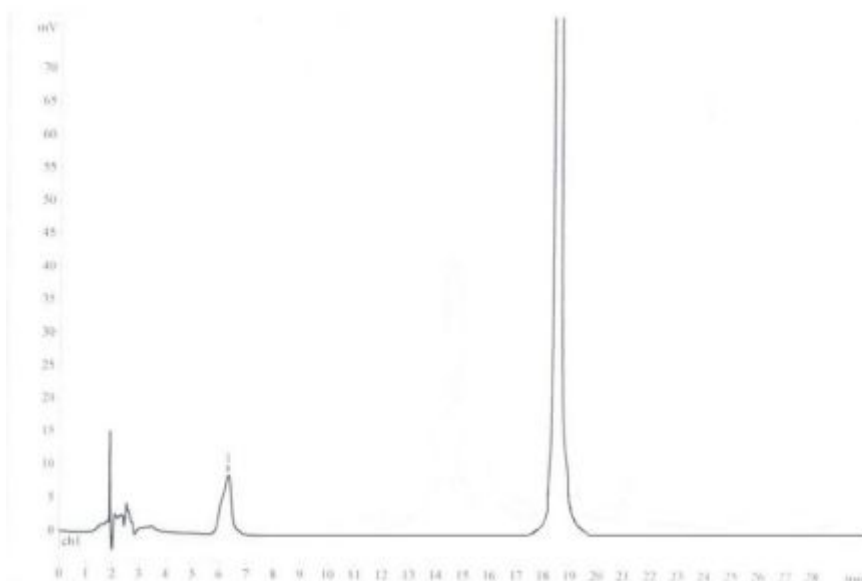


Рисунок 13 – Хроматограмма раствора модельной смеси VMA-10-13 и незамещенного хиназолин-4(3H)-она

Далее нами была проведена валидация методики определения примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она в субстанции VMA-10-13 [12, 28, 62, 77, 78].

Линейность методики определяли на 7 уровнях концентраций незамещенного хиназолин-4(3H)-она в подвижной фазе (0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,4 и 0,5% от содержания основного вещества – VMA-10-13). Для этого в мерные колбы вместимостью 25 мл помещали раствор незамещенного хиназолин-4(3H)-она в спирте 96% с концентрацией 5 мкг/мл (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 мл) и доводили объем колб спиртом 96% до метки.

Каждый полученный раствор подвергали анализу не менее трех раз, согласно разработанных условий, проводили расчет средних значений площадей пиков и по полученным результатам строили прямую зависимости аналитического сигнала (площади пика) от концентрации незамещенного хиназолин-4(3H)-она в растворе (рисунок 14).

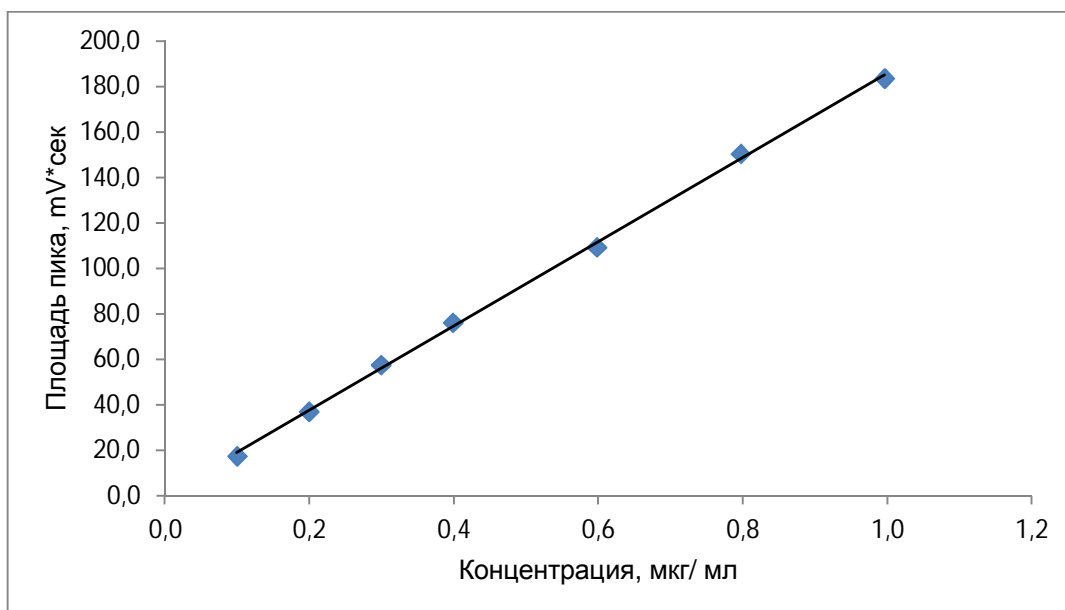


Рисунок 14 – График зависимости площади хроматографического пика от концентрации незамещенного хиназолин-4(3H)-она

Результаты определений и рассчитанные параметры линейной зависимости приведены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты определения линейной зависимости площадей пика от концентрации незамещенного хиназолин-4(3H)-она

Концентрация примеси, мкг/мл (x_i)	Количество примеси (%) от содержания VMA-10-13	Площадь пика, мV·сек (y_i)	Параметры линейной зависимости $y = b \cdot x + a$
0,100	0,050	17,56	$b = 185,1$
0,199	0,101	37,11	$S_b = 2,49$
0,299	0,151	57,67	$\Delta b = 6,4$
0,398	0,202	76,22	$a = 0,73$
0,598	0,302	109,33	$S_a = 1,42$
0,797	0,403	150,44	$\Delta a = 3,65$
0,996	0,504	183,55	$r = 0,9995$
Критерии приемлемости параметров линейной зависимости [63]			
Критерий	Полученные значения	Вывод	
$ a \leq \Delta a = t(95\%, n-2) \cdot s_a$	0,73 < 3,65	Выполняется	
$r \geq 0,9980$	0,9995 > 0,9980	Выполняется	

Как следует из данных таблицы 18, выполняется неравенство: свободный член уравнения линейной зависимости (a) меньше или равен его доверительному интервалу (Δa), что доказывает отсутствие систематической погрешности методики. Коэффициент корреляции ($r \geq 0,9980$) является показателем жесткости линейной связи между величинами x и y . Таким образом, данную методику можно считать валидированной по показателям линейность и правильность.

Используя параметры линейной зависимости (стандартное отклонение свободного члена линейной зависимости S_a и угол ее наклона b), были рассчитаны, предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) [12, 28, 62]:

$$\text{ПО} = 3,3 \cdot s_a / b = 3,3 \cdot 1,42 / 185,1 = 0,025 \text{ мкг/мл}$$

$$\text{ПКО} = 10 \cdot s_a / b = 10 \cdot 1,42 / 185,1 = 0,077 \text{ мкг/мл}$$

В случае предельных тестов ПО должен быть незначим по сравнению с предельным нормируемым значением содержания примеси ImL (не более

32% от нормируемого значения). В нашем случае, при нормировании содержания примеси не более 0,1% от содержания субстанции VMA-10-13, рабочая концентрация раствора субстанции VMA-10-13 должна составлять от 0,1 мг/мл. Такая концентрация позволит обнаружить примеси в субстанции в концентрации 0,1 мкг/мл и менее. Для проведения дальнейших исследований выбрана концентрация испытуемого раствора субстанции VMA-10-13 – 0,2 мг/мл.

Прецизионность (сходимость) методики оценивали по девяти точкам на трех уровнях содержания [28,62] незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она (0,05%; 0,1% и 0,15%) от содержания VMA-10-13.

Модельные растворы готовили следующим образом.

0,05 г (точная масса) незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл спирта 96%, растворяли и обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут, объем раствора доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. Затем 2,5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора до метки спиртом 96% и перемешивали (концентрация раствора – 5 мкг/мл).

По 0,05 г (точная масса) СО VMA-10-13 помещали в 9 мерных колб вместимостью 250 мл, прибавляли по 100 мл спирта 96% и обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут, прибавляли растворы незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она с концентрацией 5 мкг/мл до получения его концентраций, соответствующих 0,05%; 0,1% и 0,15% от содержания VMA-10-13, и доводили объем колб спиртом 96% до метки.

Концентрация VMA-10-13 в модельных растворах составила 0,2 мг/мл, а концентрация незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она - 0,1 мкг/мл, 0,2 мкг/мл и 0,3 мкг/мл, соответственно.

Для приготовления раствора стандартного образца: около 0,05 г (точная масса) незамещенного хиназолин-4(3*H*)-она помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта 96%, обрабатывали

ультразвуком в течение 15 минут, объем раствора доводили тем же растворителем до метки и перемешивали. Далее 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили спиртом 96% до метки и перемешивали. Далее 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили спиртом 96% до метки и перемешивали (концентрация раствора - 0,2 мкг/мл).

Каждый из приготовленных растворов хроматографировался не менее 3 раз (таблица 19).

Таблица 19 – Результаты определения прецизионности (сходимости) методики определения примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она в модельных смесях

Уровень	Взято примеси, мкг/мл	Площадь пика, mV·сек	Найдено примеси, мкг/мл	Найдено примеси, %	Метрологические характеристики
1	0,0994	18,09	0,0958	96,35	$\bar{X} = 96,95$ $S = 1,57$ $S_{\bar{X}} = 0,52$ $\Delta X = 3,75$ $\Delta \bar{X} = 1,21$ $\varepsilon = 3,87\%$ $\bar{\varepsilon} = 1,25\%$ $\delta = \bar{X} - 100 = 3,05$
		18,72	0,0991	99,70	
		17,85	0,0945	95,07	
2	0,2028	37,15	0,1967	96,98	
		36,34	0,1924	94,87	
		36,84	0,1950	96,17	
3	0,3012	55,57	0,2942	97,67	
		56,12	0,2971	98,64	
		55,24	0,2924	97,09	
$C_o = 0,198; S_o = 37,4$					
Критерии приемлемости прецизионности (сходимости) [63]					
Тест	Максимально допустимая неопределенность анализа ($\max \Delta_{As}$), %		Требования критерия $\Delta X \leq \max \Delta_{As}$		Вывод
Предельные тесты	16		3,75 < 16		Соответствует
Количественные тесты	5		3,75 < 5		Соответствует

Концентрацию незамещенного хиназолин-4(3H)-она в модельных растворах, мкг/мл (X) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S \cdot C_o}{S_o}$$

S – площадь пика примеси в модельном растворе;

S_o – площадь пика в растворе стандартного образца;

C_o - концентрация раствора стандартного образца, мкг/мл.

Как следует из данных таблицы 19, методика определения примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она характеризуется достаточной прецизионностью (сходимостью) и является корректной.

По разработанной методике (приложение 2) был проведен анализ 5 лабораторных серий субстанции VMA-10-13. В анализируемых образцах была обнаружена лишь одна примесь – незамещенного хиназолин-4(3H)-она (время удерживания около 6,3 минут), содержание которой в отдельных образцах не превышало 0,1% (в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0023.18). Никаких других примесей на полученных хроматограммах не наблюдалось.

Разработанная методика включена в проект НД для определения предельного содержания родственных примесей в субстанции VMA-10-13.

3.5. Определение остаточных органических растворителей в субстанции VMA-10-13 методом газовой хроматографии

Как следует из технологии синтеза и очистки субстанции VMA-10-13 (раздел 1.1.3), возможной примесью в ее серийных образцах является остаточный растворитель – диметилформамид.

В соответствии с требованиями ОФС.1.1.0008.15 «Остаточные органические растворители» [28], диметилформамид относится ко 2 классу токсичности (негенотоксичные растворители), его предельное содержание составляет 880 ppm. (0,088 %).

Разработку методики определения предельного содержания остаточных органических растворителей (диметилформамида) проводили методом газовой хроматографии. Прибор – универсальный газовый хроматограф типа ЛХМ-8МД [4, 41, 49, 56].

Хроматографирование проводили в следующих условиях:

- колонка насадочная длиной 2 м из нержавеющей стали, носитель твердый хроматон N=AW. Неподвижная жидкая фаза FFAP в количестве 10% от веса хроматона – 0,315 мм, внутренний диаметр 3 мм [41];
- газ носитель – азот (ОСЧ);
- скорость потока 30 см³/мин.;
- объем вводимой пробы 1 мл;
- температура термостата приставки АРП 85 °С;
- температура колонки 175 °С;
- температура испарителя 150 °С;
- температура детектора 200 °С.

Для количественного определения остаточного содержания диметилформаида его применение в качестве растворителя субстанции VMA-10-13 исключается, также исключается этиловый спирт, хроматографируемый до диметилформаида и маскирующий диметилформамид. Применение диметилсульфоксида в качестве растворителя субстанции также исключается из-за близкого времени удерживания.

Так как диметилформамид растворим в воде, нами был применен метод извлечения водой. Субстанция VMA-10-13 пропитывается водой, образуя суспензию. Введение водных растворов в испаритель хроматографа микрошприцем негативно отражается на хроматографической колонке, происходит гидратация неподвижной жидкой фазы, в частности полиэтиленгликолей, что приводит к потере эффективности колонки и сокращению срока ее работы [35, 56].

На основании этого был выбран метод извлечения – газовая экстракция динамического парофазного анализа [14]. Для этого готовили 5% суспензию в воде для жидкостной хроматографии: точную навеску СО VMA-10-13 (не содержащего диметилформаида) настаивали при встряхивании в течение одного часа при температуре 40 °С до образования

суспензии. Затем центрифугировали в течение 15 минут при 2000 об/мин. Отбирали 1 мл водной вытяжки, помещали в реакционный флакон приставки для парофазного анализа [35].

Анализ проводили на газовом хроматографе марки ЛХМ-8МД с приставкой для парофазного анализа. Насадочная хроматографическая колонка из нержавеющей стали длиной 2 м и внутренним диаметром 3 мм. Насадка Cromaton N-AW 0,25-0,315 мм, с нанесенной на нее неподвижной жидкой фазы FFAP (Carbowax 20M терминированный 2-нитротерефталевой кислотой) в количестве 10% от массы хроматона. Подвижная фаза - азот со скоростью 30 см³/мин [14, 35].

Для подтверждения специфичности методики проводили определение влияния подвижной фазы (растворителя) – воды для жидкостной хроматографии на пик диметилформамида (рисунки 15 и 16).

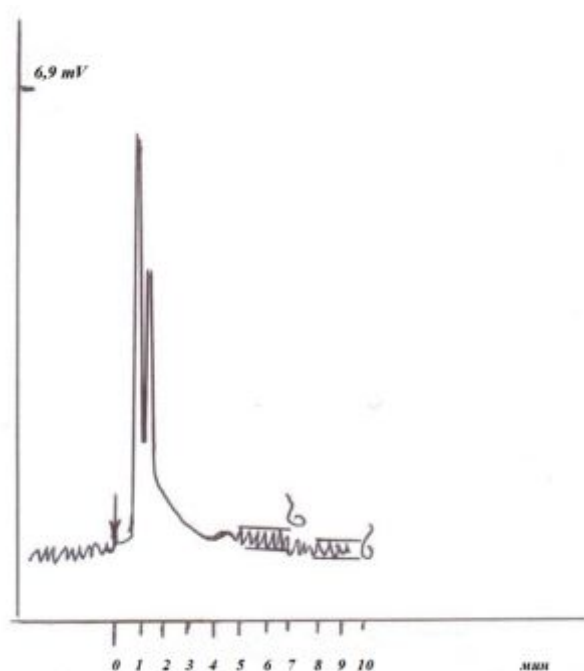


Рисунок 15 – Хроматограмма воды и фрагмент «шума» базовой линии (δ-амплитуда «шума»)

На хроматограмме воды (рисунок 15) наблюдается отсутствие пика диметилформамида. Из рисунка 16 следует, что пик диметилформамида полностью отделен от пиков воды, это подтверждает специфичность

предлагаемой методики. Коэффициент разделения равен 2,5, время удерживания диметилформаида 3 минуты 47 секунд $\pm 1,5-2,0$ секунды.

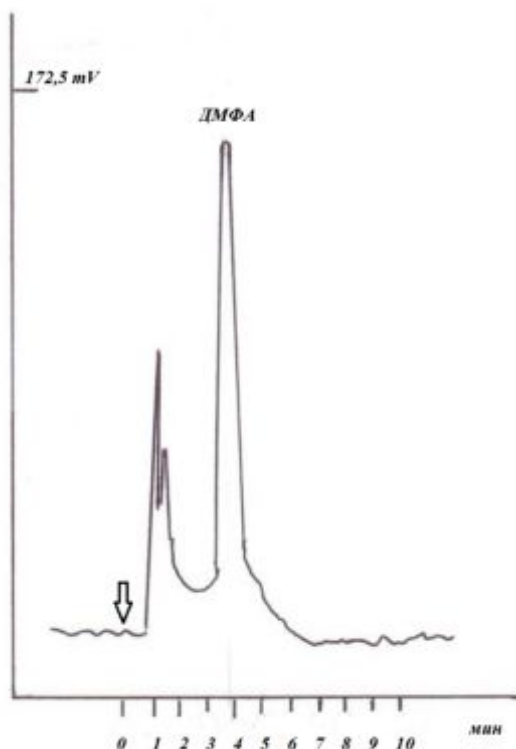


Рисунок 16 – Хроматограмма диметилформаида в водной суспензии субстанции VMA-10-13

Для определения градуировочных характеристик [13] (линейности методики) готовили раствор стандартного образца N,N-диметилформаида х.ч. ГОСТ 20289-74 в воде для жидкостной хроматографии с концентрацией 1,0 мг/мл. Из полученного раствора методом разведения водой для жидкостной хроматографии готовили градуировочные растворы с концентрацией диметилформаида от 0,025 мг/мл до 0,1 мг/мл, что соответствует содержанию диметилформаида в субстанции VMA-10-13 от 500 до 2000 ppm. Отбирали по 1 мл каждого раствора и переносили во флакон, далее флакон помещали в герметичный патрон для парафазного анализа и хроматографировали. Каждую градуировочную концентрацию хроматографировали не менее трех раз, проводили расчет средних значений площадей пиков и строили прямую зависимости аналитического сигнала

(площади пика) от концентрации диметилформамида в растворе (рисунок 17, таблица 20).

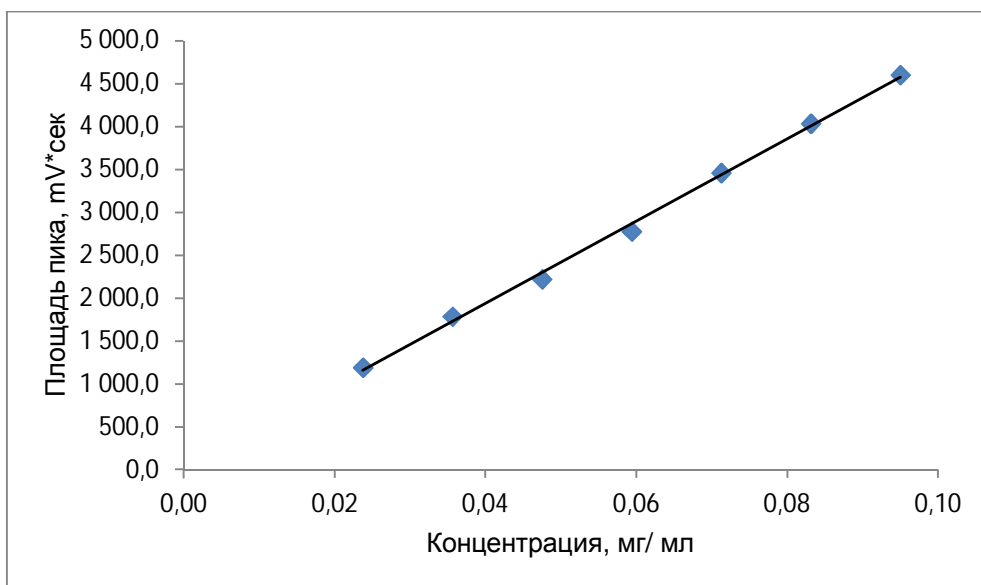


Рисунок 17 – График зависимости площади хроматографического пика от концентрации диметилформамида

Таблица 20 – Результаты определения линейной зависимости площадей пика от концентрации растворов диметилформамида

Концентрация ДМФА, мг/мл (x_i)	Количество примеси, ppm от содержания VMA-10-13	Площадь пика, мV·сек (y_i)	Параметры линейной зависимости $y = b \cdot x + a$
0,0238	475	1192	$b = 4,8 \cdot 10^4$ $s_b = 0,1 \cdot 10^4$ $\Delta b = 0,26 \cdot 10^4$ $a = 17$ $s_a = 65$ $\Delta a = 167$ $r = 0,9989$
0,0356	713	1787	
0,0475	950	2222	
0,0594	1188	2778	
0,0713	1425	3459	
0,0831	1663	4035	
0,0950	1900	4602	
Критерии приемлемости параметров линейной зависимости [63]			
Критерий	Полученные значения	Вывод	
$ a \leq \Delta a = t(95\%, n-2) \cdot s_a$	17 < 167	Выполняется	
$r \geq 0,9980$	0,9989 > 0,9980	Выполняется	

Выполнение неравенства: свободный член уравнения линейной зависимости (a) меньше или равен его доверительному интервалу ($a \leq \Delta a = t(95\%; 5) \cdot s_a$) доказывает отсутствие систематической погрешности методики. Коэффициент корреляции ($r \geq 0,9980$) является показателем

жесткости линейной связи между величинами x и y . Таким образом, данную методику можно считать валидированной по показателям линейность и правильность.

Используя параметры линейной зависимости (стандартное отклонение свободного члена s_a и угол наклона b), были рассчитаны, предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) [12, 28, 62]:

$$\text{ПО} = 3,3 \cdot s_a / b = 3,3 \cdot 65 / 4,8 \cdot 10^4 = 0,0045 \text{ мг/мл}$$

$$\text{ПКО} = 10 \cdot s_a / b = 10 \cdot 65 / 4,8 \cdot 10^4 = 0,0135 \text{ мг/мл}$$

В нашем случае, при рабочей концентрации субстанции 5%, возможно обнаружение примеси диметилформаида в концентрации 100 ppm и менее.

Прецизионность (сходимость) методики оценивали с использованием модельных смесей на основе СО VMA-10-13 с добавкой диметилформаида, по девяти точкам на трех уровнях [12, 28, 62] содержания диметилформаида (500; 1000 и 1500 ppm). Результаты определений представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Результаты определения прецизионности (сходимости) методики определения диметилформаида в модельных смесях

Уровень	Взято ДМФА, мг/мл	Площадь пика, mV·сек	Найдено ДМФА, мг/мл	Найдено ДМФА, %	Метрологические характеристики
1	0,0248	1121	0,0239	96,50	$\bar{X} = 97,85$ $S = 1,04$ $S_{\bar{X}} = 0,35$ $\Delta X = 2,46$ $\Delta \bar{X} = 0,80$ $\varepsilon = 2,51\%$ $\bar{\varepsilon} = 0,82\%$ $\delta = \bar{X} - 100 = 2,15$
		1139	0,0243	98,05	
		1151	0,0246	99,08	
2	0,0495	2289	0,0489	98,72	
		2271	0,0485	97,94	
		2243	0,0479	96,74	
3	0,0743	3374	0,0720	96,94	
		3457	0,0738	99,33	
		3387	0,0723	97,32	
$C_o = 0,0475; S_o = 2225$					
Критерии приемлемости прецизионности (сходимости) [62]					
Тест		max Δ_{As} , %		Требования	Вывод
Предельные тесты		16		2,46 < 16	Соответствует
Количественные тесты		5		2,46 < 5	Соответствует

Как следует из данных таблицы 21, методика определения примеси диметилформамида характеризуется достаточной прецизионностью (сходимостью) и является корректной.

По разработанной методике (приложение 2) был проведен анализ 5 лабораторных серий субстанции VMA-10-13. Содержание примеси диметилформамида во всех образцах не превышало 880 ppm (0,088%).

Разработанная методика включена в проект НД для определения предельного содержания остаточных органических растворителей в субстанции VMA-10-13.

3.6. Количественное определение субстанции VMA-10-13

Исходя из особенностей химической структуры и спектральных характеристик VMA-10-13, нами была исследована возможность использования для количественного определения VMA-10-13 в субстанции методов кислотно-основного титрования в неводных средах и спектрофотометрии в ультрафиолетовой области.

3.6.1. Метод кислотно-основного титрования в неводных средах

Изучение нормативной документации на фармацевтические субстанции ЛС производных хиназолина показало, что для их количественного определения широко используется метод кислотно-основного титрования в среде протогенных растворителей (раздел 1.3.2). Этот же метод используется, как правило, и для количественного определения субстанций, содержащих в своей структуре азотсодержащие гетероциклические системы [24, 27, 30, 91, 107, 114, 135].

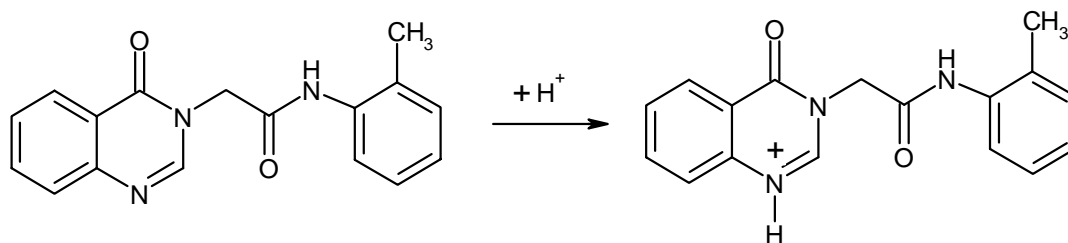
При разработке методики количественного определения методом неводного титрования необходимо знать значение pK_A , которое характеризует кислотно-основные свойства исследуемого вещества, установить природу и состав используемых растворителей, способ индикации конечной точки титрования.

Наличие в химической структуре VMA-10-13 гетероциклических атомов азота с неподелённой парой электронов обуславливает его

слабовыраженные основные свойства. Значение pK_A VMA-10-13, как основания, составляет 4,73 [122]:



На основании значения pK_A можно сделать вывод о достаточно слабых основных свойствах VMA-10-13, что подтверждает целесообразность разработки методики его количественного определения на основе метода неводной ацидиметрии в среде протогенных растворителей [28, 34]:



Анализ методик количественного определения органических азотсодержащих оснований, описанных в литературе и приведенных в действующей нормативной документации, показал, что наиболее часто используемыми протогенными растворителями являются безводная уксусная кислота, уксусный ангидрид, муравьиная кислота, а также их смеси [27, 28, 30, 91, 107, 114, 135].

На первом этапе наших исследований [16] был проведен выбор оптимального состава протогенного растворителя для титрования.

Так как исследуемая субстанция нерастворима в безводной уксусной кислоте и уксусном ангидриде, взятую для титрования навеску вначале растворяли в муравьиной кислоте, а затем добавляли безводную уксусную кислоту или уксусный ангидрид [34]. Были исследованы смеси протогенных растворителей:

- 1 - муравьиная кислота – уксусный ангидрид;
- 2 - муравьиная кислота – безводная уксусная кислота.

Критериями выбора оптимального состава растворителя служили: наличие четкого скачка на кривой потенциометрического титрования, а также количественное содержание определяемого вещества, рассчитанное по результатам титрования.

Для этого около 0,2 г (точная навеска) СО VMA-10-13 растворяли в 1 мл муравьиной кислоты, прибавляли 30 мл уксусного ангидрида (или безводной уксусной кислоты) и титровали 0,1 М раствором хлорной кислоты.

Титрование осуществляли из микробюретки с ценой деления 0,01 мл, фиксируя конечную точку титрования потенциометрически с помощью иономера «ЭКСПЕРТ-001» с комбинированным стеклянным электродом ЭСК-10605. По данным потенциометрического титрования были построены соответствующие кривые (рисунок 18).

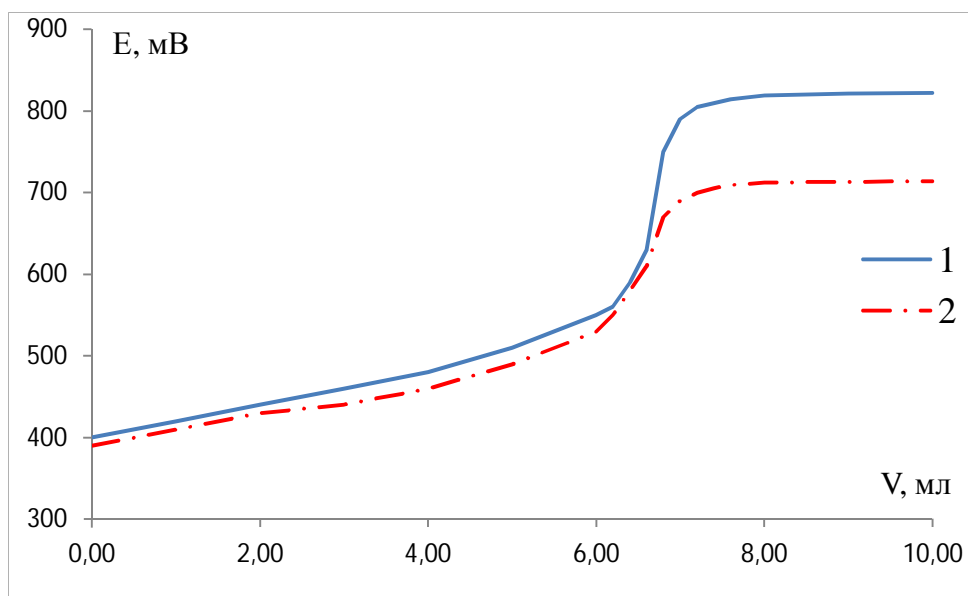


Рисунок 18 – Кривые потенциометрического титрования VMA-10-13 в среде муравьиная кислота – уксусный ангидрид (1) и муравьиная кислота – безводная уксусная кислота (2)

Как следует из полученных результатов, смесь муравьиная кислота – уксусный ангидрид дает более выраженный скачок потенциала в точке эквивалентности. Это может быть следствием увеличения ионной активности хлорной кислоты, то есть в этом случае можно предположить образование более сильной комплексной кислоты [2, 34]. Кроме того, уксусный ангидрид

позволяет устранить возможное наличие примеси воды в муравьиной кислоте, используемой для растворения навески определяемой субстанции. Поэтому данную смесь использовали в дальнейшем для разработки методики количественного определения.

Так как при инструментальной индикации точки эквивалентности проведение контрольного опыта обычным путем неосуществимо, проводили титрование двух разных навесок определяемого вещества. Величина разности расходов титранта на эти навески не должна быть меньше 5 мл. Расчет результата определения в процентах (X) при этом проводят по величине разности расхода титранта в основном и контрольном опытах, отнесенной к разности навесок, что исключает ошибку, связанную с нецелевым расходом титранта, практически одинаковым при титровании каждой из навесок [25, 28]:

$$X = \frac{(V - V_o) \cdot K \cdot 29,33 \cdot 100}{(a - a_o) \cdot 1000}$$

V – объем титранта, израсходованный на титрование в основном опыте, мл;

V_o – объем титранта, израсходованный на титрование в контрольном опыте, мл;

K – поправочный коэффициент 0,1 М раствора хлорной кислоты;

a – масса навески в основном опыте, г;

a_o – масса навески в контрольном опыте, г.

Для оценки пригодности предлагаемой методики была проведена её валидация. В соответствии с рекомендациями [28, 62], мы провели одновременное изучение линейности, правильности и прецизионности (сходимости) предлагаемой методики. Были проведены 9 количественных определений в пределах аналитической области (80 – 120%) изучаемой методики.

Для этого точные навески (от 0,16 до 0,24 г) СО VMA-10-13 растворяли в 1 мл муравьиной кислоты, прибавляли 30 мл уксусного ангидрида и

титровали 0,1 М раствором хлорной кислоты. Конечную точку титрования определяли потенциометрически. Параллельно проводили контрольный опыт с 0,05 г (точная навеска) СО VMA-10-13.

Полученные результаты приведены в таблице 22.

Таблица 22 – Результаты количественного определения VMA-10-13 методом неводного титрования

Уровень	№	Навеска, г	Объем титранта, мл	Найдено, г	Найдено, %
1	1	0,1583	5,38	0,1586	100,17
	2	0,1727	5,84	0,1718	99,46
	3	0,1815	6,17	0,1819	100,20
2	4	0,1919	6,51	0,1917	99,92
	5	0,2004	6,79	0,1999	99,76
	6	0,2093	7,11	0,2095	100,11
3	7	0,2196	7,44	0,2191	99,76
	8	0,2318	7,84	0,2308	99,55
	9	0,2427	8,22	0,2421	99,74
$a_0 = 0,0503; V_0 = 1,71; K = 1,005$					
Параметры линейной зависимости «навеска – объем титранта»			Метрологическая характеристика результатов определений		
$b = 33,68$ $S_b = 0,15$ $\Delta b = 0,37$ $a = 0,045$ $S_a = 0,031$ $\Delta a = 0,074$ $r = 0,99993$ $y = 33,68 \cdot x + 0,045$			$\bar{X} = 99,85$ $S = 0,27; S_{\bar{X}} = 0,09$ $\Delta X = 0,61; \Delta \bar{X} = 0,20$ $\varepsilon = 0,62\%; \bar{\varepsilon} = 0,20\%$ $\delta = \bar{X} - 100 = 0,15$		

Для оценки линейности методики (рисунок 19) были рассчитаны параметры линейной зависимости «навеска – объем титранта»: угловой коэффициент (b) и свободный член (a), их стандартные отклонения (S_b и S_a) и полуширины доверительных интервалов (Δb и Δa), коэффициент корреляции (r).

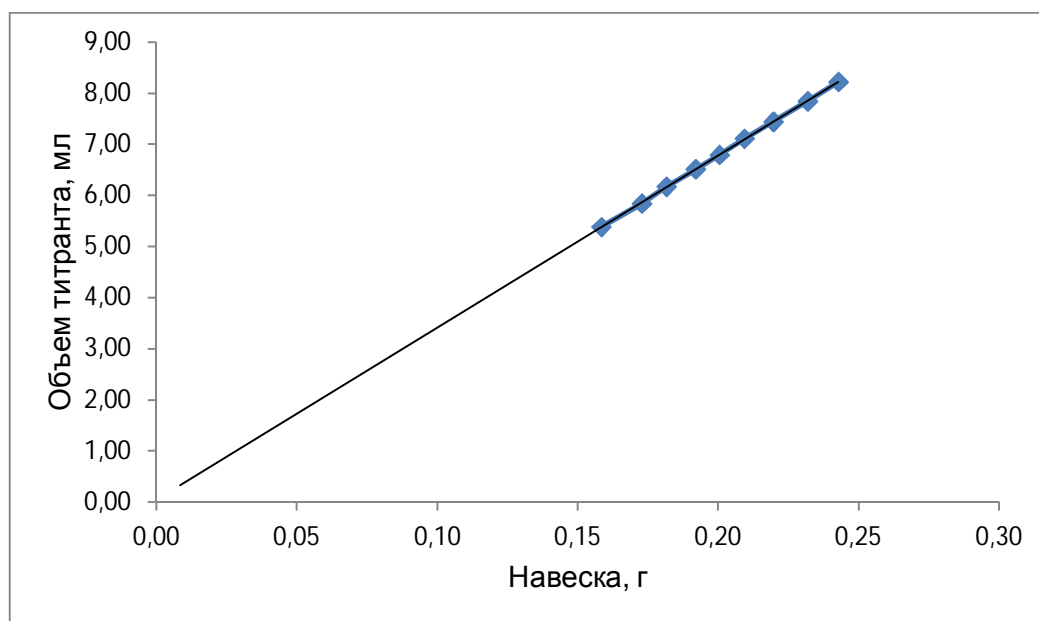


Рисунок 19 – График линейной зависимости «навеска – объем титранта» методики неводного титрования VMA-10-13

Выполнение критериев приемлемости методики количественного определения VMA-10-13 методом неводного титрования, принятые согласно рекомендациям [62], приведены в таблице 23.

Таблица 23 – Выполнение критериев приемлемости методики количественного определения VMA-10-13 в субстанции методом неводного титрования

Допуск содержания, В%	Критерий приемлемости [62]	Полученные значения	Вывод
Линейная зависимость ($y = bx + a$)			
± 1%	$ a \leq \Delta a$	0,045 < 0,074	Выполняется
	$r \geq 0.99926$	0,99993 > 0.99926	Выполняется
Правильность			
± 1%	$\delta < (\Delta X/\sqrt{9})$	0,15 < 0,20	Выполняется
	$\delta < (0,32 \cdot \max \Delta_{As})$	0,15 < 0,32	Выполняется
Прецизионность (сходимость)			
± 1%	$\Delta X \leq \max \Delta_{As}$	0,61 < 1,0	Выполняется

Правильность методики оценивали по критериям статистической – $\delta < (\Delta X/\sqrt{9})$ и практической – $\delta < (0,32 \cdot \max \Delta_{As})$ незначимости [62].

При оценке прецизионности (сходимости) односторонний доверительный интервал (ΔX) не превышал максимально допустимую неопределенность результатов анализа ($\max \Delta_{AS}$) [62].

Как следует из данных таблицы 23, методика количественного определения VMA-10-13 для субстанций с допусками содержания основного вещества $B = \pm 1\%$ ($\max \Delta_{AS} = 1,0\%$) линейна, не имеет статистически значимой систематической погрешности, характеризуется достаточной прецизионностью (сходимостью) и является корректной.

Далее нами было проведено определение внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности валидируемой методики. Ее определяли в условиях, при которых результаты получали одним и тем же методом одним и тем же сотрудником с использованием одного и того же оборудования в течение двух дней [28, 76]. Внутрилабораторную (промежуточную) прецизионность валидируемой методики определяли в течение двух дней по ряду последовательных измерений испытуемых растворов.

Проверку соответствия полученного ряда экспериментальных данных нормальному закону распределения при уровне значимости $\alpha = 0,05$ проводили с помощью критерия согласия Пирсона χ^2 (хи-квадрат) [43, 48]. Так как рассчитанное нами значение критерия $\chi^2_{\text{набл.}} = 3,60$ меньше критического значения $\chi^2_{\text{кр.}} = 5,99$, была принята гипотеза о подчинении выборки нормальному закону распределения.

Результаты определения внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения субстанции VMA-10-13 методом неводного титрования приведены таблице 24.

Оценку внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности проводили двумя способами [76]: с использованием F-критерия Фишера и t-критерия Стьюдента, а также путем сравнения максимального различия относительных средних результатов анализа Δ_{\max} с максимально допустимой относительной неопределенностью анализов $\max \Delta_{AS}$ [76].

Таблица 24 – Результаты определения внутрилабораторной прецизионности методики неводного титрования субстанции VMA-10-13

№	1-й день			2-й день		
	$a_o = 0,0493$ г		$V_o = 1,68$ мл	$a_o = 0,0518$ г		$V_o = 1,76$ мл
	Взято, мг	Объем, мл	Найдено, %	Взято, мг	Объем, мл	Найдено, %
1	0,2017	6,84	99,80	0,1937	6,55	99,50
2	0,1978	6,70	99,64	0,1996	6,75	99,52
3	0,2079	7,05	99,80	0,2108	7,17	100,29
4	0,1935	6,54	99,35	0,1981	6,71	99,73
5	0,1984	6,75	100,23	0,2039	6,91	99,81
6	0,2034	6,89	99,66	0,1973	6,71	100,28
Среднее (\bar{X})	99,75			99,86		
Стандартное отклонение (S)	0,29			0,36		
Дисперсия (S^2)	0,08			0,13		
$\Delta\bar{X}$	0,31			0,37		
Δ_{\max}	0,79					
F-критерий Фишера	1,50					
t-критерий Стьюдента	0,58					

Как следует из данных таблицы 24 расчетное значения F-критерия Фишера 1,50 меньше его табличной величины 5,05 для доверительной вероятности $P=95\%$ и числа степеней свободы $f_1=(n_1-1)$, $f_2=(n_2-1)$. Поэтому дисперсии результатов двух анализов статистически эквивалентны.

Расчетное значение t-критерий Стьюдента 0,58 меньше табличного 2,23 для доверительной вероятности $P=95\%$ и числа степеней свободы $f=(n_1+n_2-2)$, поэтому различие средних результатов двух анализов статистически незначимо.

Также условием приемлемости внутрилабораторной прецизионности методики является неравенство: $\Delta_{\max} = |\bar{X}_1 - \bar{X}_2| + (\Delta\bar{X}_1 + \Delta\bar{X}_2) \leq \max\Delta_{As}$. Как следует из данных таблицы 24 – $0,79 < 1$.

На основании проведенных исследований нами предложена методика количественного определения субстанции VMA-10-13 методом кислотно-основного титрования в неводных средах (приложение 2).

С помощью разработанной методики нами было проведено количественное определение 5 лабораторных серий субстанции VMA-10-13 (таблица 25).

Таблица 25 - Результаты количественного определения лабораторных серий субстанции VMA-10-13 методом неводного титрования

Серия	Навеска, г	Объем титранта, мл	Найдено, %	Метрологическая характеристика (P = 95%; f = 6)
001	0,1959	6,62	99,67	$\bar{X} = 99,83$ $S = 0,303$ $S_{\bar{X}} = 0,114$ $\Delta\bar{X} = 0,28$ $\bar{\varepsilon} = 0,28\%$ $\varepsilon = 0,74\%$
	0,2096	7,12	100,39	
	0,2032	6,87	99,75	
	0,2081	7,02	99,47	
	0,1983	6,72	100,06	
	0,2073	7,01	99,79	
	0,1938	6,55	99,69	
002	0,2014	6,84	100,36	$\bar{X} = 99,95$ $S = 0,348$ $S_{\bar{X}} = 0,132$ $\Delta\bar{X} = 0,32$ $\bar{\varepsilon} = 0,32\%$ $\varepsilon = 0,85\%$
	0,2132	7,20	99,63	
	0,1983	6,73	100,27	
	0,2078	7,04	100,04	
	0,2006	6,77	99,52	
	0,1939	6,55	99,64	
	0,1981	6,72	100,20	
003	0,2074	7,02	99,97	$\bar{X} = 99,71$ $S = 0,281$ $S_{\bar{X}} = 0,106$ $\Delta\bar{X} = 0,26$ $\bar{\varepsilon} = 0,26\%$ $\varepsilon = 0,69\%$
	0,1958	6,61	99,61	
	0,1932	6,52	99,56	
	0,1997	6,74	99,58	
	0,2064	7,00	100,23	
	0,2014	6,79	99,44	
	0,1988	6,71	99,59	
004	0,1983	6,73	100,34	$\bar{X} = 99,86$ $S = 0,296$ $S_{\bar{X}} = 0,112$ $\Delta\bar{X} = 0,27$ $\bar{\varepsilon} = 0,27\%$ $\varepsilon = 0,73\%$
	0,2048	6,91	99,55	
	0,1929	6,52	99,77	
	0,2081	7,03	99,72	
	0,1973	6,69	100,21	
	0,2075	7,01	99,72	
	0,1969	6,65	99,67	

005	0,1962	6,63	99,61	$\bar{X} = 99,81$ $S = 0,364$ $S_{\bar{X}} = 0,137$ $\Delta\bar{X} = 0,34$ $\bar{\varepsilon} = 0,34\%$ $\varepsilon = 0,89\%$
	0,2064	7,01	100,30	
	0,1981	6,70	99,73	
	0,2117	7,19	100,30	
	0,2007	6,79	99,77	
	0,1986	6,71	99,59	
	0,1945	6,56	99,35	

Таким образом, была экспериментально подтверждена возможность использования метода неводного титрования для количественного определения содержания VMA-10-13 в субстанции. Установлено, что разработанная методика позволяет с достаточной точностью провести количественное определение субстанции VMA-10-13 с нормированным содержанием 99,0 - 101,0 %. Методика рекомендована для включения в проект НД (приложение 2).

3.6.2. Метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой области

Спектр поглощения в ультрафиолетовой области раствора VMA-10-13 в спирте 96% имеет полосы поглощения с максимумами при 226 и 265 нм (раздел 3.2.2). Наиболее подходящей для количественного определения исследуемой субстанции, на наш взгляд, является вторая полоса поглощения (265 нм), так как находится в сравнительно селективной области спектра и является более пологой по сравнению с полосой с максимумом при 226 нм. В то же время полоса поглощения при 226 нм характеризуется большим удельным поглощением, что должно обеспечивать большую чувствительность методики [60].

С целью выбора оптимального значения аналитической длины волны нами было изучено подчинение испытуемых растворов основному закону светопоглощения в области концентраций 0,005 – 0,04 мг/мл (для длины волны 265 нм) и 0,001 – 0,008 мг/мл (для длины волны 226 нм) [59]. Для построения градуировочных графиков (рисунки 20 и 21) готовили по 7 растворов VMA-10-13 в спирте 96% путем разведения стандартного 0,05%

спиртового раствора VMA-10-13 и измеряли оптическую плотность полученных растворов при 226 и 265 нм.

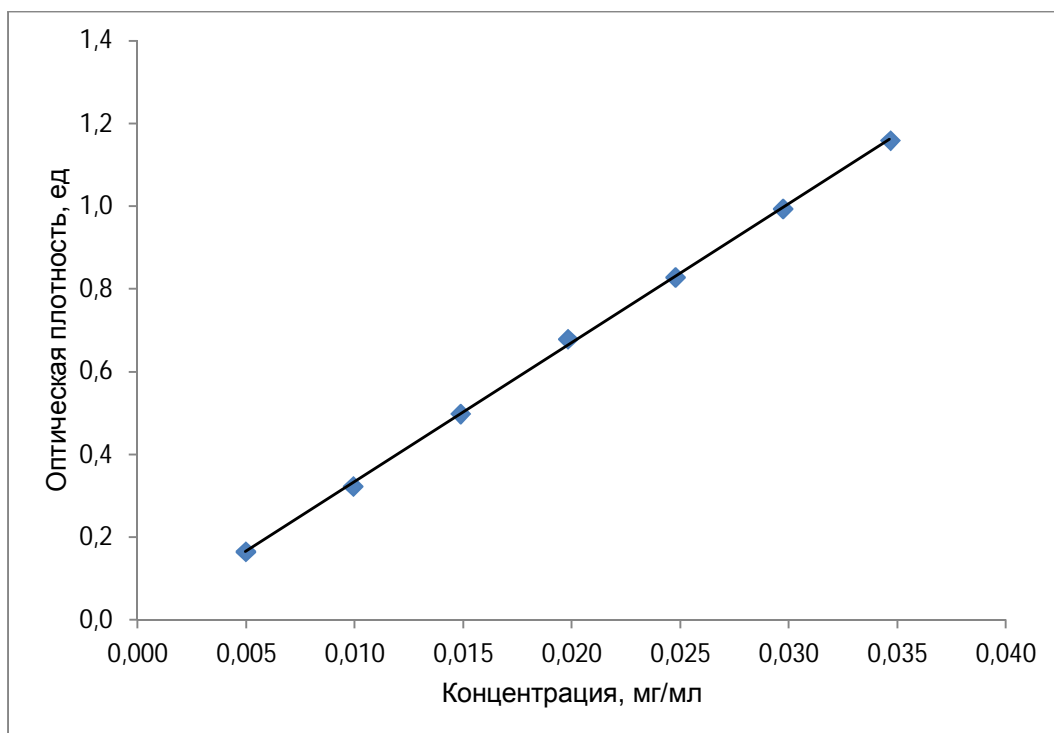


Рисунок 20 – График зависимости оптической плотности от концентрации раствора VMA-10-13 при 265 нм

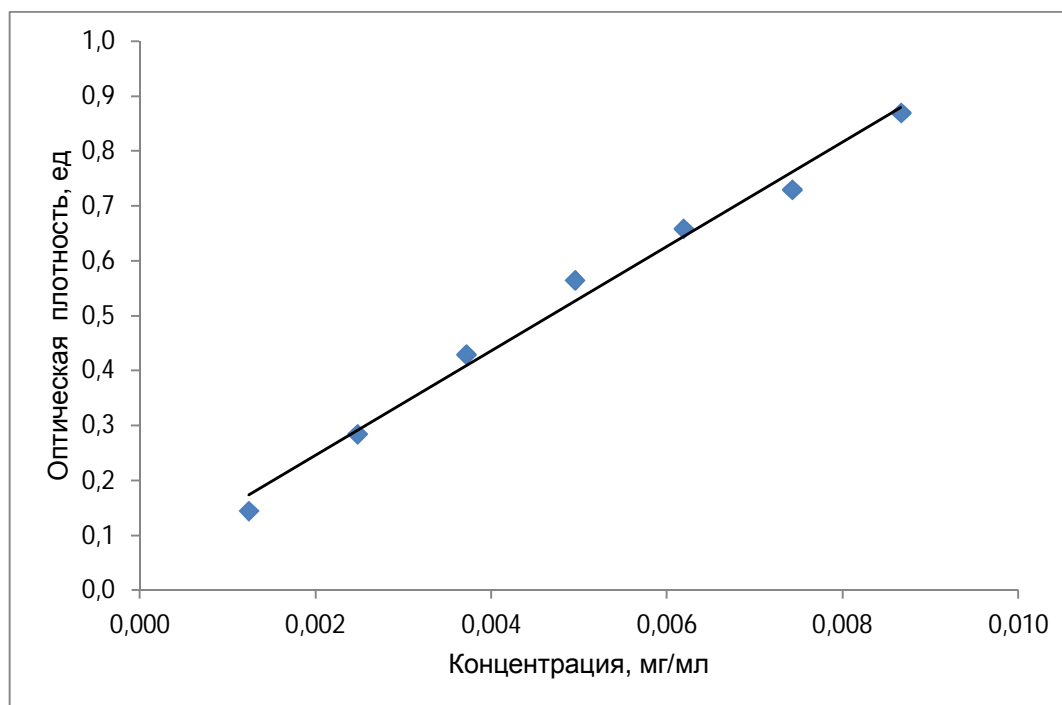


Рисунок 21 – График зависимости оптической плотности от концентрации раствора VMA-10-13 при 226 нм

Результаты определений и их метрологические характеристики приведены в таблице 26.

Таблица 26 – Результаты определений подчинения основному закону светопоглощения и расчета удельного показателя поглощения VMA-10-13

226 нм		265 нм		Удельный показатель поглощения, $A_{1\text{см}}^{1\%}$	
Концентрация, мг/мл (x_i)	Оптическая плотность, (y_i)	Концентрация, мг/мл (x_i)	Оптическая плотность, (y_i)	226 нм	265 нм
0,00124	0,145	0,00495	0,165	1171,7	333,3
0,00248	0,285	0,00990	0,323	1151,5	326,3
0,00371	0,430	0,01485	0,498	1158,2	335,4
0,00495	0,565	0,01980	0,679	1141,4	342,9
0,00619	0,659	0,02475	0,828	1065,1	334,5
0,00743	0,730	0,02970	0,994	983,2	334,7
0,00866	0,870	0,03465	1,159	1004,3	334,5
Параметры линейной зависимости $y = b \cdot x + a$			Метрологическая характеристика результатов определения $A_{1\text{см}}^{1\%}$		
226 нм		265 нм		226 нм	265 нм
$b = 95,07$		$b = 33,58$		$\bar{X} = 1096,5$	$\bar{X} = 334,5$
$S_b = 4,38$		$S_b = 0,31$		$S = 78,36$	$S = 4,85$
$\Delta b = 11,24$		$\Delta b = 0,79$		$S_{\bar{X}} = 29,62$	$S_{\bar{X}} = 1,83$
$a = 0,056$		$a = -0,0011$		$\Delta \bar{X} = 72,5$	$\Delta \bar{X} = 4,5$
$S_a = 0,024$		$S_a = 0,0068$		$\bar{\varepsilon} = 6,6\%$	$\bar{\varepsilon} = 1,3\%$
$\Delta a = 0,062$		$\Delta a = 0,0174$		$A_{1\text{см}}^{1\%} =$	$A_{1\text{см}}^{1\%} =$
$r = 0,99475$		$r = 0,99979$		$1096,5 \pm 72,5$	$334,5 \pm 4,5$

Методом наименьших квадратов были рассчитаны параметры линейной зависимости: угловой коэффициент (b) и свободный член (a), их стандартные отклонения (S_b и S_a) и полуширины доверительных интервалов (Δb и Δa), коэффициент корреляции (r).

Критерии приемлемости параметров линейной зависимости, принятые согласно рекомендациям [62], приведены в таблице 27.

Таблица 27 – Критерии приемлемости параметров линейной зависимости

Длина волны	Требования для субстанций ($B = \pm 2\%$)	Полученные значения	Вывод
226 нм	$ a \leq \Delta a$	$0,056 < 0,062$	Выполняется
	$r \geq 0,99702$	$0,99475 < 0,99702$	Не выполняется
265 нм	$ a \leq \Delta a$	$0,0011 < 0,0174$	Выполняется
	$r \geq 0,99702$	$0,99979 > 0,99702$	Выполняется

Выполнение неравенства: свободный член уравнения линейной зависимости меньше или равен его доверительному интервалу доказывает отсутствие систематической погрешности методики при обеих длинах волн. Коэффициент корреляции (r) является показателем жесткости линейной связи между величинами x и y , то есть чем ближе его абсолютная величина $|r|$ к единице, тем менее случайна наблюдаемая линейная зависимость. Согласно требованиям [62], для аналитических целей используют линейную зависимость с коэффициентом корреляции $r \geq 0,99702$. Данное требование выполняется для длины волны 265 нм и не выполняется для 226 нм.

Таким образом, рассчитанные значения параметров линейной зависимости соответствуют критериям приемлемости для длины волны $\lambda=265$ нм в диапазоне концентраций от 0,005-0,04 мг/мл. Поэтому в качестве рабочей длины волны для количественного определения нами была выбрана длина волны 265 нм и концентрация раствора СО 0,01 мг/мл.

Результаты определения удельного показателя поглощения, приведенные в таблице 26, позволили нормировать данный показатель в пределах $334,5 \pm 4,5$ с относительной погрешностью 1,3% и использовать его при количественном определении субстанции VMA-10-13.

Проведенные исследования позволили нам предложить методику количественного определения субстанции VMA-10-13 (приложение 2).

Для оценки пригодности предлагаемой методики была проведена её валидация [28, 62].

Руководствуясь принципом параллельного определения валидационных характеристик [28, 62], прецизионность (сходимость) и правильность методики оценивали одновременно по 9 количественным определениям СО VMA-10-13 в пределах аналитической области (80 - 120%) изучаемой методики. Полученные результаты приведены в таблице 28.

Таблица 28 – Результаты количественного определения VMA-10-13 методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой области

№	Взято, г	A_i	Найдено, г	Найдено, %	Метрологические характеристики
1	0,0391	0,260	0,0389	99,40	$\bar{X} = 99,79$ $S = 0,62$ $S_{\bar{X}} = 0,21$ $\Delta X = 1,42$ $\Delta \bar{X} = 0,47$ $\varepsilon = 1,43\%$ $\bar{\varepsilon} = 0,47\%$ $\delta = \bar{X} - 100 = 0,21$
2	0,0403	0,269	0,0402	99,77	
3	0,0407	0,274	0,0410	100,63	
4	0,0493	0,328	0,0490	99,45	
5	0,0501	0,332	0,0496	99,05	
6	0,0509	0,342	0,0511	100,43	
7	0,0595	0,397	0,0593	99,73	
8	0,0605	0,407	0,0608	100,56	
9	0,0611	0,405	0,0605	99,08	

Расчет выполнения критериев правильности и прецизионности [62] приведен в таблице 29. Правильность методики оценивали по критериям статистической и практической незначимости. При оценке прецизионности (сходимости) односторонний доверительный интервал (ΔX) не должен превышать максимально допустимую неопределенность результатов анализа ($\max \Delta_{As}$) [62].

Как следует из данных таблицы 29, спектрофотометрическая методика количественного определения VMA-10-13 для субстанций с допусками содержания основного вещества $\pm 2\%$ ($\max \Delta_{As} = 2,0\%$) не имеет статистически значимой систематической погрешности, характеризуется достаточной прецизионностью (сходимостью) и является корректной. В то же время, для субстанций с допуском содержания основного вещества $\pm 1\%$, данный метод

не может быть использован из-за очень малого значения допустимой неопределенности анализа ($\max\Delta_{As} = 1,0\%$).

Таблица 29 – Выполнение критериев приемлемости методики количественного определения субстанции VMA-10-13 методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой области

Допуск содержания, В%	Критерий приемлемости [62]	Полученные значения	Вывод
Правильность			
± 1%	$\delta < (\Delta X/\sqrt{9})$	0,21 < 0,47	Выполняется
	$\delta < (0,32 \cdot \max\Delta_{As})$	0,21 < 0,32	Выполняется
± 2%	$\delta < \Delta X/\sqrt{9}$	0,21 < 0,47	Выполняется
	$\delta < (0,32 \cdot \max\Delta_{As})$	0,21 < 0,64	Выполняется
Прецизионность (сходимость)			
± 1%	$\Delta X \leq \max\Delta_{As}$	1,42 > 1,0	Не выполняется
± 2%	$\Delta X \leq \max\Delta_{As}$	1,42 < 2,0	Выполняется

Далее нами было проведено определение внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности валидируемой методики [28, 76].

Определение проводили в течение двух дней по ряду последовательных измерений испытуемых растворов. Полученные результаты приведены в таблице 30.

Проверку соответствия полученного ряда экспериментальных данных нормальному закону распределения при уровне значимости $\alpha = 0,05$ проводили с помощью критерия согласия Пирсона χ^2 (хи-квадрат) [43, 48]. Так как рассчитанное нами значение критерия $\chi^2_{\text{набл.}} = 2,11$ меньше критического значения $\chi^2_{\text{кр.}} = 5,99$, была принята гипотеза о подчинении выборки нормальному закону распределения.

Таблица 30 – Результаты определения внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики количественного определения VMA-10-13 методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой области

№	1-й день			2-й день		
	Навеска, г (a_i)	A_i	Найдено, % (X_i)	Навеска, г (a_j)	A_i	Найдено, % (X_j)
1	0,0496	0,334	100,66	0,0511	0,338	98,87
2	0,0503	0,334	99,25	0,0493	0,330	100,06
3	0,0491	0,330	100,46	0,0485	0,325	100,16
4	0,0498	0,332	99,65	0,0499	0,331	99,15
5	0,0509	0,338	99,26	0,0503	0,333	98,96
6	0,0495	0,329	99,35	0,0491	0,327	99,55
Среднее (\bar{X})	99,77			99,46		
Стандартное отклонение (S)	0,63			0,56		
Дисперсия (S^2)	0,40			0,31		
$\Delta\bar{X}$	0,66			0,59		
Δ_{\max}	1,56					
F-критерий Фишера	1,28					
t-критерий Стьюдента	0,91					

Как следует из данных таблицы 30 расчетное значение F-критерия Фишера 1,28 меньше его табличной величины 5,05 для доверительной вероятности $P=95\%$ и числа степеней свободы $f_1=(n_1-1)$, $f_2=(n_2-1)$. Поэтому дисперсии результатов двух анализов статистически эквивалентны [76].

Так как расчетное значение t-критерий Стьюдента 0,91 меньше табличного 2,23 для доверительной вероятности $P=95\%$ и числа степеней свободы $f=(n_1+n_2-2)$, различие средних результатов двух анализов статистической незначимо [76].

Также условием приемлемости внутрилабораторной прецизионности методики является неравенство: $\Delta_{\max} = |\bar{X}_1 - \bar{X}_2| + (\Delta\bar{X}_1 + \Delta\bar{X}_2) \leq \max\Delta_{AS}$. Как следует из данных таблицы 30 – $1,56 < 2$.

Все это является достаточным основанием для вывода о внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики.

С помощью разработанной методики нами был проведен анализ 5 лабораторных серий субстанции VMA-10-13. Результаты определений представлены в таблице 31.

Таблица 31 – Результаты количественного определения лабораторных серий субстанции VMA-10-13 методом спектрофотометрии в ультрафиолетовой области

Серия	Навеска, г (a_i)	A_i	Найдено, % (X_i)	Метрологические характеристики ($P = 95\%$; $f = 6$)
1	2	3	4	5
001	0,0485	0,323	99,91	$\bar{X} = 99,96$ $S = 0,500$ $S_{\bar{X}} = 0,189$ $\Delta\bar{X} = 0,46$ $\bar{\varepsilon} = 0,46\%$ $\varepsilon = 1,22\%$
	0,0508	0,341	100,70	
	0,0501	0,335	100,31	
	0,0496	0,329	99,51	
	0,0510	0,341	100,31	
	0,0491	0,325	99,30	
	0,0495	0,329	99,71	
002	0,0497	0,329	99,27	$\bar{X} = 100,27$ $S = 0,716$ $S_{\bar{X}} = 0,271$ $\Delta\bar{X} = 0,66$ $\bar{\varepsilon} = 0,66\%$ $\varepsilon = 1,75\%$
	0,0508	0,342	100,96	
	0,0503	0,338	100,77	
	0,0489	0,329	100,89	
	0,0506	0,337	99,87	
	0,0493	0,331	100,68	
	0,0499	0,331	99,47	
003	0,0508	0,335	98,77	$\bar{X} = 99,83$ $S = 0,535$ $S_{\bar{X}} = 0,202$ $\Delta\bar{X} = 0,49$ $\bar{\varepsilon} = 0,50\%$ $\varepsilon = 1,31\%$
	0,0489	0,327	100,16	
	0,0503	0,336	100,05	
	0,0517	0,346	100,24	
	0,0498	0,331	99,55	
	0,0509	0,339	99,75	
	0,0487	0,326	100,26	

1	2	3	4	5
004	0,0493	0,329	100,14	$\bar{X} = 100,07$ $S = 0,679$ $S_{\bar{X}} = 0,257$ $\Delta\bar{X} = 0,63$ $\bar{\varepsilon} = 0,63\%$ $\varepsilon = 1,66\%$
	0,0485	0,323	99,94	
	0,0512	0,338	99,06	
	0,0504	0,339	100,93	
	0,0519	0,345	99,75	
	0,0495	0,333	100,95	
	0,0498	0,331	99,74	
005	0,0507	0,337	99,70	$\bar{X} = 99,89$ $S = 0,352$ $S_{\bar{X}} = 0,133$ $\Delta\bar{X} = 0,33$ $\bar{\varepsilon} = 0,33\%$ $\varepsilon = 0,86\%$
	0,0512	0,342	100,19	
	0,0497	0,329	99,29	
	0,0492	0,329	100,30	
	0,0501	0,333	99,69	
	0,0514	0,343	100,09	
	0,0492	0,328	99,99	

Таким образом, была экспериментально подтверждена возможность использования метода УФ-спектрофотометрии для количественного определения содержания VMA-10-13 в субстанции. Установлено, что разработанная методика позволяет с достаточной точностью провести количественное определение субстанции VMA-10-13 с нормированным содержанием 98,0–102,0 %.

Методика рекомендована для включения в проект НД, как альтернативная методике неводного титрования (приложение 2).

3.7. Нормы качества субстанции VMA-10-13

На основании результатов проведенных испытаний (глава 3), а также существующих требований к качеству фармацевтических субстанций [55, 63], нами были установлены нормы качества и разработан проект НД субстанции VMA-10-13 (приложение 2).

3.8. Установление срока годности субстанции VMA-10-13

При установлении срока годности субстанции VMA-10-13 руководствовались требованиями ОФС.1.1.0009.18 [28]. Изучение стабильности субстанции при хранении проводили в естественных условиях. Для этого 5 лабораторных серий субстанции VMA-10-13 хранили в сухом защищенном от света месте, в склянках оранжевого стекла с притертыми пробками, при комнатной температуре в течение 2 лет. Контроль качества образцов проводили через промежутки времени, равные в течение первого года хранения – через каждые 3 месяца, в течение второго года хранения – через каждые 6 месяцев хранения. Проведенные исследования (таблица 32) показали, что стабильность основных показателей качества субстанции VMA-10-13 в условиях долгосрочного хранения сохраняется не менее 2-х лет. При этом, результаты определения родственных примесей показали отсутствие посторонних пиков на полученных хроматограммах, что свидетельствует о стабильности субстанции в процессе хранения.

Таким образом, может быть установлен предварительный срок годности – 2 года.

Таблица 32 – Результаты определения показателей качества субстанции VMA-10-13 при хранении в естественных условиях

Серия	Срок хранения, месяц	Описание	Подлинность 1.ИК-спектр 2.УФ-спектр	Потеря в массе при высушивании, %	Температура плавления, °С	Родственные примеси, %	Содержание, %	
							Неводное титрование	Спектрофотометрия
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Норма		Аморфный порошок белого цвета с розоватым оттенком, со специфическим запахом	1.Соответствие спектру стандартного образца 2. $\lambda_{\text{макс}} = 226 \pm 2$ нм, 265 ± 2 нм	Не более 0,5%	От 257 до 261 °С	Не более 0,1%	Не менее 98,0 % и не более 102,0% (в пересчете на сухое вещество)	
001	0	Соответствует	Соответствуют	0,37	258 – 260	Менее 0,1%	99,83	99,96
	3	Соответствует	Соответствуют	0,35	259 – 261	Менее 0,1%	99,91	100,09
	6	Соответствует	Соответствуют	0,37	258 – 259	Менее 0,1%	99,87	99,69
	9	Соответствует	Соответствуют	0,38	257 – 259	Менее 0,1%	99,79	99,73
	12	Соответствует	Соответствуют	0,39	257 – 259	Менее 0,1%	99,93	99,91
	18	Соответствует	Соответствуют	0,35	259 – 260	Менее 0,1%	99,81	100,14
	24	Соответствует	Соответствуют	0,36	258 – 260	Менее 0,1%	99,84	99,84
002	0	Соответствует	Соответствуют	0,32	259 – 261	Менее 0,1%	99,95	100,27
	3	Соответствует	Соответствуют	0,34	258 – 261	Менее 0,1%	99,74	99,87
	6	Соответствует	Соответствуют	0,33	257 – 259	Менее 0,1%	99,82	99,67
	9	Соответствует	Соответствуют	0,35	258 – 260	Менее 0,1%	99,79	100,06
	12	Соответствует	Соответствуют	0,32	258 – 259	Менее 0,1%	99,83	99,82
	18	Соответствует	Соответствуют	0,31	258 – 260	Менее 0,1%	99,78	100,04
	24	Соответствует	Соответствуют	0,33	257 – 258	Менее 0,1%	99,93	99,78

продолжение таблицы 32

1	2	3	4	5	6	7	8	9
003	0	Соответствует	Соответствуют	0,35	257 – 259	Менее 0,1%	99,71	99,83
	3	Соответствует	Соответствуют	0,37	258 – 259	Менее 0,1%	99,85	100,18
	6	Соответствует	Соответствуют	0,34	257 – 259	Менее 0,1%	99,63	99,76
	9	Соответствует	Соответствуют	0,35	258 – 259	Менее 0,1%	99,89	99,69
	12	Соответствует	Соответствуют	0,36	258 – 260	Менее 0,1%	99,69	100,06
	18	Соответствует	Соответствуют	0,34	257 – 259	Менее 0,1%	99,81	99,73
	24	Соответствует	Соответствуют	0,35	258 – 260	Менее 0,1%	99,79	99,84
004	0	Соответствует	Соответствуют	0,34	258 – 260	Менее 0,1%	99,86	100,07
	3	Соответствует	Соответствуют	0,31	258 – 259	Менее 0,1%	99,97	99,78
	6	Соответствует	Соответствуют	0,35	259 – 260	Менее 0,1%	99,68	99,71
	9	Соответствует	Соответствуют	0,34	258 – 260	Менее 0,1%	99,72	100,12
	12	Соответствует	Соответствуют	0,33	257 – 258	Менее 0,1%	99,83	99,83
	18	Соответствует	Соответствуют	0,32	258 – 259	Менее 0,1%	99,82	100,03
	24	Соответствует	Соответствуют	0,35	259 – 261	Менее 0,1%	99,91	99,86
005	0	Соответствует	Соответствуют	0,19	257 – 259	Менее 0,1%	99,81	99,89
	3	Соответствует	Соответствуют	0,21	257 – 258	Менее 0,1%	99,95	100,16
	6	Соответствует	Соответствуют	0,20	259 – 260	Менее 0,1%	99,79	99,74
	9	Соответствует	Соответствуют	0,18	259 – 261	Менее 0,1%	99,89	99,71
	12	Соответствует	Соответствуют	0,19	257 – 258	Менее 0,1%	99,93	99,98
	18	Соответствует	Соответствуют	0,21	259 – 260	Менее 0,1%	99,75	100,05
	24	Соответствует	Соответствуют	0,19	257 – 259	Менее 0,1%	99,82	99,89

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Исследованы физико-химические свойства и определены основные фармакопейные показатели качества субстанции нового БАС производного хиназолина VMA-10-13: описание, растворимость, температура плавления, рН раствора, кислотность или щелочность, потеря в массе при высушивании, сульфатная зола и тяжелые металлы, примеси неорганических анионов (хлориды).

2. Идентифицированы основные полосы поглощения VMA-10-13 в ИК-области спектра. Изучены УФ-спектры поглощения и их вторые производные спиртовых, нейтральных, щелочных и кислых растворов VMA-10-13. Установлена возможность использования спектрометрических методов для подтверждения подлинности и количественного определения субстанции VMA-10-13.

3. Исследована возможность идентификации VMA-10-13 при помощи химических реакций окисления и соле- комплексообразования, определена чувствительность реакций с различными реактивами. Реакции с реактивом Манделина и раствором серебра нитрата включены в проект НД.

4. Разработана и валидирована методика определения родственных примесей (незамещенный хиназолин-4(3H)-он) в субстанции VMA-10-13 методом ВЭЖХ. Определены условия проведения анализа и установлено, что методика позволяет определять содержание примеси при нормированном количестве не более 0,1%. Разработанная методика включена в проект НД.

5. Разработана методика определения остаточных органических растворителей (диметилформаид) в субстанции VMA-10-13 методом газовой хроматографии (подобраны оптимальные условия проведения анализа и выбран метод извлечения). Разработанная методика включена в проект НД.

6. Разработаны и валидированы методики количественного определения VMA-10-13 в субстанции методами кислотно-основного титрования в неводных средах и УФ-спектрофотометрии. Проведен выбор

оптимального состава протогенного растворителя и установлено, что методика неводного титрования пригодна при нормированном содержании вещества в субстанции 99,0–101,0 %. Определены условия проведения спектрофотометрии в УФ-области и установлено, что данную методику можно использовать при нормированном содержании вещества в субстанции 98,0–102,0 %. Методики включены в проект НД как альтернативные.

7. Установлен срок годности субстанции VMA-10-13 (при хранении в естественных условиях) – 2 года в сухом защищенном от света месте при комнатной температуре.

8. Установлены нормы качества субстанции VMA-10-13 и оформлен проект НД.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ ТВЕРДОЙ ДОЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ VMA-10-13 – ТАБЛЕТОК «ХИНАЗОТРОП»

В результате фармакологических исследований, проведенных в НИИ фармакологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, было установлено, что оптимальная дозировка VMA-10-13 в пероральной лекарственной форме составляет 25 мг на один прием.

В лаборатории твердых лекарственных форм кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ под руководством профессора А.М.Шевченко была разработана твердая дозированная лекарственная форма – условное название таблетки «Хиназотроп». Состав таблеток «Хиназотроп» (на одну таблетку) приведен в таблице 33.

Таблица 33 – Состав таблеток «Хиназотроп»

Наименование ингредиентов	Количество, мг
<i>Активное вещество:</i>	
VMA-10-13 3-[2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил] - хинозолин-4(3H)-он	25
<i>Вспомогательные вещества:</i>	
Полиэтиленгликоль – ПЭГ-6000	50
Кальция гидрофосфата дигидрат	120
Полипластолон XL-10	5

Перед нами стояла задача разработать методики анализа таблеток «Хиназотроп» и провести их стандартизацию в соответствии с установленными требованиями [29, 37, 63].

Для разработки методик анализа и составления проекта НД на таблетки «Хиназотроп» были изготовлены 5 серий таблеток: 10-13-001, 10-13-002, 10-13-003, 10-13-004, 10-13-005.

4.1. Определение основных фармацевтико-технологических показателей качества таблеток «Хиназотроп»

Исследуемая форма образцов таблеток «Хиназотроп» соответствовала требованиям ОФС.1.4.1.0015.15 [29] – таблетки розоватого цвета, двояковыпуклые с риской.

Определение однородности массы таблеток «Хиназотроп» проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0009.15 [29].

Таблица 34 – Результаты определения однородности массы таблеток

Номер серии	Средняя масса, г	Отклонение от средней массы, %
10-13-001	0,1997	+4,36; -3,45
10-13-002	0,2001	+3,31; -3,14
10-13-003	0,2000	+3,76; -3,46
10-13-004	0,1999	+2,89; -3,78
10-13-005	0,1998	+3,68; -2,67

Как следует из таблицы 34, средняя масса исследуемых образцов таблеток составила от 0,1997 г до 0,2001 г, отклонения от средней массы не превышали установленную норму $\pm 7,5\%$.

Определение распадаемости проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0013.15[29].

Таблица 35 – Результаты определения распадаемости таблеток

Серия	Результат, минут
10-13-001	6; 7; 6; 5; 7; 6
10-13-002	5; 6; 7; 5; 6; 6
10-13-003	6; 7; 6; 7; 7; 7
10-13-004	5; 5; 7; 6; 5; 6
10-13-005	6; 7; 6; 7; 7; 6

Полученные данные (таблица 35) показывают, что время распадаемости таблеток «Хиназотроп», не превышало 7 минут, что

соответствует установленным требованиям для таблеток без оболочки [29] - должны распадаться в течение не более 15 минут.

4.2. Разработка методик определения подлинности таблеток «Хиназотроп»

Для определения подлинности таблеток «Хиназотроп» мы использовали методы УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

4.2.1. Метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой области

Идентификацию VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп» проводили методом УФ-спектрофотометрии по совпадению максимумов поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца VMA-10-13. Для выбора условий определения подлинности с помощью УФ-спектрофотометрии, мы использовали данные, полученные при исследовании субстанции VMA-10-13 этим методом (раздел 1.3.3.2.). Извлечение веществ из порошка растертых таблеток проводили спиртом 96%, рабочая концентрация - 0,01 мг/мл.

С целью оценки влияния вспомогательных веществ (плацебо), входящих в состав таблеток, на поглощение VMA-10-13 были измерены УФ-спектры модельной смеси таблеток в области 210 - 350 нм.

Для приготовления модельной смеси 0,05 г (точная навеска) СО VMA-10-13 и 0,35 г плацебо вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта 96%, помещали на ультразвуковую баню на 15 мин, доводили объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивали и фильтровали через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. Далее 1,0 мл полученного фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем раствора до метки спиртом 96% и перемешивали.

УФ-спектр поглощения раствора модельной смеси таблеток «Хиназотроп», представлен на рисунке 22.

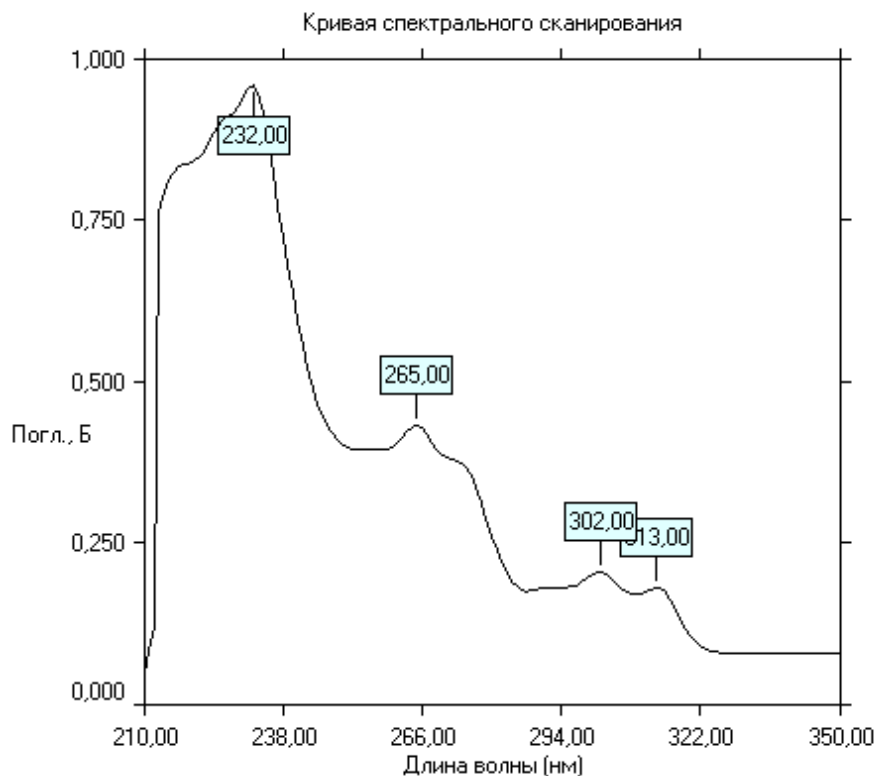


Рисунок 22– Спектр поглощения раствора модельной смеси таблеток

Как было установлено ранее (раздел 1.3.3.2.), спектр поглощения VMA-10-13 в спирте 96% имеет четыре полосы поглощения с максимумами при 226, 265, 302 и 313 нм. Как следует из рисунка 22, собственное поглощение вспомогательных веществ таблеток оказывает влияние на местоположение коротковолнового максимума при 226 нм, сдвигая его в область 232 нм. В связи с этим, максимум поглощения при 226 нм не может быть использован для идентификации VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп».

В то же время, аналитический сигнал плацебо не оказывает влияния на местоположении максимумов поглощения при 265, 302 и 313 нм. Таким образом, метод УФ-спектрофотометрии можно использовать для идентификации таблеток «Хиназотроп» по максимумам поглощения при 265, 302 и 313 нм.

УФ-спектры извлечений из 5 серийных образцов таблеток «Хиназотроп» в области длин волн 240-350 нм имели три максимума поглощения при 265, 302 и 313 нм, которые совпадали с положением

максимумов УФ-спектров раствора СО. Отклонения положения максимумов при анализе различных образцов таблеток в разное время не превышали ± 1 нм.

4.2.2. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

Совместно с УФ-спектрофотометрией для идентификации VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп» мы использовали метод ВЭЖХ [17, 69, 75].

Идентификацию VMA-10-13 методом ВЭЖХ проводили по совпадению времен удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемого образца и стандартного образца одновременно с количественным определением (раздел 4.5.2). На рисунках 23 и 24 представлены хроматограммы испытуемого раствора таблеток и раствора стандартного образца VMA-10-13.

Время удерживания основных пиков на хроматограммах испытуемого раствора в 5 лабораторных сериях таблеток «Хиназотроп» соответствовало пику VMA-10-13 на хроматограмме раствора стандартного образца ($18,5 \pm 0,05$ мин).

Отклонения во времени удерживания при анализе различных образцов таблеток в разное время не превышали $\pm 1\%$.

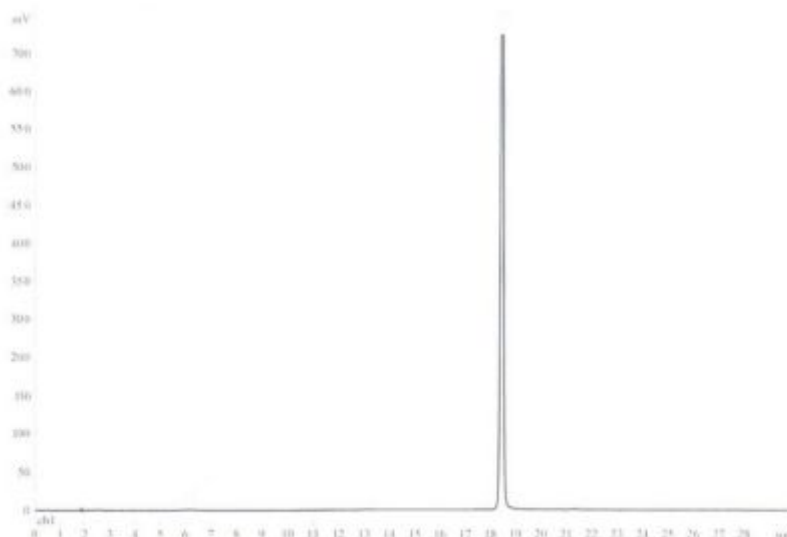


Рисунок 23 – Хроматограмма испытуемого раствора таблеток «Хиназотроп»

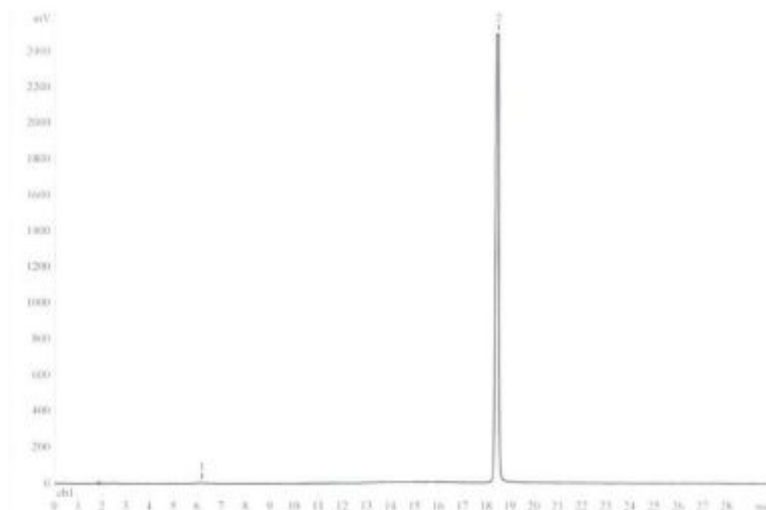


Рисунок 24 – Хроматограмма раствора стандартного образца VMA-10-13

4.3. Определение родственных примесей

Для определения родственных примесей в таблетках «Хиназотроп» использовали метод ВЭЖХ при условиях, выбранных для субстанции VMA-10-13 (раздел 3.4.2.) [69, 75, 121].

Для установления влияния вспомогательных веществ (плацебо) на результаты определений готовили извлечения из плацебо: около 0,35 г (точная навеска) плацебо (эквивалентно содержанию в таблетке) помещали в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл спирта 96%, помещали на ультразвуковую баню на 15 мин, доводили объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивали и фильтровали через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. Приготовленный раствор центрифугировали в течение 3 минут при скорости 8000 об/мин и хроматографировали, получая не менее трех хроматограмм.

На полученных хроматограммах извлечений из плацебо не было каких-либо пиков, помимо пика растворителя (рисунок 25).



Рисунок 25 – Хроматограмма раствора плацебо таблеток

По разработанной методике (приложение 3) был проведен анализ 5 лабораторных серий таблеток «Хиназотроп».

Содержание примеси незамещенного хиназолин-4(3Н)-она X (%) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_o \cdot 250 \cdot 1 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{S_o \cdot a \cdot 100 \cdot 50 \cdot 50 \cdot b} = \frac{S \cdot a_o \cdot P}{S_o \cdot a \cdot 10 \cdot b}$$

S - площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

S_o - площадь пика на хроматограмме раствора стандартного образца примеси незамещенного хиназолин-4(3Н)-она;

a - масса навески порошка растертых таблеток, г;

a_o - масса навески стандартного образца примеси незамещенного хиназолин-4(3Н)-она, г;

b - содержание VMA-10-13 в одной таблетке, мг;

P - средняя масса одной таблетки, мг.

Содержание примеси незамещенного хиназолин-4(3Н)-она во всех серийных образцах таблеток не превышало 0,1%.

4.4. Разработка методик количественного определения VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп»

Для количественного определения VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп» мы также использовали методы УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ.

4.4.1. Метод производной спектрофотометрии

При использовании метода УФ-спектрофотометрии для анализа лекарственных форм следует учитывать возможность поглощения электромагнитного излучения вспомогательными веществами (плацебо), что может влиять на результаты определений.

С целью оценки влияния плацебо анализируемых таблеток на поглощение VMA-10-13 мы измерили их УФ-спектры в области 210 - 280 нм. На рисунке 26 представлены спектры поглощения раствора стандартного образца VMA-10-13 (0,01 мг/мл) и соответствующего раствора плацебо.

Спектр поглощения VMA-10-13 в области от 210 до 280 нм имеет две полосы поглощения с максимумами при 226 и 265 нм. Более подходящей для количественного определения VMA-10-13, на наш взгляд, является вторая полоса поглощения, так как находится в сравнительно селективной области спектра и является более пологой по сравнению с полосой при 226 нм [1]. В то же время при данной длине волны на результаты измерений значительное влияние оказывает аналитический сигнал плацебо, что приводит к систематической погрешности при количественном определении VMA-10-13 в таблетках.

В литературе описан метод производной спектрофотометрии [15, 90, 94, 97, 100, 103, 131, 137], который позволяет проводить определение основного действующего вещества в присутствии светопоглощающих примесей. В основе производной спектрофотометрии лежит изменение формы спектральной кривой при её дифференцировании по длине волны. При этом второе дифференцирование позволяет устранить влияние линейного фона. Обработку спектров поглощения растворов VMA-10-13 и

плацебо для построения их вторых производных ($d^2A/d\lambda^2$) проводили при помощи программного обеспечения спектрофотометра «UV Win 5». Так как зависимость поглощения раствора плацебо от длины волны в районе 265 нм имеет линейный характер (рисунок 26), её вторая производная при данной длине волны равна нулю (рисунок 27).

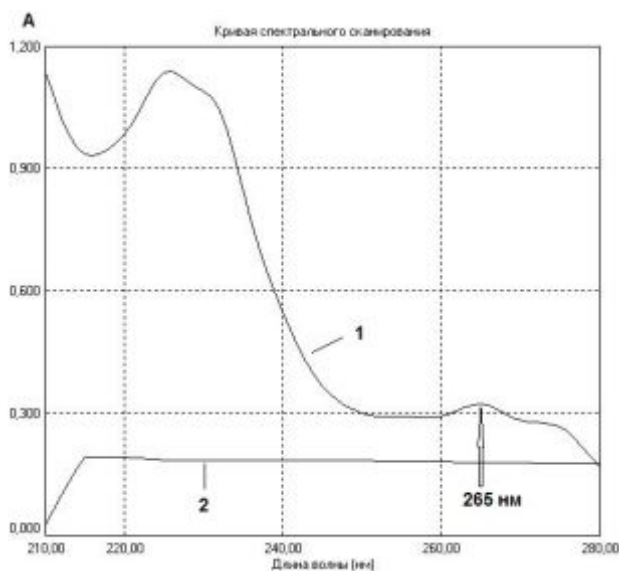


Рисунок 26–УФ-спектры поглощения растворов VMA-10-13 (1) и плацебо (2)

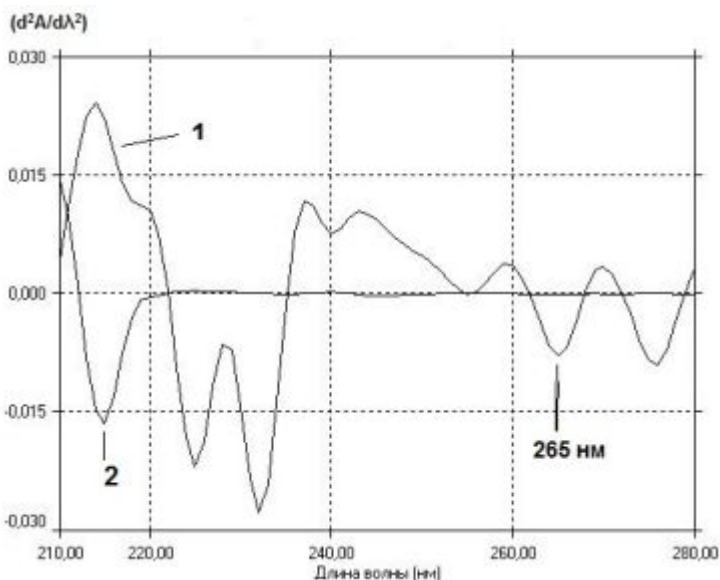


Рисунок 27–Вторые производные УФ-спектров VMA-10-13 (1) и плацебо (2)

Далее нами была изучена линейность зависимости между величиной второй производной спектра поглощения модельных смесей таблеточной массы (при длине волны 265 нм) и концентрацией VMA-10-13 в области концентраций 0,005 – 0,04 мг/мл (таблица 36, рисунок 28).

Таблица 36 – Результаты определения линейной зависимости второй производной УФ-спектра поглощения от концентрации VMA-10-13

Концентрация, мг/мл (x_i)	$(d^2A/d\lambda^2) \cdot 10^2$ (y_i)	Параметры линейной зависимости $y = bx + a$
0,00551	-0,463	$b = -76,55$ $s_b = 1,50$ $\Delta b = 3,85$ $a = -0,030$ $s_a = 0,037$ $\Delta a = 0,095$ $r = 0,99904$
0,01102	-0,845	
0,01653	-1,278	
0,02204	-1,750	
0,02755	-2,133	
0,03306	-2,625	
0,03857	-2,928	
Критерии приемлемости параметров линейной зависимости [63]		
Требования для ГЛФ ($B = \pm 5\%$)	Полученные значения	Вывод
$ a \leq \Delta a = t(95\%, n-2) \cdot s_a$	0,030 < 0,095	Выполняется
$r \geq 0,9981$	0,99904 > 0,9981	Выполняется

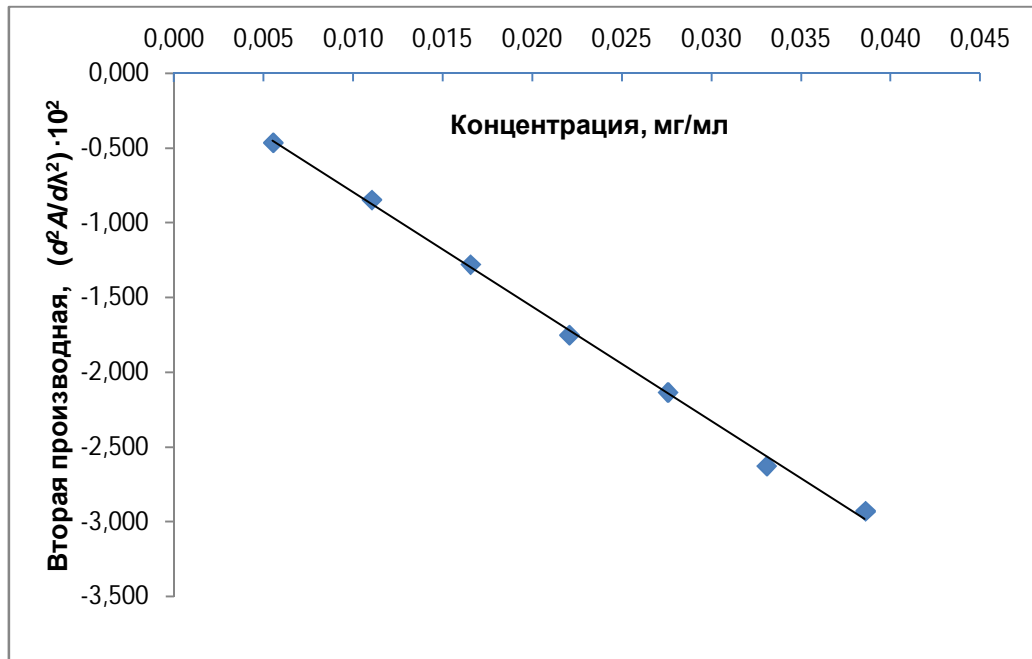


Рисунок 28 – График зависимости второй производной УФ-спектра поглощения от концентрации VMA-10-13

Выполнение неравенства: свободный член уравнения линейной зависимости (а) меньше или равен его доверительному интервалу ($a \leq \Delta a = t(95\%; 5) \cdot s_a$) доказывает отсутствие систематической погрешности методики. Коэффициент корреляции ($r \geq 0,9981$) является показателем жесткости линейной связи между величинами x и y .

Прецизионность (сходимость) и правильность методики оценивали одновременно по девяти точкам на трех уровнях в пределах 80-120% от содержания VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп» [28, 62]. Модельные смеси VMA-10-13 и плацебо были приготовлены в соотношении их содержания в таблеточной массе.

Для приготовления модельных смесей: от 0,04 до 0,06 г (точные навески) СО VMA-10-13 помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл, затем в те же колбы прибавляли 0,35 г плацебо и 50 мл спирта 96%, помещали на ультразвуковую баню на 15 мин, доводили объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивали и фильтровали через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. Далее 1 мл полученного фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем раствора до метки спиртом 96% и перемешивали.

Параллельно готовили раствор стандартного образца (0,01 мг/мл): 0,05 г (точная навеска) СО VMA-10-13 разводили по той же схеме разведения спиртом 96%.

Измеряли спектры поглощения испытуемого и стандартного растворов на регистрирующем спектрофотометре в диапазоне 250 - 280 нм и получали их вторые производные ($A'' = (d^2A/d\lambda^2) \cdot 10^2$) при 265 нм с помощью программного обеспечения спектрофотометра «UV Win 5».

Массу (г) VMA-10-13 в испытуемых растворах (X) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A'' \cdot a_o}{A''_o}$$

A'' – вторая производная спектра испытуемого раствора;

A''_o – вторая производная спектра раствора стандартного образца;

a_o - масса навески стандартного образца.

Результаты определений приведены в таблице 37.

Таблица 37 – Результаты количественного определения VMA-10-13 в модельных смесях таблеток «Хиназотроп» методом производной спектрофотометрии

№	Взято, г	A''_i	Найдено, г	Найдено, %	Метрологические характеристики
1	0,0397	-0,619	0,0396	99,73	$\bar{X} = 100,23$ $S = 0,48$ $S_{\bar{X}} = 0,16$ $\Delta X = 1,11$ $\Delta \bar{X} = 0,37$ $\varepsilon = 1,11\%$ $\bar{\varepsilon} = 0,37\%$ $\delta = \bar{X} - 100 = 0,23$
2	0,0394	-0,623	0,0398	101,13	
3	0,0381	-0,595	0,0381	99,88	
4	0,0497	-0,781	0,0500	100,51	
5	0,0494	-0,771	0,0493	99,82	
6	0,0501	-0,783	0,0501	99,96	
7	0,0599	-0,937	0,0599	100,05	
8	0,0606	-0,955	0,0611	100,79	
9	0,0593	-0,929	0,0594	100,20	
$a_o = 0,0504$; $A''_o = -0,788$					
Критерии правильности [62]					
Допуск содержания, В%	Максимально допустимая неопределенность анализа ($\max \Delta_{As}$), %	Критерий статистической незначимости $\delta < (\Delta X / \sqrt{9})$	Критерий практической незначимости $\delta < (0,32 \cdot \max \Delta_{As})$	Вывод	
± 5	1,6	$0,23 < 0,37$	$0,23 < 0,51$	Соответствует	
Критерий прецизионности (сходимости) [62]					
Допуск содержания, В%	Максимально допустимая неопределенность анализа ($\max \Delta_{As}$), %	Требования критерия $\Delta X \leq \max \Delta_{As}$		Вывод	
± 5	1,6	$1,11 < 1,6$		Соответствует	

Как следует из данных таблицы 37, спектрофотометрическая методика количественного определения VMA-10-13 в таблетках с допуском содержания основного вещества (В) $\pm 5\%$ ($\max \Delta A_s = 1,6\%$) не имеет статистически значимой систематической погрешности, характеризуется достаточной прецизионностью (сходимостью) и является корректной.

Далее нами было проведено определение внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности валидируемой методики [28, 76]. Определение проводили в течение двух дней по ряду последовательных измерений испытуемых растворов.

Проверку соответствия полученного ряда экспериментальных данных нормальному закону распределения при уровне значимости $\alpha = 0,05$ проводили с помощью критерия согласия Пирсона χ^2 (хи-квадрат) [43, 48]. Так как рассчитанное нами значение критерия $\chi^2_{\text{набл.}} = 4,41$ меньше критического значения $\chi^2_{\text{кр.}} = 5,99$, была принята гипотеза о подчинении выборки нормальному закону распределения.

Результаты определения внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения VMA-10-13 в модельных смесях таблеток приведены в таблице 38. Как следует из данных таблицы 38 расчетное значения критерия F-Фишера 1,32 меньше его табличной величины 5,05, поэтому дисперсии результатов двух анализов статистически эквивалентны. Так как расчетное значение t-критерий Стьюдента 0,58 меньше табличного 2,23, различие средних результатов двух анализов статистически незначимо. Все это является достаточным основанием для вывода о внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики.

Также при разработке методики нами были исследованы факторы, которые влияют на результаты анализа, то есть была проведена оценка робастности методики. При изучении стабильности растворов во времени определено, что оптическая плотность растворов остается стабильной в течение 24 часов.

Таблица 38 – Результаты определения внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения VMA-10-13 в модельных смесях таблеток «Хиназотроп» методом производной спектрофотометрии

№	1-й день			2-й день		
	$a_o = 0,0497\Gamma$		$A''_o = -0,779$	$a_o = 0,0501\Gamma$		$A''_o = -0,785$
	Взято, г	A''_i	Найдено, %	Взято, г	A''_i	Найдено, %
1	0,0516	-0,811	100,27	0,0483	-0,753	99,50
2	0,0481	-0,753	99,88	0,0507	-0,797	100,33
3	0,0519	-0,814	100,06	0,0528	-0,831	100,45
4	0,0503	-0,791	100,33	0,0517	-0,811	100,11
5	0,0489	-0,767	100,07	0,0495	-0,775	99,92
6	0,0488	-0,759	99,23	0,0469	-0,737	100,29
Метрологические характеристики						
\bar{X}	99,97			100,10		
S	0,399			0,347		
S^2	0,159			0,120		
$\Delta\bar{X}$	0,42			0,36		
Δ_{\max}	0,91					
F-критерий Фишера	1,32					
t-критерий Стьюдента	0,58					

С помощью разработанной методики (приложение 3) нами было проведено количественное определение 5 лабораторных серий таблеток «Хиназотроп» (таблица 39).

Таким образом, была экспериментально подтверждена возможность использования метода производной спектрофотометрии для количественного определения содержания действующего вещества в таблетках «Хиназотроп».

Таблица 39 – Результаты количественного определения ВМА-10-13 в таблетках «Хиназотроп» методом производной спектрофотометрии

Серия	Навеска, г	A''_i	Найдено, мг/таблетку	Метрологические характеристики (P = 95%; f = 6)
10-13-001	0,4073	-0,803	25,18	$\bar{X} = 24,92$ $S = 0,24$ $S_{\bar{X}} = 0,09$ $\Delta\bar{X} = 0,23$ $\bar{\varepsilon} = 0,91\%$ $\varepsilon = 2,40\%$
	0,3968	-0,771	24,82	
	0,3851	-0,744	24,68	
	0,4028	-0,795	25,21	
	0,4017	-0,791	25,15	
	0,3862	-0,748	24,74	
	0,4143	-0,801	24,69	
10-13-002	0,4018	-0,797	25,39	$\bar{X} = 25,10$ $S = 0,18$ $S_{\bar{X}} = 0,07$ $\Delta\bar{X} = 0,17$ $\bar{\varepsilon} = 0,68\%$ $\varepsilon = 1,79\%$
	0,4174	-0,819	25,11	
	0,3962	-0,775	25,03	
	0,3951	-0,781	25,30	
	0,4093	-0,796	24,89	
	0,3854	-0,755	25,07	
	0,4026	-0,784	24,92	
10-13-003	0,3964	-0,775	25,11	$\bar{X} = 25,09$ $S = 0,20$ $S_{\bar{X}} = 0,07$ $\Delta\bar{X} = 0,18$ $\bar{\varepsilon} = 0,73\%$ $\varepsilon = 1,93\%$
	0,3914	-0,757	24,84	
	0,4083	-0,803	25,26	
	0,4123	-0,812	25,29	
	0,4079	-0,793	24,97	
	0,3932	-0,761	24,86	
	0,4071	-0,801	25,27	
10-13-004	0,4148	-0,811	24,80	$\bar{X} = 24,87$ $S = 0,17$ $S_{\bar{X}} = 0,06$ $\Delta\bar{X} = 0,15$ $\bar{\varepsilon} = 0,62\%$ $\varepsilon = 1,64\%$
	0,4074	-0,795	24,75	
	0,3918	-0,774	25,06	
	0,3903	-0,766	24,89	
	0,4006	-0,778	24,63	
	0,4052	-0,795	24,88	
	0,3996	-0,791	25,11	
10-13-005	0,4106	-0,795	24,93	$\bar{X} = 25,14$ $S = 0,18$ $S_{\bar{X}} = 0,07$ $\Delta\bar{X} = 0,17$ $\bar{\varepsilon} = 0,66\%$ $\varepsilon = 1,75\%$
	0,3978	-0,784	25,37	
	0,4003	-0,781	25,12	
	0,3963	-0,775	25,18	
	0,4138	-0,812	25,26	
	0,3942	-0,762	24,89	
	0,4084	-0,801	25,25	

4.4.2. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

Также для количественного анализа таблеток «Хиназотроп» был использован метод ВЭЖХ с градиентом растворителя [58, 69, 75]. Была выбрана та же неподвижная фаза и условия проведения, как при определении родственных примесей в субстанции VMA-10-13 (раздел 3.4.2).

В результате валидации методики была подтверждена пригодность хроматографической системы для выполнения испытаний. Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику действующего вещества VMA-10-13, составляла не менее 385225 теоретических тарелок (критерий приемлемости не менее 1500); коэффициент асимметрии для пика VMA-10-13 находился в пределах 1,25 (критерий приемлемости не более 1,5), время удерживания действующего вещества 18,50 мин и относительное стандартное отклонение площади пика VMA-10-13, рассчитанное по шести последовательным хроматограммам раствора СО, не превышало 2,0%.

Также было установлено, что вспомогательные вещества таблеток «Хиназотроп» не оказывают влияния на результаты исследования – при анализе раствора плацебо на хроматограмме не наблюдались пики посторонних веществ (рисунки 29 и 30).



Рисунок 29 – Хроматограмма раствора плацебо таблеток «Хиназотроп»

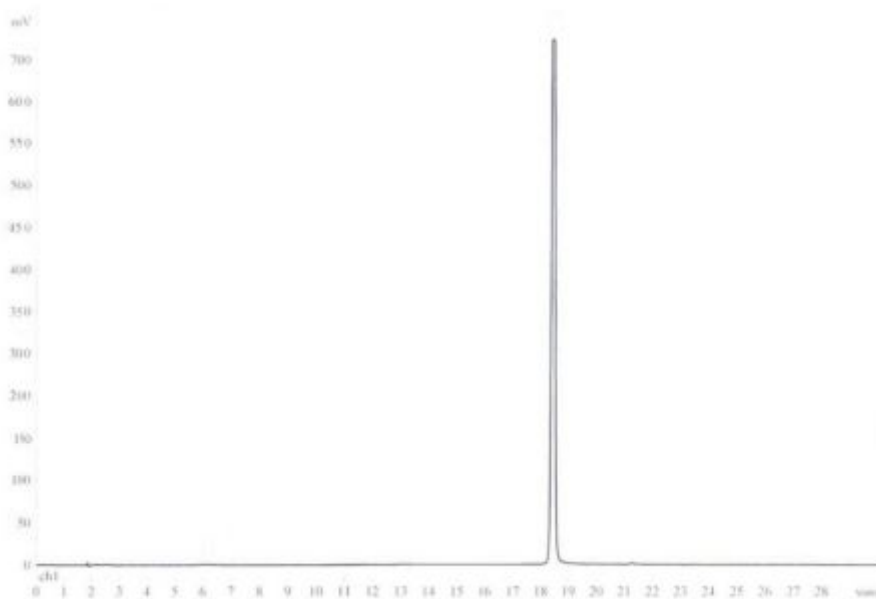


Рисунок 30 –Хроматограмма раствора модельной смеси таблеток «Хиназотроп»

Линейность методики определяли путем измерения площадей пиков VMA-10-13 на хроматограммах, полученных при хроматографировании серий растворов СО VMA-10-13, с концентрациями, охватывающими всю область действия методики.

Для проведения испытания готовили растворы стандартного образца VMA-10-13. Выбранный диапазон включал планируемую концентрацию VMA-10-13 в растворе содержимого таблеток «Хиназотроп». Приготовление растворов осуществляли следующим образом: точную навеску СО VMA-10-13, массой около 0,05 г помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в достаточном объеме спирта 96%, доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали. Последовательно разводили полученный раствор, получая растворы с концентрациями 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 мг/мл.

Каждый полученный раствор подвергали анализу не менее 3-х раз, согласно разработанных ранее условий, проводили расчет средних значений площадей пиков, по полученным результатам строили график зависимости аналитического сигнала (площади пика) от концентрации вещества в растворе (таблица 40, рисунок 31).

Таблица 40 – Результаты определения линейной зависимости площади пика от концентрации растворов VMA-10-13

Концентрация, мг/мл (x_i)	Площадь пика, $mV \cdot \text{сек}$ (y_i)	Параметры линейной зависимости $y = b \cdot x + a$
0,0253	2632,3	$b = 11,4 \cdot 10^4$ $s_b = 0,16 \cdot 10^4$ $\Delta b = 0,42 \cdot 10^4$ $a = 108$ $s_a = 235$ $\Delta a = 604$ $r = 0,9995$
0,0506	6134,7	
0,0759	8707,0	
0,1012	11949,3	
0,1518	17154,0	
0,2024	23528,7	
0,2530	28693,3	
Критерии приемлемости параметров линейной зависимости [62]		
Критерий	Полученные значения	Вывод
$ a \leq \Delta a = t(95\%, n-2) \cdot s_a$	108 < 604	Выполняется
$r \geq 0,9981$	0,9995 > 0,9981	Выполняется

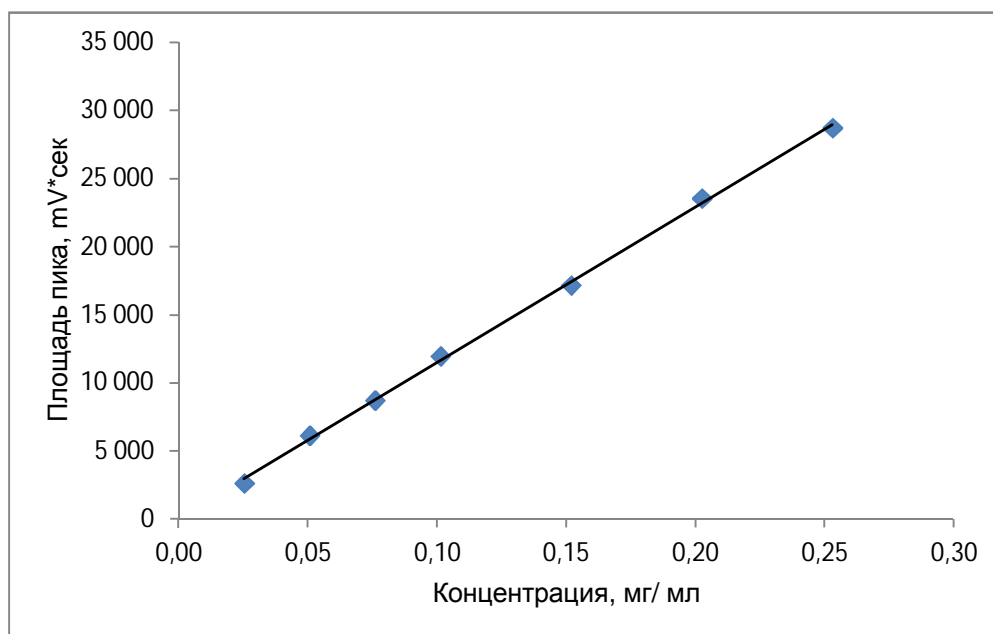


Рисунок 31–График зависимости площади пика от концентрации VMA-10-13

Результаты определения линейности методики соответствуют критериям приемлемости, что подтверждает пригодность данной методики для количественного определения VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп».

Прецизионность (сходимость) и правильность методики оценивали одновременно по девяти точкам на трех уровнях в пределах 80-120% от содержания VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп». Модельные смеси VMA-10-13 и плацебо были приготовлены в соотношении их содержания в таблеточной массе.

Для приготовления растворов модельных смесей от 0,04 до 0,06 г (точная навеска) стандартного образца VMA-10-13 помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл, затем в те же колбы прибавляли 0,35 г (точная навеска) плацебо и 50 мл спирта 96%, помещали на ультразвуковую баню на 15 мин, доводили объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивали и фильтровали через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. Далее 1 мл полученного фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора до метки спиртом 96% и перемешивали. Затем полученный раствор центрифугировали в течение 3 минут при скорости 8000 об/мин.

Параллельно готовили раствор стандартного образца (0,05 мг/мл): 0,05 г (точная навеска) СО VMA-10-13 разводили по той же схеме разведения спиртом 96%.

Полученные растворы хроматографировали и определяли площади пика VMA-10-13 в испытуемом и стандартном растворах.

Массу (г) VMA-10-13 в испытуемых растворах (X) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_o}{S_o}$$

S - площадь пика VMA-10-13 в испытуемом растворе;

S_o - площадь пика VMA-10-13 в растворе стандартного образца;

a_o - масса навески стандартного образца, г.

Результаты определений приведены в таблице 41.

Как следует из данных таблицы 41, методика количественного определения VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп» с допуском содержания

основного вещества (В) $\pm 5\%$ ($\max \Delta A_s = 1,6\%$) не имеет статистически значимой систематической погрешности, характеризуется достаточной прецизионностью и является корректной.

Таблица 41 – Результаты количественного определения VMA-10-13 в модельных смесях таблеток «Хиназотроп» методом ВЭЖХ

№	Взято, г	S_i	Найдено, г	Найдено, %	Метрологические характеристики
1	0,0385	4691,3	0,0386	100,37	$\bar{X} = 99,86$ $S = 0,59$ $S_{\bar{X}} = 0,20$ $\Delta X = 1,36$ $\Delta \bar{X} = 0,45$ $\varepsilon = 1,36\%$ $\bar{\varepsilon} = 0,45\%$ $\delta = \bar{X} - 100 = 0,14$
2	0,0409	4945,7	0,0407	99,61	
3	0,0421	5145,4	0,0424	100,67	
4	0,0483	5814,2	0,0479	99,16	
5	0,0497	6045,2	0,0498	100,19	
6	0,0523	6304,8	0,0519	99,30	
7	0,0584	7128,5	0,0587	100,55	
8	0,0603	7274,9	0,0599	99,38	
9	0,0617	7451,6	0,0614	99,48	
$a_o = 0,0496$; $S_o = 6021,5$					
Критерии правильности [62]					
Допуск содержания, %	$\max \Delta_{A_s}$, %	$\delta < (\Delta X / \sqrt{9})$	$\delta < (0,32 \cdot \max \Delta_{A_s})$	Вывод	
± 5	1,6	$0,14 < 0,45$	$0,14 < 0,51$	Соответствует	
Критерий прецизионности (сходимости) [62]					
Допуск содержания, %	$\max \Delta_{A_s}$, %	$\Delta X \leq \max \Delta_{A_s}$		Вывод	
± 5	1,6	1,36 < 1,6		Соответствует	

Внутрилабораторную (промежуточную) прецизионность валидируемой методики определяли в течение двух дней (таблица 42). Так как рассчитанное нами значение критерия $\chi^2_{\text{набл.}} = 3,11$, меньше критического значения $\chi^2_{\text{кр.}} = 5,99$, была принята гипотеза о подчинении выборки нормальному закону распределения.

Как следует из данных таблицы 42, расчетное значения критерия F-Фишера 1,21 меньше его табличной величины 5,05, поэтому дисперсии

результатов двух анализов статистически эквивалентны. Так как расчетное значение t-критерия Стьюдента 0,94 меньше табличного 2,23, различие средних результатов двух анализов статистической незначимо. Все это является достаточным основанием для вывода о внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики [76].

Таблица 42 – Результаты определения внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения VMA-10-13 в модельных смесях таблеток «Хиназотроп» методом ВЭЖХ

№	1-й день			2-й день		
	$a_o = 0,0511 \text{ г}$		$S_o = 6209,1$	$a_o = 0,0503 \text{ г}$		$S_o = 6115,3$
	Взято, г	S_i	Найдено, %	Взято, г	S_i	Найдено, %
1	0,0489	5905,7	99,39	0,0517	6312,3	100,43
2	0,0497	6015,4	99,61	0,0496	6024,5	99,91
3	0,0487	5923,6	100,10	0,0521	6378,5	100,70
4	0,0514	6279,1	100,54	0,0491	5925,2	99,26
5	0,0499	6114,8	100,85	0,0485	5874,8	99,63
6	0,0508	6204,3	100,51	0,0504	6073,7	99,12
Метрологические характеристики						
\bar{X}	100,17			99,84		
S	0,572			0,630		
S^2	0,327			0,397		
$\Delta\bar{X}$	0,60			0,66		
Δ_{\max}	1,59					
F-критерий Фишера	1,21					
t-критерий Стьюдента	0,94					

С помощью разработанной методики (приложение 3) нами было проведено количественное определение 5 лабораторных серий таблеток «Хиназотроп». Полученные результаты представлены в таблице 43.

Таблица 43 – Результаты количественного определения ВМА-10-13 в лабораторных сериях таблеток «Хиназотроп» методом ВЭЖХ

Серия	Навеска, г	S_i	Найдено, мг/таблетку	Метрологические характеристики (P = 95%; f = 6)
10-13-001	0,2004	6021,8	24,71	$\bar{X} = 24,97$ $S = 0,21$ $S_{\bar{X}} = 0,08$ $\Delta\bar{X} = 0,19$ $\bar{\varepsilon} = 0,77\%$ $\varepsilon = 2,03\%$
	0,1987	6105,3	25,27	
	0,1923	5834,1	24,95	
	0,2016	6134,1	25,03	
	0,2003	6029,2	24,76	
	0,1991	6097,8	25,19	
	0,2095	6342,7	24,90	
10-13-002	0,2023	6192,6	25,23	$\bar{X} = 25,03$ $S = 0,19$ $S_{\bar{X}} = 0,07$ $\Delta\bar{X} = 0,18$ $\bar{\varepsilon} = 0,72\%$ $\varepsilon = 1,91\%$
	0,2069	6254,3	24,91	
	0,1967	5917,8	24,79	
	0,2007	6034,9	24,78	
	0,1954	5974,9	25,20	
	0,1963	5992,5	25,16	
	0,2064	6296,2	25,14	
10-13-003	0,2126	6504,7	25,20	$\bar{X} = 25,02$ $S = 0,23$ $S_{\bar{X}} = 0,09$ $\Delta\bar{X} = 0,21$ $\bar{\varepsilon} = 0,86\%$ $\varepsilon = 2,26\%$
	0,2009	6085,8	24,95	
	0,1964	5923,5	24,84	
	0,1959	6023,8	25,33	
	0,2017	6071,8	24,80	
	0,2061	6196,2	24,76	
	0,1998	6118,4	25,22	
10-13-004	0,1985	6105,8	25,32	$\bar{X} = 25,04$ $S = 0,26$ $S_{\bar{X}} = 0,10$ $\Delta\bar{X} = 0,24$ $\bar{\varepsilon} = 0,97\%$ $\varepsilon = 2,58\%$
	0,2034	6205,3	25,12	
	0,1967	5927,8	24,81	
	0,2026	6123,7	24,88	
	0,1978	5971,8	24,86	
	0,1993	6005,8	24,81	
	0,2032	6281,2	25,45	
10-13-005	0,2031	6115,3	24,78	$\bar{X} = 25,02$ $S = 0,21$ $S_{\bar{X}} = 0,08$ $\Delta\bar{X} = 0,20$ $\bar{\varepsilon} = 0,79\%$ $\varepsilon = 2,09\%$
	0,2083	6284,3	24,83	
	0,1994	6104,2	25,19	
	0,1981	6021,6	25,01	
	0,2083	6317,4	24,96	
	0,1956	5937,2	24,98	
	0,1976	6098,4	25,40	

Таким образом, была экспериментально подтверждена возможность использования метода ВЭЖХ для количественного определения содержания действующего вещества в таблетках «Хиназотроп».

В проект НД методики спектрофотометрического и хроматографического (ВЭЖХ) анализа были включены, как альтернативные.

4.5. Определение однородности дозирования таблеток «Хиназотроп»

Целью испытания на «Однородность дозирования» является контроль равномерности распределения действующего вещества в дозированной лекарственной форме ОФС 1.4.2.0008.18 [29].

Так как содержание действующего вещества в таблетках «Хиназотроп» составляет 25 мг, следует учитывать возможность неравномерного его смешивания со вспомогательными веществами при получении таблеток со средней массой 200 мг. Это может привести к значительному отклонению количества действующего вещества в отдельных дозах таблеток и, следовательно, изменению терапевтического эффекта.

В качестве метода определения «Однородности дозирования» таблеток «Хиназотроп» был выбран метод производной спектрофотометрии, разработанный нами для количественного определения VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп». Определение было проведено в тех же условиях, что и количественное определение при длине волны 265 нм (методика в приложении 3).

Спектры поглощения испытуемого и стандартного растворов измеряли на регистрирующем спектрофотометре в диапазоне 250 – 280 нм и рассчитывали их вторые производные ($A'' = (d^2A/d\lambda^2) \cdot 10^2$) при 265 нм при помощи программного обеспечения спектрофотометра «UV Win 5».

Содержание VMA-10-13 в одной таблетке (X) в миллиграммах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A'' \cdot a_o}{A''_o \cdot 2}$$

A'' – вторая производная испытуемого раствора при 265 нм;

A''_o – вторая производная раствора стандартного образца при 265 нм;

a_o - масса навески стандартного образца, г.

Результаты определений представлены в таблице 44.

Таблица 44 – Результаты определения однородности дозирования лабораторных серий таблеток «Хиназотроп»

Серия - 001		Серия - 002		Серия - 003		Серия - 004		Серия - 005	
Найдено		Найдено		Найдено		Найдено		Найдено	
мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%
25,3	101,2	24,7	98,8	24,6	98,4	25,7	102,8	25,3	101,2
24,0	96,0	25,9	103,6	25,4	101,6	25,3	101,2	25,7	102,8
25,5	102,0	25,9	103,6	25,3	101,2	24,1	96,4	24,7	98,8
26,1	104,4	24,0	96,0	24,1	96,4	24,8	99,2	24,3	97,2
24,3	97,2	25,3	101,2	25,5	102,0	25,3	101,2	25,4	101,6
24,9	99,6	26,1	104,4	24,7	98,8	24,6	98,4	25,3	101,2
24,3	97,2	24,3	97,2	24,2	96,8	24,3	97,2	25,8	103,2
25,6	102,4	24,7	98,8	25,4	101,6	25,8	103,2	24,6	98,4
25,1	100,4	25,8	103,2	26,2	104,8	24,6	98,4	25,4	101,6
24,2	96,8	24,4	97,6	25,3	101,2	24,2	96,8	24,8	99,2
$\bar{X} = 99,7$		$\bar{X} = 100,4$		$\bar{X} = 100,3$		$\bar{X} = 99,5$		$\bar{X} = 100,5$	
S = 2,8		S = 3,1		S = 2,6		S = 2,5		S = 2,0	
AV = 6,8		AV = 7,5		AV = 6,3		AV = 5,9		AV = 4,8	

Как следует из полученных результатов, рассчитанная величина первого показателя приемлемости (AV) во всех образцах таблеток не превышает максимально допустимого значения (L1=15%), что соответствует требованиям ОФС1.4.2.0008.18 [29].

4.6. Разработка методики определения показателя «Растворение»

Определение показателя «Растворение» таблеток «Хиназотроп» проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0014.15 [29] на приборе «Вращающаяся корзинка», среда растворения - 500 мл воды очищенной, температура среды растворения – $37 \pm 0,5$ °С, скорость вращения мешалки – 100 об/мин $\pm 4\%$. Испытание проводили на 6 единицах таблеток.

В качестве метода количественной оценки степени высвобождения VMA-10-13 из таблеток был выбран метод УФ-спектрофотометрии. В качестве среды растворения использовали воду очищенную.

Как было показано ранее (раздел 3.2.2), спектр поглощения VMA-10-13 в области от 210 до 280 нм имеет полосы поглощения с максимумами при 226 ± 1 и 265 ± 1 нм. Для количественного определения VMA-10-13 была выбрана аналитическая длина волны 265 нм. В то же время при данной длине волны на результаты измерений значительное влияние оказывает аналитический сигнал плацебо (раздел 4.4.1), что приводит к систематической погрешности при количественном определении VMA-10-13 в растворах. Зависимость поглощения раствора плацебо от длины волны в районе 265 нм имеет линейный характер. Как было показано ранее (раздел 4.4.1), для устранения влияния линейного фона можно использовать метод производной спектрофотометрии, при этом её вторая производная при указанной длине волны равна нулю. Линейная зависимость между величиной второй производной спектра поглощения и концентрацией VMA-10-13 в растворе наблюдалась в интервале от 0,005 до 0,04 мг/мл (раздел 4.4.1).

Далее нами была изучена кинетика высвобождения VMA-10-13 из таблеток. Пробы отбирали через каждые пять минут в течение часа. Испытуемые растворы готовили следующим образом: пробы фильтровали через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм, 4 мл фильтрата помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили до метки водой очищенной и перемешивали.

Для приготовления раствора стандартного образца: 0,05 г СО VMA-10-13 помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта 96%, помещали на ультразвуковую баню до полного растворения субстанции, доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали. 2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили до метки водой очищенной и перемешивали.

Измеряли спектры поглощения испытуемого и стандартного растворов на регистрирующем спектрофотометре в диапазоне 250 – 280 нм и рассчитывали их вторые производные ($A'' = (d^2A/d\lambda^2) \cdot 10^2$) при 265 нм при помощи программного обеспечения спектрофотометра «UV Win 5».

Зависимость степени высвобождения VMA-10-13 из таблеток от времени отбора проб представлена на рисунке 32.

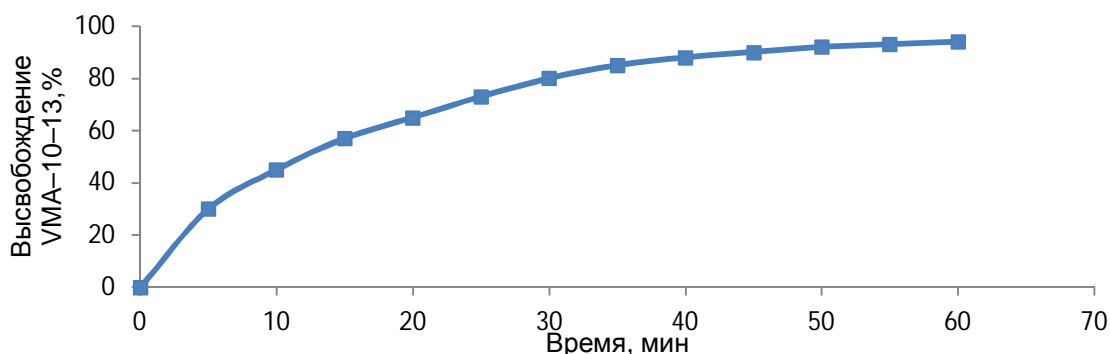


Рисунок 32 – График зависимости степени высвобождения VMA-10-13 из таблеток от времени отбора проб

Как следует из представленного графика, через 45 мин степень высвобождения VMA-10-13 из таблеток составила более 80%, что соответствует установленным требованиям не менее 75+5% от заявленного содержания действующего вещества [29].

На основании полученных данных нами была предложена методика определения (приложение 3).

По разработанной методике был проведен анализ 5 лабораторных серий таблеток «Хиназотроп». Результаты определений степени высвобождения VMA-10-13 из таблеток представлены в таблице 45.

Таблица 45 – Степень высвобождения VMA-10-13 из таблеток через 45 мин

№ серии	Количество VMA-10-13, перешедшее в раствор, %						\bar{X}
	1	2	3	4	5	6	
001	91,6	85,9	87,7	88,9	92,6	91,5	89,7
002	90,7	87,3	91,2	91,6	88,4	88,3	89,6
003	89,3	91,0	90,2	93,1	92,5	89,4	90,9
004	93,6	91,7	88,3	89,4	92,1	92,4	91,3
005	87,9	87,8	91,1	91,4	88,6	89,7	89,4

Для всех образцов таблеток через 45 мин средняя степень высвобождения составила более 85%, что соответствует установленным требованиям не менее 75+10% от заявленного количества VMA-10-13 [29].

4.7. Нормы качества таблеток «Хиназотроп»

На основании результатов проведенных испытаний (глава 4), а также на основе существующих требований к качеству таблеток [29, 63], нами были установлены нормы качества и разработан проект НД на таблетки «Хиназотроп» (приложение 3).

4.8. Установление срока годности таблеток «Хиназотроп»

При установлении срока годности таблеток «Хиназотроп» руководствовались требованиями ОФС.1.1.0009.18 [5]. Изучение стабильности таблеток «Хиназотроп» при хранении проводили в естественных условиях. Для этого 5 лабораторных серий таблеток «Хиназотроп» хранили в сухом защищенном от света месте в склянках оранжевого стекла с винтовой горловиной с навинчиваемыми крышками, при комнатной температуре, в течение 2 лет. Контроль качества проводили по основным показателям, через промежутки времени, равные в течение первого года хранения - через каждые 3 месяца, в течение второго года хранения - через каждые 6 месяцев хранения. Проведенные исследования (таблица 46) показали, что стабильность основных показателей качества таблеток «Хиназотроп» в условиях долгосрочного хранения сохраняется не менее 2-х лет.

Таким образом, может быть установлен предварительный срок годности – 2 года.

Таблица 46 – Результаты определения показателей качества таблеток «Хиназотроп» при хранении в естественных условиях

Серия	Срок хранения, месяц	Описание	Однородность массы, %	Подлинность 1. СФМ 2. ВЭЖХ	Распадаемость, мин	Растворение	Родственные примеси, %	Содержание, г/табл.	
								СФМ	ВЭЖХ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Норма		Таблетки розоватого цвета, двояковыпуклые с риской	18/20: $\pm 7,5\%$ 2/20: $\pm 15\%$	1. $\lambda_{\text{макс}} = 265 \pm 2$ нм 2. Время удерживания	Не более 15 мин	Не менее 80% (Q) за 45 минут	Не более 0,1%	От 23,75 до 26,25 мг	
10-13-001	0	Соответствуют	+4,36; -3,45	Соответствует	6 мин	89,7	Менее 0,1%	24,92	24,97
	3	Соответствуют	+2,75; -4,31	Соответствует	7 мин	91,3	Менее 0,1%	24,87	24,91
	6	Соответствуют	+3,36; -3,23	Соответствует	6 мин	88,4	Менее 0,1%	24,95	24,83
	9	Соответствуют	+3,94; -3,46	Соответствует	6 мин	90,7	Менее 0,1%	24,85	24,98
	12	Соответствуют	+2,34; -5,12	Соответствует	7 мин	91,6	Менее 0,1%	24,93	24,81
	18	Соответствуют	+4,06; -3,48	Соответствует	7 мин	90,3	Менее 0,1%	24,89	24,83
	24	Соответствуют	+3,15; -2,83	Соответствует	7 мин	89,5	Менее 0,1%	24,91	24,88
10-13-002	0	Соответствуют	+3,31; -3,14	Соответствует	6 мин	89,6	Менее 0,1%	25,10	25,03
	3	Соответствуют	+3,56; -4,07	Соответствует	5 мин	92,3	Менее 0,1%	24,98	25,15
	6	Соответствуют	+2,94; -4,56	Соответствует	5 мин	90,9	Менее 0,1%	25,18	25,08
	9	Соответствуют	+3,11; -2,74	Соответствует	6 мин	88,7	Менее 0,1%	25,03	24,92
	12	Соответствуют	+2,67; -4,02	Соответствует	6 мин	89,1	Менее 0,1%	25,09	25,12
	18	Соответствуют	+3,26; -3,76	Соответствует	6 мин	87,9	Менее 0,1%	24,87	25,04
	24	Соответствуют	+3,42; -2,96	Соответствует	6 мин	88,5	Менее 0,1%	25,08	25,14

продолжение таблицы 46

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10-13-003	0	Соответствуют	+3,76; -3,46	Соответствует	7 мин	90,9	Менее 0,1%	25,09	25,02
	3	Соответствуют	+3,14; -2,84	Соответствует	7 мин	87,3	Менее 0,1%	24,86	25,11
	6	Соответствуют	+2,81; -3,25	Соответствует	6 мин	88,7	Менее 0,1%	25,04	25,15
	9	Соответствуют	+2,56; -4,34	Соответствует	6 мин	89,0	Менее 0,1%	24,93	25,05
	12	Соответствуют	+3,64; -2,73	Соответствует	7 мин	91,2	Менее 0,1%	25,17	25,01
	18	Соответствуют	+3,35; -1,93	Соответствует	6 мин	89,6	Менее 0,1%	24,97	25,12
	24	Соответствуют	+2,38; -4,11	Соответствует	7 мин	87,2	Менее 0,1%	25,06	25,19
10-13-004	0	Соответствуют	+2,89; -3,78	Соответствует	6 мин	91,3	Менее 0,1%	24,87	25,04
	3	Соответствуют	+2,36; -1,15	Соответствует	6 мин	87,8	Менее 0,1%	25,01	24,94
	6	Соответствуют	+3,28; -2,63	Соответствует	7 мин	88,4	Менее 0,1%	24,99	25,12
	9	Соответствуют	+3,86; -3,28	Соответствует	6 мин	91,7	Менее 0,1%	24,86	24,92
	12	Соответствуют	+4,54; -1,87	Соответствует	6 мин	88,1	Менее 0,1%	25,14	25,18
	18	Соответствуют	+2,68; -3,69	Соответствует	7 мин	88,3	Менее 0,1%	24,95	25,06
	24	Соответствуют	+2,16; -3,39	Соответствует	6 мин	87,8	Менее 0,1%	24,91	25,03
10-13-005	0	Соответствуют	+3,68; -2,67	Соответствует	7 мин	89,4	Менее 0,1%	25,14	25,02
	3	Соответствуют	+3,28; -2,46	Соответствует	7 мин	87,4	Менее 0,1%	24,91	24,83
	6	Соответствуют	+4,52; -3,39	Соответствует	6 мин	89,0	Менее 0,1%	25,05	24,97
	9	Соответствуют	+1,97; -2,85	Соответствует	6 мин	87,9	Менее 0,1%	24,95	25,08
	12	Соответствуют	+3,47; -4,38	Соответствует	7 мин	90,3	Менее 0,1%	24,89	24,81
	18	Соответствуют	+3,03; -2,76	Соответствует	7 мин	88,2	Менее 0,1%	25,09	24,98
	24	Соответствуют	+2,67; -2,28	Соответствует	7 мин	87,1	Менее 0,1%	25,01	24,84

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. Определены основные фармацевтико-технологические показатели качества лабораторных образцов таблеток «Хиназотроп»: внешний вид, однородность массы, распадаемость.
2. Изучено влияние вспомогательных веществ при идентификации VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп» методами УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ, разработаны методики подтверждения подлинности.
3. Разработана методика определения родственных примесей в таблетках «Хиназотроп» методом ВЭЖХ.
4. Исследовано влияние вспомогательных веществ на результаты количественного определения VMA-10-13 в таблетках «Хиназотроп». Разработаны и валидированы методики количественного определения таблеток «Хиназотроп» методами ВЭЖХ и производной спектрофотометрии.
5. Определена однородность дозирования лабораторных образцов таблеток «Хиназотроп» с использованием метода производной спектрофотометрии.
6. Разработана методика определения показателя «Растворение» таблеток «Хиназотроп» с использованием метода производной спектрофотометрии. Установлено, что степень высвобождения через 45 мин во всех образцах таблеток составляет более 80%.
7. Установлен срок годности таблеток «Хиназотроп» (при хранении в естественных условиях) - 2 года в сухом защищенном от света месте при комнатной температуре.
8. Установлены нормы качества таблеток «Хиназотроп» и оформлен проект НД.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Изучены физико-химические свойства и спектральные характеристики в ИК- и УФ-областях спектров поглощения субстанции VMA-10-13. Определены и нормированы основные фармакопейные показатели качества субстанции VMA-10-13: растворимость (в растворителях с широким диапазоном полярности: воде, спирте 96% и хлороформе), температура плавления (от 257 до 261 °С), кислотность или щелочность, потеря в массе при высушивании (не более 0,5%), сульфатная зола (не более 0,1%). Установлена возможность использования методов ИК-спектрометрии и УФ-спектрофотометрии (наличие полос поглощения с максимумами при 226 ± 2 нм, 265 ± 2 нм, 302 ± 2 нм и 313 ± 2 нм) для подтверждения подлинности субстанции VMA-10-13.

2. Для подтверждения подлинности субстанции VMA-10-13 разработан ряд химических реакций окисления и соле-комплексообразования, основанных на химических свойствах функциональных групп и фрагментов структуры исследуемого вещества. В проект НД включены наиболее чувствительные реакции с реактивом Манделина (0,5 мкг/пробу) и раствором серебра нитрата (2 мг/мл). Разработаны и валидированы методики количественного определения субстанции VMA-10-13 методами неводного титрования и УФ-спектрофотометрии. Обе методики включены в проект НД как альтернативные для субстанции с нормированным содержанием действующего вещества 98,0 – 102,0 %.

3. Изучены хроматографические характеристики VMA-10-13 и возможных примесей методом ВЭЖХ. Определены условия проведения анализа, разработана и валидирована методика определения родственной примеси (незамещенный хиназолин-4(3H)-он) в субстанции VMA-10-13 методом ВЭЖХ, которая позволяет обнаружить определяемую примесь в количестве не более 0,1%. Методом газовой хроматографии определено

содержание остаточного органического растворителя (диметилформамида) не превышающее установленную норму 880 ppm (0,088%).

4. Определены основные фармацевтико-технологические показатели качества лабораторных образцов таблеток «Хиназотроп». Изучено влияние вспомогательных веществ при идентификации VMA-10-13 в таблетках методами УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ, разработаны методики подтверждения подлинности. Разработаны и валидированы методики количественного определения VMA-10-13 в таблетках методами ВЭЖХ и производной спектрофотометрии. Методом производной спектрофотометрии проведено определение «Однородности дозирования» и показателя «Растворение» таблеток.

5. Исследована стабильность при хранении в естественных условиях, установлено, что стабильность основных показателей качества субстанции и таблеток VMA-10-13 сохраняется в течение 2-х лет. Результаты определения родственных примесей показали отсутствие посторонних пиков на полученных хроматограммах, что свидетельствует о стабильности субстанции и таблеток VMA-10-13 в процессе хранения. Установлен предварительный срок годности субстанции и таблеток VMA-10-13 – 2 года.

6. На основании результатов проведенных исследований и существующих требований установлены нормы качества и оформлены проекты НД на субстанцию и таблетки VMA-10-13.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфорная кислота
- БАС – биологически активное соединение
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГЭБ – гемато-энцефалический барьер
- ГХ – газовая хроматография
- ГФ XIV – Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания
- ИК-область – инфракрасная область спектра
- ИК-спектр – спектр поглощения в инфракрасной области
- ИК-спектрометрия – спектрометрия в инфракрасной области
- ЛВ – лекарственное вещество
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛС – лекарственное средство
- ЛФ – лекарственная форма
- МНН – международное непатентованное название
- НД – нормативный документ
- ОФС – общая фармакопейная статья
- ПМР – протонно-магнитный резонанс
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- СО – стандартный образец
- УФ-область – ультрафиолетовая область спектра
- УФ-спектр – спектр поглощения в ультрафиолетовой области
- УФ-спектрофотометрия – спектрофотометрия в ультрафиолетовой области
- ТСХ – тонкослойная хроматография
- ФС – фармакопейная статья
- BP – British Pharmacopoeia
- EP – European Pharmacopoeia
- JP – Japanese Pharmacopoeia
- USP – The United States Pharmacopoeia

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айвазов, Б.В. Введение в хроматографию: учеб. пособие для хим. спец. вузов / Б.В. Айвазов. – М. : Высш. шк., 1983. – 240 с.
2. Альберт, А. Константы ионизации кислот и оснований / А. Альберт, Е. Сергент ; под общ. ред. Б.А. Порай-Кошица. – М. : Химия, 1964.– 180 с.
3. Ахрем, А.А. Тонкослойная хроматография / А.А. Ахрем, А.И. Кузнецова. – М. : Наука, 1964. – 175 с.
4. Баффингтон, Р. Детекторы для газовой хроматографии / Р. Баффингтон, М. Уилсон ; пер. с англ. – М. : Мир, 1993.–80 с.
5. Бахшиев, Н.Г. Введение в молекулярную спектроскопию: учеб. пособие / Н.Г. Бахшиев. – Л. : ЛГУ, 1987. – 216 с.
6. Беккер, Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза / Ю. Беккер. – М.: Техносфера, 2009. – 472 с.
7. Березкин, В.Г. Количественная тонкослойная хроматография / В.Г. Березкин, Н.С. Бочков. – М.: Наука, 1980. – 183 с.
8. Берштейн, И.Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И.Я. Берштейн, Ю.Л. Каминский. – Л.: Химия, 1986. – 200 с.
9. Бёккер, Ю. Спектроскопия /Ю. Бёккер. – М.: Техносфера, 2009.– 528 с.
10. Большаков, Г.Ф. Ультрафиолетовые спектры гетероорганических соединений / Г.Ф. Большаков, В.С. Ватаго, Ф.Б. Агрест – Л.: Химия, 1969. – 504 с.
11. Булатов, М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин. – Л. : Химия, 1986. – 432 с.
12. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / пер. с англ. – М.: Литтерра, 2008. – 132 с.

13. Вигдергауз, М.С. Расчеты в газовой хроматографии / М.С. Вигдергауз. – М. : Химия, 1978. – 248 с.
14. Витенберг, А.Г. Газовая экстракция в хроматографическом анализе / А.Г. Витенберг, Б.В. Иоффе. – Л. : Химия, 1982. – 280 с.
15. Волокитина, Д.С. Применение производной спектрофотометрии для определения нового биологически активного соединения производного хиназолина в таблетках / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин // Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19, № 9. – С. 215-218.
16. Волокитина, Д.С. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции нового биологически активного соединения производного хиназолин-4(3H)-она методом кислотно-основного титрования в неводной среде / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин // Евразийский Союз Ученых. – 2018. – № 56, ч. 3. – С. 39-42.
17. Волокитина, Д.С. Разработка способов определения подлинности БАС производного хиназолина / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин // Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19, № 6. – С. 142-145.
18. Воробьева, О.В. Ноотропные препараты – новые возможности известных лекарств / О.В. Воробьева // Consilium Medicum (Ревматология и неврология). – 2008. – Т. 10, № 2. – С. 7–11.
19. Высокоэффективная тонкослойная хроматография / ред. А. Златкис, Р. Кайзер ; пер. с англ. А.С. Бочкова. – М. : Мир, 1979. – 247 с.
20. Гейсс, Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография) / Ф. Гейсс; пер. с англ. – М. : Мир, 1987. – Т. 1. – 405 с.
21. Гейсс, Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография) / Ф. Гейсс; пер. с англ. – М. : Мир, 1988. – Т. 2. – 349 с.
22. Гетероциклические соединения / под ред. Р. Эльдерфилда ; пер. с англ. – М. : ИИЛ, 1960. – Т.6. – 612 с.

23. Гомберг, В.Г. Применение теразозина (Сетегис) в лечении гиперактивного мочевого пузыря и ургентной инконтиненции у пожилых женщин / В.Г. Гомберг, Ю.Т. Надь, В.В. Ефимова // Рус. мед. журн. – 2005. – Т.13, № 9. – С. 606–607.
24. Государственная фармакопея СССР. – 11-е изд. – М.: Медицина, 1987. Вып. 1. – 336 с.
25. Государственная фармакопея Российской Федерации. – 12-е изд. – М.: Науч. центр экспертизы средств мед. применения, 2008. – 704 с.
26. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. – 13-е изд. - М. : МЗ РФ, 2015. – Т. 1. Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml>.
27. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. – 13-е изд. - М. : МЗ РФ, 2015. – Т. 2. Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml>.
28. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. – 14-е изд. - М. : МЗ РФ, 2018. – Т. 1. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
29. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. – 14-е изд. - М. : МЗ РФ, 2018. – Т. 2. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
30. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. – 14-е изд. Т. - М. : МЗ РФ, 2018. – Т. 3. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
31. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://grls.rosminzdrav.ru>.
32. Гринюк, Н.К. Магурол (доксазозин) в лечении больных с доброкачественной гиперплазией предстательной железы / Н.К. Гринюк // Мед. новости. – 2011. – № 8. – С. 56–57.

33. Гуторов, С.Л. Гефитиниб (Иресса) в современной лекарственной терапии немелкоклеточного рака легкого / С. Л. Гуторов, Е. И. Чичиков // Фарматека. – 2008. – № 18. – С. 25-28.
34. Денеш, И. Титрование в неводных средах / И. Денеш; под ред. И.П. Белецкой. – М. : Мир, 1971. – 413 с.
35. Дженнингс, В. Подготовка образцов для газохромато-графического анализа / В. Дженнингс, А. Рапп ; пер. с англ. – М. : Мир, 1986. – 118 с.
36. Джоуль, Дж. Химия гетероциклических соединений / Дж. Джоуль, К. Миллс ; пер.с англ. – М. : Мир, 2004. – 728 с.
37. Исаева, Н.В. Таблетки. Нормативные требования Государственной фармакопеи XIII издания / Н.В. Исаева, А.И. Тулайкин, Е.В. Шешегова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – №3 (20). – С. 178-183.
38. Казицина, Л.А. Применение УФ, ИК, ЯМР и масс-спектропии в органической химии / Л. А. Казицина, Н. Б. Куплетская. – М. : изд-во МГУ, 1979. – 240 с.
39. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография / Ю. Кирхнер. – М. : Мир, 1981. – Т. 1. – 616 с.
40. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография / Ю. Кирхнер. – М. : Мир, 1981. – Т. 2. – 532 с.
41. Король А.Н. Неподвижные фазы в газожидкостной хроматографии / А.Н. Король. – М. : Химия, 1985. – 240 с.
42. Котова, О.В. Ноотропные препараты в современной медицине / О.В. Котова // Неврология. – 2011. – № 29. – С. 1816-1818.
43. Лабораторный практикум по курсу «Теория вероятностей и математическая статистика» / В.В. Бардушкин, В.В. Лесин, В.Н. Земсков, Н.Н. Мустафин. – М.: МИЭТ, 2009. – 116 с. : ил.
44. Лурье, Ю. Ю. Справочник по аналитической химии: справ. изд. / Ю. Ю. Лурье. - 6-е изд., перераб. и доп. – М.: Химия, 1989. – 448 с.

45. Макарова, Д.А. Ноотропные препараты как средство достижения социального успеха: к проблеме постчеловечества / Д.А. Макарова, А.В. Тараканова // Бюл. мед. интернет - конф. (ISSN 2224-6150). – 2016. – Т. 6, № 5. – С. 967-969.
46. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – 16-е изд., перераб. и доп. – М. : Новая волна, 2012. – 1216 с.
47. Место диуретиков в лечении хронической сердечной недостаточности / Б.А. Сидоренко [и др.] // Кардиология, 2005. – № 8. – С. 76-83.
48. Мхитарян, В.С. Теория вероятностей и математическая статистика: учеб. пособие / В.С. Мхитарян, В.Ф. Шишов, А.Ю. Козлов. – М.: Академия, 2012. – 336 с.
49. Руководство по газовой хроматографии : в 2-х ч. Ч.1. пер. с нем. / под ред. Э. Лейбница, Х.Г. Штруппе. – М. : Мир, 1988. –480 с.
50. Ноотропная активность амидов хиназолинового ряда / И.Н. Тюренков [и др.] // Хим-фармац. журн. – 2015. –Т.49, № 2. – С. 18-20.
51. Определение физико-химических свойств новой биологически активной субстанции обладающей ноотропной активностью / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин, О. М. Маркова // Беликовские чтения: материалы 4 Всерос. науч. – практ. конф. – Пятигорск, 2015. – С. 14-16.
52. Орехов, А.П. Химия алкалоидов / А.П. Орехов. – 2-е изд., испр. и доп. – М. : АН СССР, 1955. – 865 с.
53. Пат. 2507198 Рос. Федерация, МПК С07D239/88, А61К31/517, А61Р25/28, А61Р9/10. Производные хиназолина, обладающие ноотропной и антигипоксической активностью / Петров В.И., Тюренков И.Н., Озеров А.А. (РФ). – № 2012138665/04; заявл. 10.09.2012; опубл. 20.02.2014, Бюл. № 5. – 12 с.
54. Пат. 2507199 Рос. Федерация, МПК С07D239/88, А61К31/517, А61Р25/28, А61Р25/22, А61Р25/24. Производные хиназолина, обладающие антидепрессивной, анксиолитической и ноотропной

- активностью / Петров В.И., Тюренков И.Н., Озеров А.А. (РФ). – № 2012138666/04; заявл. 10.09.2012; опубл. 20.02.2014, Бюл. № 5. – 15 с.
55. Правила составления, изложения и оформления стандартов качества на фармацевтические субстанции : метод. рекомендации / под ред. Н.В. Юргель [и др.]. – М., 2009. – 68 с.
56. Практическая газовая и жидкостная хроматография: учеб. пособие / Б.В. Столяров [и др.]. – СПб.: изд-во СПб. ун-та, 2002. – 616 с.
57. Путилина, М.В. Современные представления о ноотропных препаратах / М.В. Путилина // Леч. врач. – 2006. – № 5. – С. 10–14.
58. Разработка и валидация методики количественного определения в таблетках нового вещества ноотропного действия методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин, А.В. Морозов // Сб. науч. работ 47й Меж. науч. конф. Евразийского Научного Объединения. - Москва : ЕНО, - 2019. – Т. 47, № 1. – 133 – 135.
59. Разработка и валидация методики определения родственных примесей в субстанции нового биологически активного соединения ноотропного действия – VMA-10-13 / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин, А.В. Морозов // Здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – Т. 20, № 12. – С. 184-188.
60. Разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения субстанции нового биологически активного соединения производного хиназолин-4(3H)-она / Д.С. Волокитина, А.А. Озеров, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин // Вестн. Волгоград. гос. мед. ун-та. – 2017. – Т. 62, № 2. – С. 35-38.
61. Регистр лекарственных средств России. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.rlsnet.ru>.

62. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации / под ред. Н.В. Юргеля [и др.] – М.: Спорт и Культура - 2000, 2007. – 192 с.
63. Руководство по экспертизе лекарственных средств : Т. 2. – М.: Гриф и К, 2013. – 280 с.
64. Свердлова, О.В. Электронные спектры в органической химии / О.В. Свердлова. – Л.: Химия, 1985. – 248 с.
65. Сидоренко, Б.А. Блокаторы α -адренергических рецепторов как антигипертензивные препараты / Б.А. Сидоренко, Д.В. Преображенский // Рос. мед. журн., 1999. – №7. – С. 12.
66. Смит, А.Л. Прикладная ИК-спектроскопия / А. Смит; пер. с англ. – М.: Мир, 1982. – 328 с.
67. Способы идентификации новой биологически активной субстанции, обладающей ноотропной и противогипоксической активностью / Д.С. Волокитина, Д.С. Лазарян, С.В. Волокитин, О.М. Маркова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2016. – Вып. 71. – С. 142-145.
68. Справочник ВИДАЛЬ. Справочник лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.vidal.ru>.
69. Стыскин, Е.Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде. – М.: Химия, 1986. – 288 с.
70. Тарасевич, Б.Н. ИК спектры основных классов органических соединений: Справочные материалы / Б.Н. Тарасевич. – М.: МГУ, 2012. – 54 с.
71. Тарцева (эрлотиниб) в терапии распространенной аденокарциномы легкого при наличии мутации рецептора эпидермального фактора роста / С.В. Орлов [и др.] // Современная онкология. – 2009.– № 4. – С. 35-37.

72. Уварова, Ю. Рынок ноотропных препаратов / Ю. Уварова // Ремедиум. – 2010. – № 3. – С. 20-25.
73. ФС.2.1.0097.18. Доксазозина мезилат, субстанция [Электронный ресурс]. – 14-е изд. Т. - М. : МЗ РФ, 2018. – Т. 3. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacorea.php>.
74. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии : в 2-х ч. Ч.1. / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец ; пер. со словац. – М. : Мир, 1980. – 296 с.
75. Шатц, В.Д. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы теории. Методология. Применения в лекарственной химии / В.Д. Шатц, О.В. Сахартова. – Рига: Зинатне, 1988. – 390 с.
76. Эпштейн, Н.А. Определение внутрилабораторной прецизионности (воспроизводимости) при валидации методик в фармации / Н. А.Эпштейн // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016 – №1(14). – С. 106-117.
77. Эпштейн, Н. А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) / Н. А.Эпштейн // Хим.-фармац. журн. – 2004. –Т. 38, № 4. - С. 40-56.
78. Эрмер, Й. Валидация методик в фармацевтическом анализе : Примеры наилучшей практики / Й. Эрмер, Дж. Х.МакБ. Миллер : пер. с англ. – М. : Группа компаний ВИАЛЕК, 2013. – 512 с.
79. α -Blockade and thiazide treatment of hypertension A double-blind randomized trial comparing doxazosin and hydrochlorothiazide / R.H. Grimm [et al.] // Americ. J. of Hypertension. – 1996. – Vol. 9, № 5. – P. 445-454.
80. Abida, P.N. An updated review: Newer quinazoline derivatives under clinical trial / P.N. Abida, M. Arpanarana // Inter. J. of Pharmaceutical & Biological Archive. – 2011. – Vol. 2, №6. – P. 1651-1657.
81. Ammar, R.A. Spectrophotometric and Spectrofluorometric Determination of Doxazosin Mesylate in Tablets via Eosin Y / R.A. Ammar,

- A.M. El-Brashy, T.N. Al-Sahly // Asian J. of Chemistry. – 2014. – Vol.26, №1. – P. 57-62.
82. Armarego, W.L.F. Chemistry of Heterocyclic Compounds: Fused Pyrimidines, Part I, Quinazolines, Volume 24 / W.L.F. Armarego. – INTERSCIENCE PUBLISHERS a division of John Wiley & Sons, N. Y., 1967. – 539 p.
83. Anagrelide for thrombocytosis in myeloproliferative disorders: a prospective study to assess efficacy and adverse event profile / M. Steurer [et al.] // Cancer. – 2004. – Vol.101, №10. – P. 2239-2246.
84. Ashour, S. Conductometric Titration Method for Determination of Alfuzosin Hydrochloride and Fexofenadine Hydrochloride Using Sodium Tetraphenylborate / S. Ashour, M. Khateeb // Canadian Chemical Transactions. – 2013. – Vol. 1, №4. – P. 292-304.
85. Ashour, S. Spectrophotometric determination of alfuzosin HCl in pharmaceutical formulations with some sulfonephthalein dyes / S. Ashour, M.F. Chehna, R. Bayram // Int. J. Biomed Sci. – 2006. – Vol. 2, № 3. – P. 273–278.
86. Asif M. Chemical characteristics, synthetic methods, and biological potential of quinazoline and quinazolinone derivatives / M. Asif // Int. J. Med. Chem. – 2014. – Vol. 2014. – Art. ID 395637. – 27 p.
87. A validated UV spectroscopic method of metolazone in bulk and its tablet dosage forms / B. Durga Prasad [et al.] // Int. J. of Biological & Pharmaceutical Research. – 2012. – Vol. 3(1). – P. 154-157.
88. Bakshi, M. Validated specific HPLC methods for determination of prazosin, terazosin and doxazosin in the presence of degradation products formed under ICH-recommended stress conditions / M. Bakshi, T. Ojha, S. Singh. // J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2004. – Vol. 34, №1. – P. 19-26.
89. Bharath Kumar, K.S. New RP-HPLC method for the estimation of Alfuzosin hydrochloride in tablet dosage form / K.S. Bharath Kumar,

- V.Asha Ranjani, D. Sathyavathi // *Int. J. of pharmacy and Pharmaceutical sciences.* – 2010. – Vol. 2, №4. – P. 90-92.
90. Bonfilio, R. Development and validation of an UV-derivative spectrophotometric method for determination of glimepiride in tablets / R. Bonfilio, M.B. Araújo, H.R.N. Salgado // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2011. – Vol. 22, №2. – P. 292-299.
91. *British Pharmacopeia 2009* / H.M. Stationary Office. – London: H.M. Stationary Office, 2009. – 10952 p.
92. *Clinical pharmacological studies with doxazosin* / Elliott H.L [et al.] // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 1986. – Vol. 21. - P. 27-31.
93. Davey, M.J. The pharmacology of prazosin, an alpha 1-adrenoceptor antagonist and the basis for its use in the treatment of essential hypertension / M.J. Davey // *Clin Exp Hypertens A.* – 1982. – Vol. 4 (1-2). – P. 47-59.
94. Derivative spectroscopy: Development and validation of new spectroscopic method for the estimation of metadoxine in bulk and solid dosage form / P. Kumar [et al.] // *Oriental J. of Chemistry.* – 2008. – Vol. 24, №1. – P. 313-317.
95. Determination of Doxazosin Mesylate in Tablets by RP-HPLC / B. Dhanya [et al.] // *Indian J. Pharm. Sci.* – 2011. – Vol. 73, №1. – P. 120–122.
96. Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of Erlotinib in pharmaceutical formulation / S.T. Latha [et al.] // *Arabian J. of Chemistry.* – 2017. – Vol. 10. – P. 1138-1144.
97. Development and Validation of Second Order Derivative Spectrophotometric Method for Simultaneous Estimation of Desloratidine and Pseudoephedrine HCl In Combined Dosage Form / Hussain Raviteja. K. [et al.] // *Am. J. Pharm. Tech. Res.* – 2013. – Vol. 3, №4. – P. 849-859.
98. Development and validation of UV spectrophotometric method for determination of Doxazosin Mesylate in tablet formulation / Shilpa P.

- Chaudhari [et al.] // *Der Pharmacia Sinica*. – 2012. – Vol.3, №4. – P. 427-432.
99. Development and Validation of UV Spectrophotometric Methods for Estimation of Alfuzosin in Bulk and Pharmaceutical Formulation / P.V. Adsule [et al.] // *Int. J. of Pharmaceutical Research and Development*. – 2011. – Vol. 3(11). – P. 195-199.
100. Dikran, S.B. First- and Second-Order Derivative Spectrophotometry for Individual and Simultaneous Determination of amoxicillin and cephalexin / S.B. Dikran, M.J.M. Hussan // *Natl. J. Chem.* – 2009. – Vol. 34. – P. 260-269.
101. Doxazosin for the treatment of benign prostatic hyperplasia in patients with mild to moderate essential hypertension: a double-blind placebo controlled, dose response multicenter study / J.Y. Gillenwater [et al.] // *J. Urol.* – 1995. – Vol. 154. – P. 110-115.
102. Efficacy of terazosin as an antihypertensive agent / R.R. Luther [et al.] // *Am. J. Med.* – 1986. – Vol. 80, №5. – P. 73-76.
103. El-Sayed, A.Y. Recent Development of Derivative Spectrophotometry and their Analytical Applications / A.Y. El-Sayed, N.A. El-Salem // *Analytical Science*. – 2005. – Vol. 21. – P. 595-614.
104. Elwy, H.M. New Spectrophotometric and Spectrofluorimetric Methods for Determination of Prazosin HCl in API and Drug Product / H.M. Elwy, T.A. Mohammed // *Int. J. of Science and Research*. – 2015. – Vol. 4, № 7. – P. 1748-1755.
105. Erlotinib and gefitinib responsiveness in head and neck cancer cell lines-a comparing analysis with cetuximab / S. Hartmann [et al.] // *Clin. Oral Investig.* – 2016. – Vol. 20, № 4. – P. 759-769.
106. Erlotinib in the maintenance therapy of advanced non-small cell lung cancer: a systematic review / X.L. Ma [et al.] // *Chinese J. of Cancer Prevention and Treatment*. – 2014. – Vol. 21, № 10. – P. 786-791.

107. European Pharmacopeia - 8th ed. / European Department for Quality of Medicines ; 8th. - Strasbourg : EDQM, Strasbourg. France, 2013. – 10952 p.
108. Fried, B. Thin-Layer Chromatography / B. Fried, J. Sherma. – New York.: Marcel Dekker, 1999.– 512 p.
109. Gefitinib induces lung cancer cell autophagy and apoptosis via blockade of the PI3K/AKT/mTOR pathway / Z.Q. Zhao [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2016. – Vol.12, № 1. – P. 63-68.
110. Gelfand, M.L. The use of metolazone in the treatment of congestive heart failure / M.L. Gelfand, A. Cortega, A. Lien // *J. Clin. Pharmacol.* – 1974. – Vol. 14. – P. 396-397.
111. Handbook of Thin-Layer Chromatography: 5th ed., rev. and exp. / ed. by J. Sherma, B. Fried. – N. Y.: Marcel Dekker, INC, 2003. – 1331 p.
112. Hedner, T. Effects of a new serotonin antagonist, ketanserin, in experimental and clinical hypertension / T. Hedner, B. Persson // *Am. J. Hypertens.* – 1988. – Vol. 1, № 3. – P. 317-323.
113. Introduction to Experimental Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Practical Methods / ed. by M. Tasumi. – Wiley, 2014. – 408 p.
114. Japanese Pharmacopoeia - 17th ed., English version / The ministry of health, labour and welfare. – Tokyo, 2016. – 1802 p.
115. Joule, J.A. Heterocyclic Chemistry / J.A. Joule, K. Mills. – 5th ed. Wiley, 2010. – 689 p.
116. Lee, M. Alfuzosin Hydrochloride for the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia / M. Lee // *Am. J. Health-Syst. Pharm.* – 2003. – Vol. 60, № 14. - P. 1426-1439.
117. Messerli, F.H. Doxazosin and congestive heart failure / F.H. Messerli // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2001. – Vol. 38, № 5. – P. 1295-1296.
118. Method Development and Validation for the Simultaneous Estimation of Alfuzosin Hydrochloride and Dutasteride in Bulk and Pharmaceutical

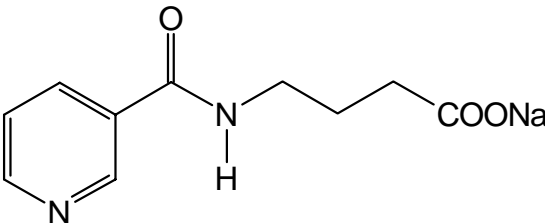
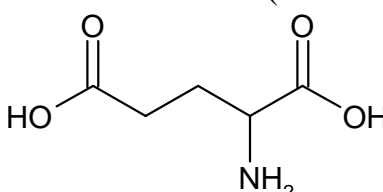
- Dosage Form / K. Jayanthi [et al.] // J. of Pharma Research. – 2013. – Vol. 2, №7. – P. 6-10.
119. Muralidharan, S. A Validated RP-HPLC Method for Estimation of Doxazosin mesylate in Pharmaceutical Tablet Dosage Form / S. Muralidharan // Int. J. of Chemical and Analytical Science. – 2012. – Vol. 3, №8. – P. 1530-1532.
120. Nataraj, K.S. Method Validation and Estimation of Anagrelide Hydrochloride in Pharmaceutical Dosage by RP-HPLC Method / K.S. Nataraj, B. Prasanna Lakshmi, I. Sravanthi // Int. J. Drug Dev. & Res. – 2017. – Vol.9, №3. – P. 25-27.
121. Neue, U.D. HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice / U.D. Neue. – N.Y.: Wiley-VCH, 1997. – 393 p.
122. Public web resource [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.chemicalize.org>.
123. Public web resource [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.pipharm.com>.
124. Public web resource [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.drugbank.ca>.
125. Public web resource [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search>.
126. Reid, J.L. Clinical pharmacology and therapeutic role of prazosin and related alpha-adrenoceptor antagonists / J.L. Reid, J. Vincent // Cardiology. – 1986. – Vol.73, №3. – P. 164-174.
127. Roehrborn, C.G. Alfuzosin: overview of pharmacokinetics, safety, and efficacy of a clinically uroselective alpha-blocker / C.G. Roehrborn // Urology. – 2001. – Vol.58, №6. – P. 55–63.
128. Sensitive Spectrophotometric method for the determination of prazosin / G. Dilli Rani [et al.] // Indian J. of Advances in Chemical Sciences. – 2015. – Vol. 3, №4. – P. 328-332.

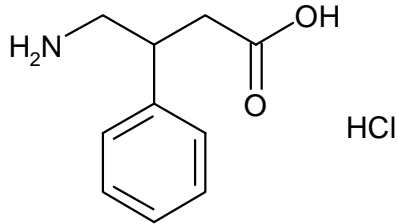
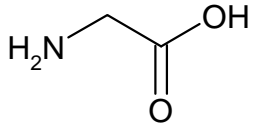
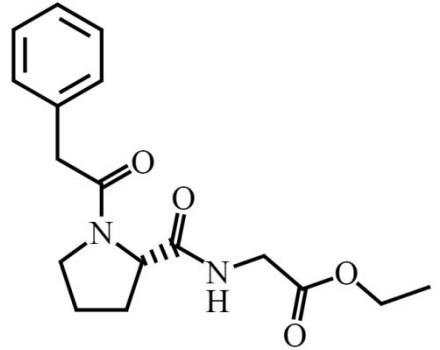
129. Shah, S.N. Development and validation of simple UV-spectrophotometric method for quantification of prazosin in API and solid dosage formulation / S.N. Shah // *J. of Quality Assurance and Pharma Analysis*. – 2015. – Vol. 1. – P. 110-114.
130. Shrivastava, A. Spectrophotometry Method for the Determination of Terazosin in Tablet Formulation / A. Shrivastava, L. Dhakad // *World Journal of Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 4, № 1. – P. 11-16.
131. Simultaneous Quantification of Metolazone and Ramiprilin Their Combined Dosage Form by First Order Derivative Spectroscopic Method / R.M. Pratik [et al.] // *Turk. J. Pharm. Sci.* – 2015. – Vol.12, №2. – P. 169-176.
132. Spectrophotometric and Spectrofluorimetric methods for the determination of Terazosin in dosage forms / H.H. Abdine [et al.] // *Spectrosc. Lett.: Int. J. Rapid Communication*. – 1998. – Vol.31, №5. – P. 969-980.
133. Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* / B. Stuart. – John Wiley & Sons, Chichester, 2004. – 242 p.
134. Suguna, P. Validated RP-HPLC method for quantification of metolazone in bulk drug and formulation / P. Suguna // *Der Chemica Sinica*. – 2014. – Vol.5, №6. – P. 1-8.
135. The United States Pharmacopeia - 38th revision. National formular - 33th ed. / USP 38 – NF 33 ; ed. 33th: Rockville, Maryland, 2015. – 3795 p.
136. Thompson J.M. *Infrared Spectroscopy* /J.M. Thompson. – Pan Stanford Publishing, USA, 2018. – 196 p.
137. Umadevi, B. Simultaneous estimation of metolazone and spironolactone in combined tablet dosage form by uv spectroscopy / B. Umadevi, T. Vetrichelvan // *Int. J. Pharm. Tech. Res.* – 2011. – Vol.3, №4. – P. 2068-2074, 2011.

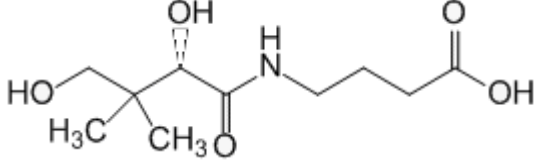
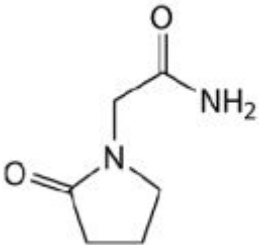
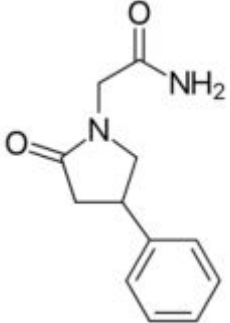
138. Wagstaff, A.J. Anagrelide: a review of its use in the management of essential thrombocythaemia / A.J. Wagstaff, G.M. Keatin // *Drugs*. – 2006. – Vol. 66. – P. 111-131.
139. Woods, A.L. The management of symptomatic benign prostatic hyperplasia with the once-daily alpha-1 blocker terazosin / A.L. Woods // *Mil. Med.* – 1992. – Vol.157, №7. – P. 361-364.

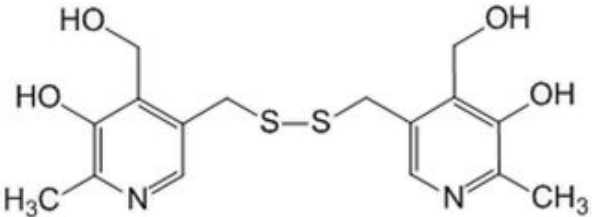
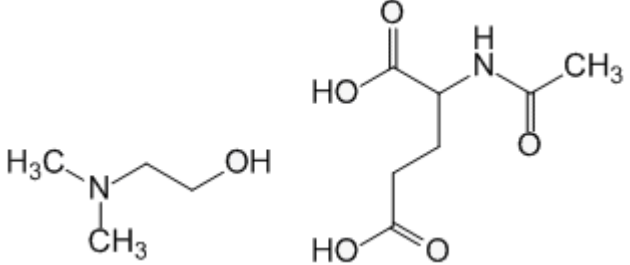
ПРИЛОЖЕНИЯ

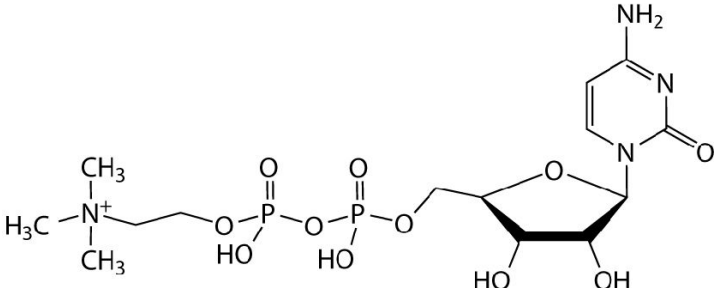
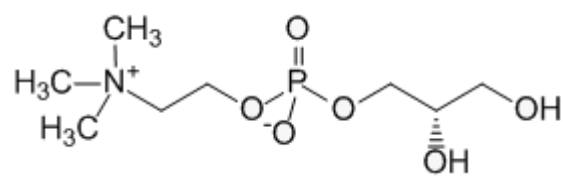
Лекарственные средства ноотропного действия, зарегистрированные в Российской Федерации

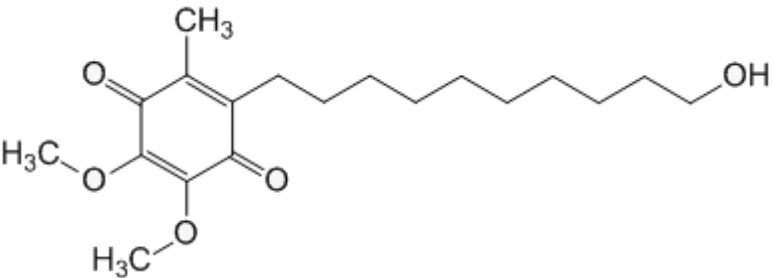
МНН и химическая формула	Торговые наименования	1 –фармакологическое действие 2 –формы выпуска
1	2	3
Производные аминокислот		
<p>Гамма-аминомасляная кислота (Gamma-aminobutyric acid)</p> $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$ <p><i>4-аминобутановая кислота</i></p>	Аминалон	<p>1 – стимулирующее метаболизм в ЦНС, ноотропное</p> <p>2 – таблетки, покрытые пленочной оболочкой 250 мг</p>
<p>Никотиноил гамма-аминомасляная кислота (Nicotinoyl gamma-aminobutyric acid)</p>  <p><i>натрия 4-(пиридин-3-карбониламино) бутаноат</i></p>	Амилоносар Пикамилон Пиканоил Пикога М	<p>1 – антиагрегационное, антиоксидантное, ноотропное, транквилизирующее, улучшающее мозговое кровообращение, противомигренозное</p> <p>2 – таблетки 10, 20, 50 мг; раствор для в/в и в/м введения 50, 100 мг/мл</p>
<p>Глутаминовая кислота (Glutamic acid)</p>  <p><i>L-Глутаминовая кислота</i></p>	Глутаминовая кислота	<p>1 – нейромедиаторное, стимулирующее метаболизм в ЦНС, ноотропное</p> <p>2 – таблетки покрытые оболочкой 250 мг</p>

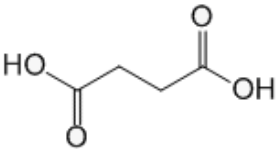
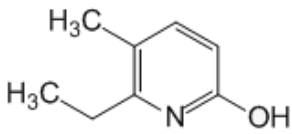
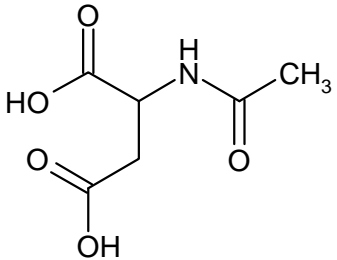
1	2	3
<p>Аминофенилмасляная кислота (Aminophenylbutyric acid)</p>  <p>λ-амино-β-фенилмасляной кислоты гидрохлорид</p>	<p>Фенибут Анвифен Ноофен</p>	<p>1 – антиоксидантное, противосудорожное, ноотропное, транквилизирующее, антиагрегантное 2 – таблетки 250 мг; капсулы 25, 50, 125, 250 мг</p>
<p>Глицин (Glycine)</p>  <p>аминоуксусная кислота</p>	<p>Глицин Глицин форте Глицин-Канон</p>	<p>1 – антиоксидантное, нейропротективное, нейрометаболическое, ноотропное 2 – таблетки подъязычные 100, 250 мг; таблетки защечные 250, 1000 мг</p>
<p>Этиловый эфир N-фенилацетил-L-пропилглицина (Ethyl Esther de N-phenylacetyl-L-prolilglitsina)</p>  <p>этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина</p>	<p>Ноопепт</p>	<p>1 – ноотропное 2 – таблетки 10 мг</p>

1	2	3
<p>Гопантенвая кислота (Gopantenic acid)</p>  <p><i>(R)</i>-4-[(2,4-дигидрокси-3,3-диметил-1-оксобутил)амино]бутановая кислота</p>	<p>Пантотропил Пантогам</p>	<p>1 – ноотропное 2 – таблетки 250, 500 мг; сироп 100 мг/мл</p>
Производные пирролидона		
<p>Пирацетам (Piracetam)</p>  <p><i>2</i>-оксо-1-пирролидинацетамид</p>	<p>Луцетам Мемотропил Ноотропил Эскотропил</p>	<p>1 – ноотропное 2 – капсулы 200, 400 мг; таблетки покрытые оболочкой 200 мг; таблетки покрытые пленочной оболочкой 400, 800, 1200 мг; раствор для в/в и в/м введения 200 мг/мл</p>
<p>Фонтурацетам (Fonturacetam)</p>  <p><i>(RS)</i>-2-(2-Оксо-4-фенилпирролидин-1-ил)-ацетамид</p>	<p>Фенотропил Слим Стори проф</p>	<p>1 – ноотропное 2 – таблетки 50, 100 мг; таблетки, покрытые пленочной оболочкой 100 мг</p>

1	2	3
Производные пиридоксина		
<p>Пиритинол (Pyritinol)</p>  <p><i>3,3'-[Дитиобис(метилен)]бис[5-гидрокси-6-метил-4-пиридинметанол]</i></p>	<p>Энцефабол</p>	<p>1 – ноотропное, стимулирующее метаболизм в ЦНС, улучшающее мозговое кровообращение 2 – таблетки покрытые оболочкой 100 мг; суспензия для приема внутрь 80,5 мг/5 мл</p>
<p>Пиридоксин + Треонин (Pyridoxine + Threonine)</p>	<p>Биотредин</p>	<p>1 – антиабстинентное, антиалкогольное, нейропротективное, метаболическое 2 – таблетки подъязычные (5 мг+100 мг)</p>
Производные диметиламиноэтанола		
<p>Деанола ацеглумат (Deanol aceglumate)</p>  <p><i>N-ацетилглутамат 2-(диметиламино)этанола</i></p>	<p>Нооклерин</p>	<p>1 – ноотропное, нейропротекторное 2 – раствор для приема внутрь 20%</p>

1	2	3
Производные холина (2-гидроксиэтилтриметиламмония)		
<p>Цитиколин (Citicoline)</p>  <p><i>циидин-5'-(тригидродифосфат)моно [2-(триэтиламмонио)этил](эфир) гидроксид</i></p>	<p>Квинель Нейрохолин Нейпилепт Пронейро Рекогнан Цераксон Цересил Канон</p>	<p>1 – ноотропное, нейрометаболическое 2 – раствор для приема внутрь 100 мг/мл; раствор для в/в и в/м введения 125, 250 мг/мл</p>
<p>Холина альфосцерат (Choline alfoscerate)</p>  <p><i>холина гидроксида (R)-2,3-дигидроксипропилгидрофосфат (внутренняя соль)</i></p>	<p>Нооприн Глиатилин Делецит НоохолинРомфарм Церетон Церепро Холитилин</p>	<p>1 – нейропротективное, ноотропное 2 – раствор для в/в и в/м введения 250 мг/мл, 1000 мг/3 мл; капсулы 400 мг; раствор для приема внутрь 600 мг/7 мл</p>
Нейропептиды и их аналоги		
<p>Метионил-глутамил- гистидил-фенилаланил-пролил-глицил- пролин (Methionyl-glutamyl-histidyl-phenylalanyl-prolyl-glycyl-proline) C₃₉H₅₅N₉O₁₂S <i>метионил-глутамил-гистидил-фенилаланил-пролил-глицил-пролин</i></p>	<p>Семакс</p>	<p>1 – антиоксидантное, ноотропное, антигипоксическое, церебропротективное 2 – капли назальные 0,1%</p>

1	2	3
Производные кофермента Q		
<p>Идебенон (Idebenone)</p>  <p>2-(10-Гидроксидецил)-5,6-диметокси-3-метил-циклогекса-2,5-диен-1,4-дион</p>	<p>Нейромет Нобен Целестаб</p>	<p>1 – ноотропное 2 – капсулы 30, 45 мг</p>
Полипептиды коры головного мозга скота		
<p>Полипептиды коры головного мозга скота</p>	<p>Кортексин</p>	<p>1 – нейропротекторное, антиоксидантное, тканеспецифическое, ноотропное 2 – лиофилизат для приготовления раствора для в/м введения 5, 10 мг</p>
<p>Комплекс пептидов, полученных из головного мозга свиньи</p>	<p>Церебролизин</p>	<p>1 – ноотропное, нейрометаболическое 2 – раствор для инъекций 1, 2, 5, 10, 30 мл</p>
<p>Полипептиды из головного мозга эмбрионов свиней (Polypeptides from the brain of pig embryos)</p>	<p>Целлекс</p>	<p>1 – нейропротективное, ноотропное 2 – раствор для подкожного введения 0,1 мг/мл</p>
<p>Антитела к мозгоспецифическому белку S-100 (Antibodies to the brain-specific protein S-100)</p>	<p>Тенотен</p>	<p>1 – антидепрессивное, антиастеническое, анксиолитическое, ноотропное, нейропротективное, антигипоксическое, антистрессовое, антиамнестическое 2 – таблетки для рассасывания</p>

1	2	3
Производные янтарной кислоты		
<p>Этилметилгидроксипиридина сукцинат (Ethylmethylhydroxypyridine succinate)</p>   <p><i>2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат</i></p>	<p>Астрокс Медомекси Мексидант Мексикор Мексидол Мексипридол Мексиприм Мексифин Метостабил Нейрокс Нейрокард Проинин Церекард</p>	<p>1 – антиоксидантное, ноотропное, церебропротективное, адаптогенное, анксиолитическое 2 – раствор для в/в и в/м введения 50 мг/мл; таблетки, покрытые пленочной оболочкой 125 мг; капсулы 100 мг</p>
<p>Ацетиламиноянтарная кислота (Acetylaminosuccinic acid)</p>  <p><i>2-ацетамидобутандионовая кислота</i></p>	<p>Когитум</p>	<p>1 – стабилизирует процессы нервной регуляции, обладает ноотропной и некоторой психостимулирующей активностью 2 – раствор для приема внутрь 25 мг/мл</p>

СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ПРОЕКТ ФАРМАКОПЕЙНОЙ СТАТЬИ

[Заявитель регистрации]

[Владелец]

VMA-10-13

Субстанция

3-[2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил]-хинозолин-4(3*H*)-он

Настоящий проект фармакопейной статьи предприятия распространяется на лекарственное средство VMA-10-13, субстанция

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ**ФАСОВЩИК****УПАКОВЩИК****ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА****ЗАЯВИТЕЛЬ (_____)**

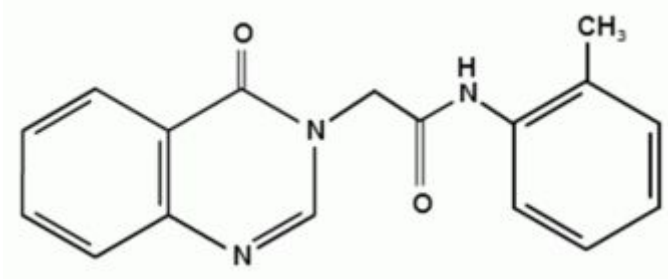
СПЕЦИФИКАЦИЯ
на VMA-10-13, субстанцию

Показатели	Метод контроля	Норма
Описание	Визуальный	Аморфный порошок белого цвета с розоватым оттенком, со специфическим запахом
Растворимость	ГФ XIV, том 1, ОФС 1.2.1.0005.15	Очень мало растворим в воде, мало растворим в спирте 96%, практически нерастворим в хлороформе
Подлинность	ИК-спектроскопия	Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 см ⁻¹ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца.
	УФ-спектроскопия	Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,001% раствора субстанции в спирте 96 % в области длин волн от 210 до 350 нм должен иметь максимумы поглощения при 226±2 нм, 265±2 нм, 302±2 нм и 313±2 нм.
	Качественная реакция с раствором аммония ванадата 0,5 % в серной кислоте концентрированной	Должно появляться малиновое окрашивание
	Качественная реакция с раствором серебра нитрата 2%	Должен образовываться творожистый осадок белого цвета
Температура плавления	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0011.18	От 257 до 261 °С (с разложением)
Кислотность или щелочность	Титриметрия	Не более 0,1 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида Не более 0,1 мл 0,01 М раствора лористоводородной кислоты
Родственные примеси	ВЭЖХ	Примесь незамещенного хиназолин-4(3H)-она – не более 0,1%

Остаточные органические растворители	ГХ	Диметилформамид – не более 0,088% (880 ppm.)
Хлориды	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.2.2.0009.15	Не более 0,01%
Сульфатная зола и тяжелые металлы	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.2.2.0014.15 ОФС.1.2.2.2.0012.15	Сульфатная зола - не более 0,1 %; Тяжелые металлы - не более 0,001%
Потеря в массе при высушивании	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0010.15	Не более 0,5%.
Микробиологическая чистота	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.4.0002.18	Категория 2.2
Количественное определение	Неводное титрование	Не менее 98,0 % и не более 102,0% (в пересчете на сухое вещество)
	УФ-спектроскопия	
Упаковка	Согласно ФСП	
Маркировка	Согласно ФСП	
Хранение	В защищенном от света месте, при температуре не выше 30°C.	
Срок годности	2 года	

Химическое название: 3-[2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил] - хинозолин-4(3H)-он

Структурная формула:



Эмпирическая формула: C₁₇H₁₅N₃O₂

Молекулярная масса: 293,33

Препарат содержит не менее 98,0 и не более 102,0 % в пересчете на сухое вещество.

Описание. Аморфный порошок белого цвета с розоватым оттенком, со специфическим запахом.

Растворимость. Очень мало растворим в воде, мало растворим в спирте 96 %, умеренно растворим в диметилформамиде, практически нерастворим в хлороформе и ацетоне (ГФ XIV, том 1, ОФС 1.2.1.0005.15).

Подлинность. 1. *ИК-спектр.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в диске с калия бромидом, в области частот от 4000 до 400 см⁻¹ по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца.

2. *УФ-спектр.* Ультрафиолетовый спектр поглощения 0,001% раствора субстанции в спирте 96 % в области длин волн от 210 до 350 нм должен иметь максимумы поглощения при 226±2 нм, 265±2 нм, 302±2 нм и 313±2 нм.

Примечание. Приготовление 0,001% раствора субстанции: 0,05 г субстанции (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 50 мл спирта 96%, помещают на ультразвуковую баню на 15 мин, доводят объем раствора тем же растворителем до метки. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем до метки спиртом 96%.

3. *Качественная реакция.* 0,01 г субстанции помещают в фарфоровую чашку и добавляют одну каплю раствора аммония ванадата 0,5 % в серной кислоте концентрированной; должно появиться малиновое окрашивание.

4. *Качественная реакция.* 0,05 г субстанции растворяют в 10 мл диметилсульфоксида, прибавляют 1 мл раствора серебра нитрата 2%; должен образовываться творожистый осадок белого цвета.

Температура плавления. От 257 до 261 °С (с разложением) (ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0011.18).

Кислотность или щелочность. К 1,5 г субстанции прибавляют 30 мл воды очищенной, свободной от углерода диоксида, взбалтывают в течение 15

мин и фильтруют. К 20 мл фильтрата прибавляют 0,05 мл 0,1 % раствора фенолового красного. При появлении желтого окрашивания оно должно измениться на красное при прибавлении не более 0,1 мл 0,01 М раствора натрия гидроксида. При появлении красного окрашивания оно должно измениться на желтое при прибавлении не более 0,1 мл 0,01 М раствора хлористоводородной кислоты.

Родственные примеси. Испытание проводят методом ВЭЖХ.

Испытуемый раствор: около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 96% и обрабатывают ультразвуком в течение 15 минут, объем раствора доводят тем же растворителем до метки и перемешивают.

Раствор стандартного образца примеси: около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 96%, обрабатывают ультразвуком в течение 15 минут, объем раствора доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят до метки спиртом 96% и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят до метки спиртом 96% и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы: 0,005 г субстанции и 0,005 г стандартного образца примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 96%, обрабатывают ультразвуком в течение 15 минут, объем раствора доводят тем же растворителем до метки и перемешивают.

Хроматографические условия:

- колонка LunaC-18, 4,6*150 мм с размером частиц 5 мкм;
- подвижная фаза: ацетонитрил (А) - кислота фосфорная 0,05М (Б);
- режим элюирования:

- от 0-6 мин 10 % подвижной фазы А – 90 % подвижной фазы Б;
- от 6-12 мин 40 % подвижной фазы А и 60 % подвижной фазы Б;
- от 12-20 мин 90 % подвижной фазы А и 10 % подвижной фазы Б;
- скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл;
- детектор - спектрофотометрический;
- длина волны детектирования 226 нм;
- температура колонки – (25±2) °С;

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются условия теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографируют раствор стандартного образца примеси и испытуемый раствор.

Содержание примеси незамещенного хиназолин-4(3Н)-она X (%) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_o \cdot 250 \cdot 1 \cdot 1 \cdot 100}{S_o \cdot a \cdot 100 \cdot 50 \cdot 50} = \frac{S \cdot a_o}{S_o \cdot a \cdot 10}$$

S – площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

S_o – площадь пика незамещенного хиназолин-4(3Н)-она на хроматограмме раствора стандартного образца примеси;

a – масса навески испытуемой субстанции, г;

a_o – масса навески стандартного образца примеси незамещенного хиназолин-4(3Н)-она, г.

Содержание примеси незамещенного хиназолин-4(3Н)-она должно быть не более 0,1%.

Примечание. Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- порядок выхода пиков на хроматограмме: незамещенный хиназолин- 4(3Н)-он и VMA-10-13;

- разрешение между пиками незамещенного хиназолин-4(3H)-она и VMA-10-13 должно быть не менее 2,0;
- фактор асимметрии пиков VMA-10-13 и незамещенного хиназолин-4(3H)-она должен быть не более 1,5.

Остаточные органические растворители. Испытание проводят методом ГХ.

Испытуемый раствор: около 0,5 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 5 мл воды для жидкостной хроматографии и обрабатывают ультразвуком в течение 15 минут, объем раствора доводят тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют.

Стандартный раствор: около 1 г (точная навеска) стандартного образца N,N-диметилформамида помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, растворяют в воде для жидкостной хроматографии, объем раствора доводят до метки тем же растворителем и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки водой и перемешивают.

По 1 мл каждого раствора переносят во флакон, далее флакон помещают в герметичный патрон для парафазного анализа. Патрон с пробой термостатируют при температуре термостата 85°C в течение 7 минут и хроматографируют при следующих условиях:

- колонка насадочная длиной 2 м из нержавеющей стали, носитель твердый хроматон N=AW [34]. Неподвижная жидкая фаза FFAP в количестве 10% от веса хроматона – 0,315 мм, внутренний диаметр 3 мм;
- газ носитель – азот (ОСЧ);
- скорость потока 30,5 см³/мин;
- объем вводимой пробы 1 мл;
- температура термостата приставки АРП 85 °С;
- температура колонки 175 °С;

- температура испарителя 150 °С;
- температура детектора 200 °С.

Содержание диметилформамида X (ppm) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_o \cdot 10}{S_o \cdot a \cdot 200 \cdot 100} \cdot 10^6$$

S – площадь пика диметилформамида на хроматограмме испытуемого раствора;

S_o – площадь пика диметилформамида на хроматограмме стандартного раствора;

a – масса навески испытуемой субстанции, г;

a_o – масса навески стандартного образца, г.

Содержание диметилформамида должно быть не более 880 ppm. (0,088 %).

Хлориды. Не более 0,01 % (ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.2.2.0009.15).

0,4 г субстанции взбалтывают с 20 мл воды в течение 10 минут и фильтруют через двойной бумажный фильтр, отбрасывая первые 5 мл фильтрата. 10 мл фильтрата должны выдерживать испытание на хлориды.

Сульфатная зола. Не более 0,1 % (ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.2.2.0014.15). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

Тяжелые металлы. Не более 0,001 %. (ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.2.2.0012.15). Определение проводят в соответствии с требованиями ОФС «Тяжёлые металлы» в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции (ОФС «Сульфатная зола»).

Потеря в массе при высушивании. Не более 0,5 % (ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.0010.15, способ 1). Для определения используют около 0,5 г (точная навеска) субстанции.

Микробиологическая чистота. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.4.0002.18.

Количественное определение.

1. Метод кислотно-основного титрования в неводных растворителях (ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.3.0014.15).

Около 0,2 г (точная навеска) субстанции растворяют в 1 мл муравьиной кислоты, прибавляют 30 мл уксусного ангидрида и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты. Конечную точку титрования определяют потенциометрически.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 29,33 мг $C_{17}H_{15}N_3O_2$.

2. Альтернативная методика.

Метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой области (ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.1.0003.15).

Около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 96% и обрабатывают ультразвуком в течение 15 минут, доводят объём раствора этим же растворителем до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объём раствора до метки спиртом 96% и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 265 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96%.

Содержание VMA-10-13 в субстанции в пересчете на сухое вещество в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{334,5 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

a - навеска субстанции, г;

W - потеря в массе при высушивании, %;

334,5 - удельный показатель поглощения VMA-10-13.

Упаковка.

Маркировка.

Хранение. В защищенном от света месте, при температуре не выше 30°C.

Срок годности. 2 года.

Примечание. Реактивы, титрованные растворы и индикаторы, приведенные в настоящем проекте фармакопейной статьи предприятия, описаны в соответствующих разделах Государственной Фармакопеи XIV издания.

СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**ПРОЕКТ ФАРМАКОПЕЙНОЙ СТАТЬИ**

[Заявитель регистрации]

[Владелец]

«Хиназотроп», таблетки 25 мг

3- [2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил]-хинозолин-4(3H)- он

Настоящий проект фармакопейной статьи предприятия распространяется на «Хиназотроп», таблетки 25 мг, планируемые для применения в качестве лекарственного средства.

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ**ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)****УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ/ТРЕТИЧНАЯ УПАКОВКА)****ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА****ЗАЯВИТЕЛЬ (в ФГУ «НЦ ЭСМП»)**

СПЕЦИФИКАЦИЯ
на «Хиназотроп», таблетки 25 мг

Показатели	Метод контроля	Норма
Описание	Визуальный	Таблетки розоватого цвета, двояковыпуклые с риской
Подлинность	УФ-спектроскопия	Ультрафиолетовый спектр поглощения раствора препарата должен иметь максимум поглощения при 265 ± 2 нм, 302 ± 2 нм и 313 ± 2 нм
	ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца VMA-10-13
Средняя масса и однородность массы	ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.2.0009.15	Средняя масса: 185 - 215 мг 18/20: $\pm 7,5\%$ 2/20: $\pm 15\%$
Распадаемость	ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.2.0013.15	Не более 15 мин
Растворение	УФ-спектрофотометрия ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.2.0014.15	Для 6 таблеток - не менее $75+5\%$ от заявленного количества за 45 мин
Родственные примеси	ВЭЖХ	Примесь незамещенного хиназолин-4(3H)-она – не более 0,1%
Однородность дозирования	УФ-спектрофотометрия ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.2.0008.18	Должно выполняться условие $AV < 15$ при $n = 10$ или 30
Микробиологическая чистота	ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.4.0002.18	Категория 3А
Количественное определение	УФ-спектрофотометрия	От 23,75 до 26,25 мг, считая на среднюю массу одной таблетки
	ВЭЖХ	
Упаковка	Согласно с ОФС.1.1.0025.18	
Маркировка	Согласно с ОФС.1.1.0025.18	
Хранение	В защищенном от света месте, при температуре не выше 30°C .	
Срок годности	2 года	

Состав:

Каждая таблетка содержит (мг/таблетку):

Активное вещество:

VMA-10-13

3-[2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил] - хинозолин-4(3H)-он 25 мг

Вспомогательные вещества:

Полиэтиленгликоль – ПЭГ-6000 50 мг

Кальция гидрофосфата дигидрат 120 мг

Полипласдон XL-10 5 мг

Описание. Таблетки розоватого цвета, двояковыпуклые с риской.

Подлинность. 1. *УФ-спектр.* Ультрафиолетовый спектр поглощения раствора препарата в спирте 96 % в области длин волн от 240 до 340 нм должен иметь максимумы поглощения при 265 ± 2 нм, 302 ± 2 нм и 313 ± 2 нм.

Примечание. Приготовление испытуемого раствора: около 0,4 г (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 96%, помещают на ультразвуковую баню на 15 мин, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм.

1 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки спиртом 96% и перемешивают.

2. *ВЭЖХ.* Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика VMA-10-13 на хроматограмме раствора стандартного образца.

Определение проводится одновременно с тестом «количественное определение».

Средняя масса и однородность массы. 200 мг $\pm 7,5\%$ (ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.2.0009.15).

Распадаемость. Не более 15 минут (ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.2.0013.15).

Растворение. Испытание проводят в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0014.15 на приборе «Вращающаяся корзинка», среда растворения - 500 мл воды очищенной, температура среды растворения - $37 \pm 0,5$ °С, скорость вращения мешалки - 100 об/мин \pm 4%. Испытание проводят на 6 единицах таблеток.

Для испытания в каждый из сосудов прибора «Вращающаяся корзинка» помещают по одной таблетке. Через 45 минут из каждого сосуда отбирают по 15 мл раствора фильтруют через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 5 мл фильтрата. 4 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят до метки водой очищенной и перемешивают (испытуемый раствор).

Измеряют спектры поглощения испытуемого и стандартного растворов на регистрирующем спектрофотометре в диапазоне 210-280 нм и рассчитывают их вторые производные ($A'' = (d^2A/d\lambda^2) \cdot 10^2$) при 265 нм.

Количество VMA-10-13, перешедшее в раствор (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A'' \cdot a_o \cdot 500 \cdot 10 \cdot 2}{A''_o \cdot 0,025 \cdot 4 \cdot 100 \cdot 50} \cdot 100 = \frac{A'' \cdot a_o}{A''_o \cdot 0,025 \cdot 2} \cdot 100$$

A'' – вторая производная испытуемого раствора при 265 нм;

A''_o – вторая производная раствора стандартного образца при 265 нм;

0,025 – содержание VMA-10-13 в одной таблетке, г;

a_o - масса навески стандартного образца VMA-10-13, г.

В раствор через 45 мин должно перейти не менее 75+5% от заявленного количества VMA-10-13.

Примечание. Приготовление стандартного раствора: 0,05 г стандартного образца VMA-10-13 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 96%, помещают на ультразвуковую баню до полного растворения, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

2 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят до метки водой очищенной и перемешивают.

Родственные примеси. Испытание проводят методом ВЭЖХ.

Испытуемый раствор: около 0,4 г (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта 96%, помещают на ультразвуковую баню на 15 мин, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм.

Раствор стандартного образца примеси: около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца примеси незамещенного хиназолин-4(3Н)-она помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 96%, обрабатывают ультразвуком в течение 15 минут, объем раствора доводят тем же растворителем до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки спиртом 96%. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки спиртом 96%.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы: 0,005 г субстанции и 0,005 г стандартного образца примеси незамещенного хиназолин-4(3Н)-она помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 96%, обрабатывают ультразвуком в течение 15 минут, объем раствора доводят тем же растворителем до метки и перемешивают.

Хроматографические условия:

- колонка LunaC-18, 4,6*150 мм с размером частиц 5 мкм;
- подвижная фаза: ацетонитрил (А) - кислота фосфорная 0,05М (Б);
- режим элюирования:
 - от 0-6 мин 10 % подвижной фазы А – 90 % подвижной фазы Б;
 - от 6-12 мин 40 % подвижной фазы А и 60 % подвижной фазы Б;
 - от 12-20 мин 90 % подвижной фазы А и 10 % подвижной фазы Б;

- скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл;
- детектор - спектрофотометрический;
- длина волны детектирования 226 нм;
- температура колонки – (25±2) °С.

Хроматографируют раствор для проверки пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются условия теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографируют раствор стандартного образца примеси и испытуемый раствор.

Содержание примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она X (%) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_o \cdot 250 \cdot 1 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{S_o \cdot a \cdot 100 \cdot 50 \cdot 50 \cdot b} = \frac{S \cdot a_o \cdot P}{S_o \cdot a \cdot 10 \cdot b}$$

S - площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

S_o - площадь пика незамещенного хиназолин-4(3H)-она на хроматограмме раствора стандартного образца примеси;

a - масса навески порошка растертых таблеток, г;

a_o - масса навески стандартного образца примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она, г;

b - содержание VMA-10-13 в одной таблетке, мг;

P - средняя масса одной таблетки, мг.

Содержание примеси незамещенного хиназолин-4(3H)-она должно быть не более 0,1%.

Примечание. Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- порядок выхода пиков на хроматограмме: незамещенный хиназолин- 4(3H)-он – VMA-10-13;
- разрешение между пиками незамещенного

хиназолин-4(3Н)-она и VMA-10-13 должно быть не менее 2,0;
 - коэффициент асимметрии пиков VMA-10-13 и незамещенного хиназолин-4(3Н)-она должен быть не более 1,5.

Однородность дозирования. Испытание проводят методом УФ- спектрофотометрии в соответствии с требованиями ОФС.1.4.2.0008.18.

Испытуемый раствор: одну таблетку помещают в фарфоровую ступку, тщательно растирают с 2 мл смеси: спирт 96% – вода (1:1) и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл спирта 96%, помещают на ультразвуковую баню на 15 мин, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. 2 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки спиртом 96% и перемешивают.

Раствор стандартного образца: около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца VMA-10-13 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в достаточном объеме спирта 96% и доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки спиртом 96% и перемешивают.

Измеряют спектры поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца на регистрирующем спектрофотометре в диапазоне 250-280 нм и рассчитывают их вторые производные ($A'' = (d^2A/d\lambda^2) \cdot 10^2$) при 265 нм.

Содержание VMA-10-13 в одной таблетке (X) в миллиграммах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A'' \cdot a_o}{A''_o \cdot 2}$$

A'' – вторая производная спектра испытуемого раствора при 265 нм;

A''_o – вторая производная спектра раствора стандартного образца при 265 нм;

a_o - масса навески стандартного образца, г.

Содержание VMA-10-13 в каждой таблетке, подвергнутой испытанию, должно отвечать требованиям ГФ XIV, том 2, ОФС.1.4.2.0008.18.

Микробиологическая чистота. Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.4.0002.18.

Количественное определение.

1. Метод ВЭЖХ (ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.2.0005.15).

Испытуемый раствор: около 0,2 г (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта 96%, помещают на ультразвуковую баню на 15 мин, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. 2 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора до метки спиртом 96% и перемешивают.

Раствор стандартного образца: 0,05 г (точная навеска) стандартного образца VMA-10-13 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96%, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора до метки спиртом 96% и перемешивают.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются условия теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографируют по 20 мкл раствора стандартного образца и испытуемого раствора и определяют площади пиков.

Содержание VMA-10-13 в одной таблетке (X) в миллиграммах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_o \cdot P}{S_o \cdot a \cdot 2}$$

S – площадь пика VMA-10-13 в испытуемом растворе;

S_o – площадь пика VMA-10-13 в растворе стандартного образца;

a – масса навески порошка растертых таблеток, г;

a_o – масса навески стандартного образца, г;

P – средняя масса одной таблетки, мг.

Содержание VMA-10-13 в одной таблетке должно быть от 23,75 до 26,25 мг ($25 \text{ мг} \pm 5\%$).

Примечание. Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- относительное стандартное отклонение площади пика VMA-10-13, рассчитанное по шести последовательным хроматограммам раствора стандартного образца, не должно превышать 2,0 %;

- коэффициент асимметрии пика VMA-10-13 должен быть не более 1,5;

- эффективность хроматографической колонки рассчитанная по пику VMA-10-13 раствора стандартного образца, должна быть не менее 1500 теоретических тарелок.

2. Альтернативная методика.

Метод спектрофотометрии в ультрафиолетовой области (ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.1.1.0003.15).

Испытуемый раствор: около 0,4 г (точная навеска) порошка растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл спирта 96%, помещают на ультразвуковую баню на 15 мин, доводят объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через фильтр «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. 1 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки спиртом 96% и перемешивают.

Раствор стандартного образца: около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца VMA-10-13 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в достаточном объеме спирта 96% и доводят объем

раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки спиртом 96% и перемешивают.

Измеряют спектры поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца на регистрирующем спектрофотометре в диапазоне 250-280 нм и рассчитывают их вторые производные ($A'' = (d^2A/d\lambda^2) \cdot 10^2$) при 265 нм.

Содержание VMA-10-13 в одной таблетке (X) в миллиграммах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A'' \cdot a_o \cdot P}{A''_o \cdot a}$$

A'' – вторая производная спектра испытуемого раствора при 265 нм;

A''_o – вторая производная спектра раствора стандартного образца при 265 нм;

a – масса навески порошка растертых таблеток, г;

a_o – масса навески стандартного образца, г;

P – средняя масса одной таблетки, мг.

Содержание VMA-10-13 в одной таблетке должно быть от 23,75 до 26,25 мг (25 мг \pm 5%).

Упаковка. Согласно с ОФС.1.1.0025.18

Маркировка. Согласно с ОФС.1.1.0025.18

Хранение. В защищенном от света месте, при температуре не выше 30°C.

Срок годности. 2 года.

Примечание. Реактивы, титрованные растворы и индикаторы, приведенные в настоящем проекте фармакопейной статьи предприятия, описаны в соответствующих разделах Государственной Фармакопеи XIV издания.

УТВЕРЖДАЮ
 Директор НИИ фармакологии
 ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России,
 академия РАН



В.И. Петров

2018г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научных исследований по разработке
 проекта ФС на субстанцию VMA-10-13

3-[2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил]-хинозолин-4(3H)-он

Наименование разработки. Проект фармакопейной статьи на субстанцию VMA-10-13 (3-[2-(2-Метилфениламино)-2-оксоэтил]-хинозолин-4(3H)-он).

Проект внедрения. Методики постадийного контроля производства и методики стандартизации субстанции VMA-10-13.

Место разработки ФС. Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России (ПМФИ - филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России), кафедра фармацевтической и токсикологической химии.

Разработчики ФС. Волокитина Д.С., аспирант заочной формы обучения кафедры фармацевтической и токсикологической химии; Лазарян Д.С., заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, профессор; Волокитин С.В., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии.

Цель внедрения. Обеспечение надлежащего контроля производства субстанции VMA-10-13, создание нормативных документов для стандартизации субстанции в виде фармакопейной статьи «VMA-10-13, субстанция».

Результаты внедрения. Разработанные методики анализа субстанции VMA-10-13, оформленные в виде проекта нормативной документации (ФС), нашли применение в анализе и используются в аналитической группе химико-фармацевтического и научно-производственного отделов.

Руководитель химико-фармацевтического
 и научно-производственного отделов
 НИИ фармакологии ВолГМУ, профессор

А.А.Озеров

УТВЕРЖДАЮ
 Директор НИИ фармакологии
 ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,
 академик РАН



В.И. Петров
 «19» *декабря* 2018г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научных исследований по разработке
 проекта ФС на «Хиназотроп», таблетки 25 мг

Наименование разработки. Проект фармакопейной статьи (ФС) «Хиназотроп», таблетки 25 мг (VMA-10-13 – 25 мг).

Проект внедрения. Методики постадийного контроля производства и методики стандартизации таблеток «Хиназотроп».

Место разработки ФС. Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России (ПМФИ - филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России), кафедра фармацевтической и токсикологической химии.

Разработчики ФС. Волокитина Д.С., аспирант заочной формы обучения кафедры фармацевтической и токсикологической химии; Лазарян Д.С., заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, профессор; Волокитин С.В., доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии.

Цель внедрения. Обеспечение надлежащего контроля производства таблеток «Хиназотроп», создание нормативных документов для стандартизации таблеток «Хиназотроп» в виде фармакопейной статьи «Хиназотроп», таблетки 25 мг.

Результаты внедрения. Разработанные методики анализа таблеток «Хиназотроп», оформленные в виде проекта нормативной документации (ФС), нашли применение в анализе и используются в аналитической группе химико-фармацевтического и научно-производственного отделов.

Руководитель химико-фармацевтического
 и научно-производственного отделов
 НИИ фармакологии ВолгГМУ, профессор



А.А. Озеров

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора по научной работе
 Пятигорского медико-фармацевтического
 института - филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ
 Минздрава России

профессор  Д.А. Коновалов

2019 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов научных исследований, выполненных на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России

Наименование внедрения. Методики анализа таблеток «Хиназотроп» методом производной спектрофотометрии: «Количественное определение», «Растворение» и «Однородность дозирования».

Место разработки. ПМФИ - филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, кафедра фармацевтической и токсикологической химии.

Авторы. Аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии ПМФИ - филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России Волокитина Д.С.


Место внедрения. Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации в учебный процесс на первом и втором курсе в аспирантуре (в рамках занятий) по дисциплине Б1.В.ДВ.01.01 «Спектрофотометрические методы в анализе биологически активных веществ растительного и синтетического происхождения», по специальности 14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Форма внедрения. Результаты исследования использованы при разработке учебно-методического информационного комплекса для аспирантов по дисциплине Б1.В.ДВ.01.01 «Спектрофотометрические методы в анализе биологически активных веществ растительного и синтетического происхождения».

Заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, профессор

 Д.С. Лазарян

Начальник отдела аспирантуры и докторантуры, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии

 Л.Б. Губанова