

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**Цечёев Артур Тимурович**

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА И ИЗУЧЕНИЯ  
ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ  
АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ ИЗ ГРУППЫ ЗАМЕЩЕННЫХ  
2-АМИНОПИРРОЛОВ, ОБЛАДАЮЩЕГО ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ  
АКТИВНОСТЬЮ**

3.4.2 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:  
кандидат фармацевтических наук,  
доцент Карпенко Ю.Н.

Пермь – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Характеристика противоопухолевых средств.....	14
1.2. Биологическая активность производных 2-аминопиррола.....	17
1.3. Синтез и свойства производных 2-аминопирролкарбоновых кислот.	21
1.4. Биологическая активность производных 2-аминопирролкарбоновых кислот.....	23
1.5. Показатели и методы контроля качества фармацевтических субстанций.....	28
1.6. Использование методов УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ для определения константы ионизации ( $pK_a$ ) и коэффициента липофильности ( $\log P$ ).....	34
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1.....	38
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..	39
2.1. Объекты исследования.....	39
2.2. Реактивы и растворители.....	40
2.3. Оборудование и материалы.....	41
2.4. Методы исследования.....	43
ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ 2-АБФПК.....	45
3.1. Физические свойства.....	45
3.2. Показатели и нормы качества.....	46
3.3. Спектральные характеристики.....	48
3.4 Изучение хроматографического поведения 2-АБФПК в режиме обращенно-фазной ВЭЖХ.....	51
3.5. Изучение физико-химических характеристик 2-АБФПК, определяющих его биодоступность.....	55
3.5.1. Определение констант ионизации 2-АБФПК.....	56
3.5.2. Определение коэффициента липофильности ( $\log P$ ).....	64
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3.....	71
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА СУБСТАНЦИИ 2-АБФПК ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ «ПОДЛИННОСТЬ» И «КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ».....	73
4.1. Химические методы анализа.....	73
4.1.1 Разработка титриметрической методики количественного определения.....	73

4.1.2 Валидация титриметрической методики определения 2-АБФПК....	75
4.2 Спектрофотометрия в УФ-области.....	80
4.2.1 Разработка методики.....	80
4.2.2 Валидация методики количественного определения 2-АБФПК в субстанции методом УФ-спектрофотометрии.....	82
4.3 Высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ- детектированием.....	86
4.3.1 Разработка методики.....	86
4.3.2 Валидация методики количественного определения 2-АБФПК в субстанции методом ВЭЖХ-УФ.....	89
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4.....	94
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ РОДСТВЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ И ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ.....	96
5.1. Определение родственных примесей 2-АБФПК методом ВЭЖХ.....	96
5.1.1 Разработка методики определения родственных примесей в субстанции 2-АБФПК методом ВЭЖХ.....	96
5.1.2 Валидация методики определения родственных примесей в субстанции 2-АБФПК.....	100
5.1.3 Изучение строения неидентифицированной примеси 2-АБФПК с RRT 0,85 методом ВЭЖХ-МС/МС.....	111
5.2 Определение остаточных органических растворителей в субстанции 2-АБФПК методом ГЖХ.....	120
5.2.1 Определение этанола, диэтилового эфира, ацетонитрила.....	121
5.2.2 Определение триэтиламина.....	129
5.2.3 Определение бензола.....	135
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5.....	141
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ 2-АБФПК В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ.....	143
6.1. Определение 2-АБФПК в плазме крови.....	143
6.2. Определение 2-АБФПК в моче.....	151
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6.....	158
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	159
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	163
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	180

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

АФС – активная фармацевтическая субстанция

2-АБФПК – 2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксамид

4-БА – 4-броманилин

ГИСО – гастроинтестинальная стромальная опухоль

ЯМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса

ТСХ – тонкослойная хроматография

ГЖХ – газожидкостная хроматография

УФ – ультрафиолетовый

ГФ – государственная фармакопея

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

MRM – Multiple Reaction Monitoring (мониторинг множественных реакций)

SIM – Selected Ion Monitoring (мониторинг выбранных ионов)

APCI – Chemical Ionization at Atmospheric Pressure (химическая ионизация при атмосферном давлении)

ESI – Electrospray ionization (ионизация электроспреем)

$t_0$  – время удерживания несорбируемого вещества

$t_R$  – время удерживания

$k$  – коэффициент ёмкости (фактор удерживания)

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development (Организация экономического сотрудничества и развития)

RRT – relative retention time (нескорректированное относительное время удерживания)

$pK_a$  – константа ионизации

$A_s$  – фактор асимметрии пика

$R_s$  – разрешение

N – количество теоретических тарелок

$R^2$  – коэффициент корреляции

RSD – relative standard deviation (относительное стандартное отклонение)

SD – standard deviation (стандартное отклонение)

СО – стандартный образец

eV – электрон-вольт

мкл – микролитры

НПКО – нижний предел количественного определения

LLOQ – lower limit of quantification (нижний предел количественного определения)

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Обеспечение населения современными, эффективными и безопасными лекарственными средствами – один из главных приоритетов государственной политики Российской Федерации [Балакин, К. В. и др., 2021]. Залогом доступности качественной лекарственной помощи для потребителей является разработка отечественных инновационных препаратов, в том числе и для лечения онкологических заболеваний.

В Пермской государственной фармацевтической академии проводятся исследования, направленные на получение, изучение свойств и биологической активности производных 2-аминопиррола [Игидов Н.М. и др., 2016]. Ряд синтезированных соединений продемонстрировали цитотоксический эффект в отношении широкого спектра опухолевых клеток человека, индуцируя их гибель по механизму апоптоза [Voichuk S. et al., 2016; Зыкова С.С. и др., 2018].

Одно из наиболее активных соединений – 2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксамид (2-АБФПК) – стало кандидатом для углубленного изучения.

В связи с этим актуальным является изучение физико-химических свойств указанного соединения с целью разработки аналитических методик для оценки его качества, а также для определения в биологических средах при исследованиях фармакокинетики.

Результаты данных исследований позволят стандартизовать впервые полученную субстанцию биологически активного соединения и надлежащим образом провести дальнейшие испытания эффективности и безопасности потенциального лекарственного средства.

### **Степень разработанности темы.**

На кафедре общей и органической химии Пермской государственной фармацевтической академии профессором Игидовым Н.М. разработана

методика получения производных 2-аминопирролкарбоновых кислот (2-АПКК) на основе рециклизации функционализированных фуран-2-онов воздействием СН-нуклеофилов в присутствии основания-катализатора [Игидов Н.М. и др., 2013]. В исследованиях биологической активности производных 2-АПКК [Voichuk S. et al., 2021] установлена их способность вызывать нарушения регуляции клеточного цикла и способствовать накоплению опухолевых клеток в М-фазе, а также индуцировать разрывы ДНК. Производные 2-АПКК являются новым классом соединений, исследований в области фармацевтического анализа до настоящего времени не проводилось.

**Цель работы** – разработка аналитических методик для стандартизации субстанции нового биологически активного соединения 2-АБФПК и изучения его фармакокинетики.

**Задачи исследования:**

- изучить физико-химические свойства 2-АБФПК и определить фармакопейные показатели качества субстанции: описание, растворимость, температура плавления, потеря в массе при высушивании, вода, сульфатная зола, содержание тяжелых металлов, микробиологическая чистота.
- исследовать спектральные характеристики соединения 2-АБФПК и оценить возможность использования полученных данных для стандартизации субстанции;
- изучить хроматографическое поведение соединения в режиме обращенно-фазной ВЭЖХ;
- определить значения констант ионизации и коэффициента липофильности 2-АБФПК;
- разработать и валидировать методики контроля качества субстанции 2-АБФПК по показателям «Подлинность» и «Количественное определение» с помощью химических и физико-химических методов, провести их валидацию;

- разработать методику определения «родственных» примесей в субстанции 2-АБФПК методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, провести её валидационную оценку;
- разработать и валидировать методики контроля качества субстанции 2-АБФПК по показателю «Остаточные органические растворители» методом газожидкостной хроматографии;
- провести исследование лабораторных образцов субстанции 2-АБФПК и установить научно-обоснованные показатели и нормы качества;
- разработать и провести валидационную оценку методик количественного определения 2-АБФПК в биологических жидкостях лабораторных животных методом ВЭЖХ.

#### **Научная новизна.**

В рамках исследований по стандартизации определены основные физические константы субстанции 2-АБФПК, изучены спектральные свойства соединения методами УФ-, ИК- спектрофотометрии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса ( $^1\text{H}$ -ЯМР). Установлены константа ионизации и коэффициент липофильности 2-АБФПК.

Разработаны методики установления подлинности и количественного определения 2-АБФПК в субстанции на основе химических и физико-химических методов анализа.

Выбраны оптимальные хроматографические условия для разделения идентифицированных и неидентифицированных родственных примесей, а также остаточных органических растворителей в субстанции исследуемого соединения.

С помощью метода тандемной жидкостной хроматомасс-спектрометрии изучены процессы ионизации и фрагментации 2-АБФПК и его неидентифицированных примесей.

Предложены условия пробоподготовки и анализа 2-АБФПК в биологических жидкостях (плазме крови и моче) методом ВЭЖХ-УФ.

### **Теоретическая и практическая значимость.**

Результаты изучения физико-химических свойств, хроматографических характеристик соединения 2-АБФПК могут служить теоретической основой для разработки методик анализа других производных 2-АПМК.

На основании проведенных исследований разработаны и валидированы методики для контроля качества субстанции 2-АБФПК, установлены показатели и нормы качества, оформлен проект нормативной документации.

Высокая чувствительность и специфичность разработанных биоаналитических методик позволяют использовать их для изучения фармакокинетики 2-АБФПК на этапе доклинических исследований.

Методики оценки качества субстанции 2-АБФПК по показателям «Подлинность», «Родственные примеси», «Остаточные органические растворители», «Количественное определение» с положительной оценкой апробированы в химико-аналитической лаборатории АО «Медисорб», г. Пермь (Акт апробации от 19.02.2024 г).

Методика количественного определения биологически активного соединения 2-АБФПК в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием апробирована в лаборатории физико-химических методов анализа контрактной исследовательской организации «Парма Клиникал», г. Пермь (Акт апробации от 16.03.2024 г).

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России и используются при проведении практического занятия «Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе лекарственных средств, доклинических фармакокинетических исследованиях новых биологически активных соединений, синтезированных в Пермской фармацевтической академии, и определении биоэквивалентности» цикла «Стандартизация, подтверждение соответствия и контроль качества лекарственных средств» для преподавателей кафедр фармацевтических вузов и училищ химического,

технологического профиля, фармакогнозии и ботаники, проводимого на базе Регионального испытательного центра «Фарматест» и кафедры токсикологической химии ПГФА (Акт внедрения научных достижений в учебный процесс от 15.01.2024 г.).

Стандартизованные в соответствии с требованиями проекта НД серии субстанции 2-АБФПК переданы на кафедры токсикологической химии и фармакологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России для проведения фармакокинетических исследований соединения, активная фармацевтическая субстанция 2-АБФПК включена в перспективный план работы ПГФА по внедрению новых лекарственных средств в медицинскую практику в качестве противоопухолевого средства (Акт внедрения результатов диссертационной работы в научную деятельность академии от 10.04.2024 г.).

**Методология и методы исследования.** Методология исследования включала анализ литературных данных, оценку актуальности работы, постановку цели и задач, выполнение эксперимента по разработке и валидации аналитических и биоаналитических методик, статистическую оценку полученных результатов.

В работе был использован комплекс современных химических и физико-химических методов анализа: спектроскопия ядерного магнитного резонанса, инфракрасная спектроскопия, ультрафиолетовая спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, газожидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия.

**Положения, выносимые на защиту.**

- Результаты изучения физико-химических свойств 2-АБФПК, показатели и нормы качества субстанции.
- Результаты определения константы ионизации и коэффициента липофильности 2-АБФПК.
- Результаты разработки и валидации методик оценки качества субстанции по показателям «Подлинность» и «Количественное определение».

- Результаты исследований по разработке и валидации методики анализа «родственных примесей» в субстанции 2-АБФПК методом ВЭЖХ.
- Результаты разработки и валидации ГЖХ – методик для стандартизации субстанции 2-АБФПК по показателю «Остаточные органические растворители».
- Результаты разработки условий пробоподготовки и анализа 2-АБФПК в биологических жидкостях.

**Степень достоверности.** Достоверность исследований подтверждена объёмом экспериментальных исследований, проведённых с использованием современных информативных физико-химических методов, таких как спектрофотометрия в УФ-области, ИК-спектрометрия и высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ- и масс-спектрометрическим детектированием в соответствии с требованиями ГФ XV издания. Проведена статистическая обработка экспериментальных данных с использованием программного обеспечения «Microsoft Excel 2019» в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний».

**Апробация работы.** Основные положения и результаты работы доложены на конференциях:

- Всероссийская научно-практическая онлайн-конференция с международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы» (Самара, 2021);
- I международная научно-практическая конференция «Хроматография в химии, медицине и биологии: актуальные вопросы, достижения и инновации» (Кемерово, 2021);
- Всероссийская онлайн-конференция с международным участием «Современные проблемы фармации» (Самара, 2022);

- Научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики» (Пермь, 2022);
- XIII Всероссийская научная конференция школьников, студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2023);
- Международная научно-практическая конференция «Абу Али Ибн Сино и инновации в современной фармацевтике» (Ташкент, 2023).
- IX Международная научно – методическая конференция «Фармообразование - 2023», посвященной 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете (Воронеж, 2023);
- II Международная научно – практическая конференция «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, 2023).

**Личный вклад автора.** Все результаты эксперимента получены автором лично либо при его участии. Автором проведен весь спектр исследований, включая анализ литературы, разработку методик, статистическую обработку данных, обобщение результатов, подготовку материалов для статей и конференций.

**Связь темы диссертации с проблемным планом фармацевтических наук.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Номер государственной регистрации темы – 01.9.50 007417.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.4.2 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно п. 3 – разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

**Публикации.** Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 10 научных работах, в том числе в изданиях Перечня ВАК – 3.

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (6 глав), выводов, списка литературы, включающего 132 наименования (72 источника зарубежной литературы) и приложения. Работа изложена на 205 страницах машинописного текста, включает 57 таблиц, 62 рисунка.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

### 1.1 Характеристика противоопухолевых средств

Во всем мире наблюдается рост новых случаев онкологических заболеваний. Причинами данной тенденции являются, с одной стороны, внедрение эффективных методов раннего выявления рака, с другой стороны, старение населения, экологические и экономические причины. В 2022 г. в мире было зарегистрировано 20 млн новых случаев рака и 9,7 млн случаев смерти от онкологических заболеваний [1]. Наиболее распространенные виды рака в 2022 г. – это рак легких, рак молочной железы и колоректальный рак. В России ежегодно выявляют 625 тыс. человек с онкологическими заболеваниями.

Потребность в противоопухолевых препаратах увеличивается с каждым годом. Рынок противоопухолевых средств является одним из наиболее динамично развивающихся на фармацевтическом рынке. Так в 2020 году продажи лекарств от онкологических заболеваний принесли фармацевтическим компаниям более 157 млрд. долларов [2]. Однако, в объеме затраченных средств и объеме закупленных упаковок по итогам 2019-2021 годов и 6 месяцев 2022 года доля отечественных противоопухолевых препаратов не превышает 18% [3].

Для обеспечения национальной лекарственной безопасности стратегия развития отечественной фармацевтической отрасли «Фарма-2030» предусматривает поддержку собственных разработок в области создания инновационных лекарственных средств, в том числе противоопухолевых [4].

Так, в 2023 году по итогам успешных клинических испытаний были зарегистрированы 4 первых и российских дженерика на наиболее востребованные противоопухолевые препараты: Осимертиниб, Акситиниб, Руксолитиниб и Бозутиниб [5].

## **Классификация противоопухолевых средств**

Противоопухолевые препараты – группа лекарственных средств, направленных на подавление роста и уничтожение раковых клеток. Химиотерапия является одним из перспективных направлений медицины, активно разрабатываются новые эффективные препараты, позволяющие справляться с различными видами рака, в том числе на поздних стадиях.

В настоящее время для лечения онкологических заболеваний используются следующие группы противоопухолевых препаратов [6]:

### **1. Алкилирующие средства**

*Представители:* циклофосфамид, производные платины, темозоламид.

### **2. Антиметаболиты**

*Представители:* метотрексат, меркаптопурин, тегафур, цитарабин.

### **3. Противоопухолевые антибиотики**

*Представители:* дактиномицин, доксорубицин.

### **4. Противоопухолевые гормональные средства и антагонисты гормонов**

*Представители:* ципротерол, фулвестрант, фосфэстрол.

### **5. Растительные противоопухолевые средства**

*Представители:* винбластин, паклитаксел, этопозид.

### **6. Моноклональные антитела**

*Представители:* ритуксимаб, трастузумаб, пертузумаб, натализумаб.

### **7. Ингибиторы протеинкиназ**

*Представители:* иматиниб, дазатиниб, сунитиниб, регорафениб.

### **8. Другие**

*Представители:* аспарагиназа, гидразин, олапариб, вориностат.

У алкилирующих средств механизм действия обусловлен алкилированием структурных элементов ДНК и РНК опухолевой клетки, вследствие чего нарушается деление и репликация клеток.

Антиметаболиты, являясь близкими по химическому строению к эндогенным продуктам метаболизма, ингибируют синтез ДНК и РНК,

однако, в отличие от алкилирующих средств, являются фазоспецифичными – действуют в S-фазе клеточного цикла.

Для *противоопухолевых антибиотиков* характерны различные механизмы действия: нарушение спирализации ДНК, подавление синтеза нуклеиновых кислот, образование стойких комплексов с ДНК, что препятствует дальнейшему делению клеток. Представители этой группы являются побочными продуктами жизнедеятельности почвенных грибов, либо их синтетическими аналогами.

*Противоопухолевые гормональные средства* отличаются по механизму действия от цитотоксических противоопухолевых средств. Они восстанавливают нормальную гуморальную регуляцию функций клеток. *Антагонисты гормонов* эффективны при гормонозависимых опухолях, так как они подавляют физиологическую активность естественных гормонов и таким образом тормозят стимулируемый ими рост опухоли.

*Противоопухолевые средства растительного происхождения* представляют собой алкалоиды, выделенные из растительного сырья. Это фазоспецифичные средства, они действуют либо на микротрубочки клетки (таксаны), либо ингибируют топоизомеразы (этопозид).

*Моноклональные антитела* в противоопухолевой терапии используются либо для доставки лекарственных препаратов к опухолевым клеткам, либо для специфичного воздействия на рецептор или лиганд опухолевой клетки.

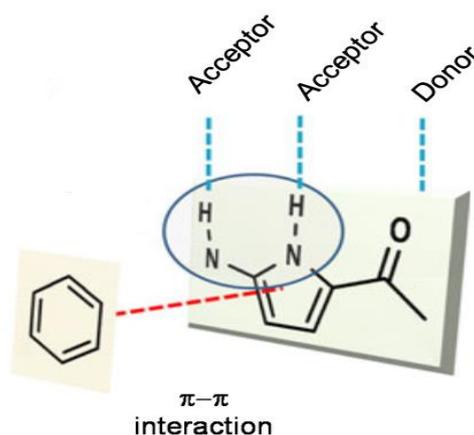
*Ингибиторы протеинкиназ* воздействуют на ферменты, которые модифицируют другие белки путем фосфорилирования аминокислотных остатков. Ингибирование протеинкиназ снижает способность опухолевых клеток избегать действия противоопухолевых препаратов, а также повышает чувствительность злокачественных образований к ним.

## 1.2 Биологическая активность производных 2-аминопиррола

Гетероцикл пиррол является компонентом разнообразных биологически активных соединений [7]. К природным соединениям, содержащим пиррольное кольцо, относятся порфирины, являющиеся составной частью гемсодержащих белков (гемоглобина, миоглобина, цитохромов, каталазы), хлорофилла, витамина В12, а также пигментов желчи [8].

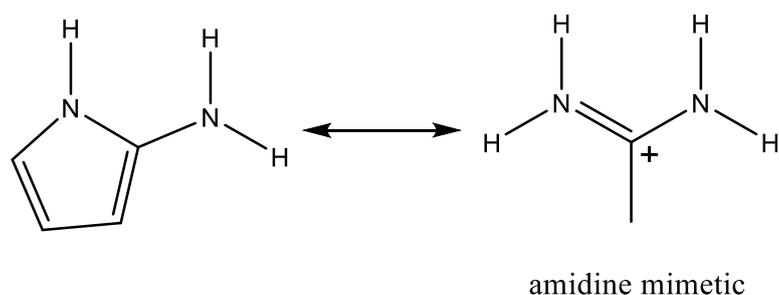
Синтетические производные пиррола проявляют различные виды биологической активности: обладают противовоспалительными [9], цитотоксическими свойствами [10], снижают уровень холестерина [11].

Пространственная структура 2-аминопиррола является плоской, что способствует проникновению в узкие и глубокие карманы белков – мишеней (рис. 1.1):



**Рис. 1.1 – Плоская структура 2-аминопиррольного фрагмента [12]**

2-аминопирролы содержат фрагмент амидина, характеризующегося пониженной основностью (рис. 1.2), более высокой делокализацией электронов, что обеспечивает лучшее проникновение через биологические мембраны [12]:



**Рис. 1.2 – Структурное сходство 2-аминопиррола с амидами**

Соединения, содержащие 2-аминопиррольный фрагмент, обладают широким спектром биологической активности (таблица 1.1).

В патенте [13] описаны производные индола, обладающие ингибирующей активностью в отношении ИКК киназы  $\beta$  - фермента, участвующего в распространении клеточного ответа на воспаление. Авторы отмечают, что синтезированные соединения могут найти применение в качестве профилактического или терапевтического средства в случае развития аутоиммунных, аллергических, инфекционных и других заболеваний, связанных с воспалительными процессами.

Некоторые аминопирролы обладают антибактериальной активностью. Например, индийскими учеными были получены пирролопиридины, обладающие высокой антибактериальной активностью в отношении *S.aureus*, *B.substilis*, *E.coli* и *S.typhi*, в сравнении со стандартом ампициллином [14]. Отмечена умеренная фунгицидная активность в отношении *C.albicans*. В исследовании [15] продемонстрирована ингибирующая активность ряда 2-аминопирролов в отношении металло- $\beta$ -лактамаз – ферментов, обуславливающих устойчивость микроорганизмов к бета-лактамам антибиотикам.

В работе [16] показана анальгетическая активность 2-аминопирролов на уровне, превышающем препараты сравнения Ортофен и Метамизол натрия. Полученные соединения оказались значительно менее токсичными, чем препарат сравнения Ортофен.

В исследовании [17] из большого количества синтезированных производных 2-аминопиррола путем молекулярного докинга было выбрано соединение «лидер», которое эффективно ингибировало липоксигеназу 15-LOX-1, играющую ключевую роль в развитии таких заболеваний как астма, диабет, инсульт, а также болезнь Альцгеймера.

Исследователями из Японии был синтезирован 2-аминопиррол [18], ингибирующий активность афферентных тазовых нервов. Как отмечают авторы, соединение может найти применение у пожилых людей для лечения нарушений мочеиспускания.

В работе [19] описаны замещенные 2-аминопирролы, ингибирующие митоген-активируемую протеинкиназу, которая участвует в пролиферации, дифференцировке и апоптозе опухолевых клеток.

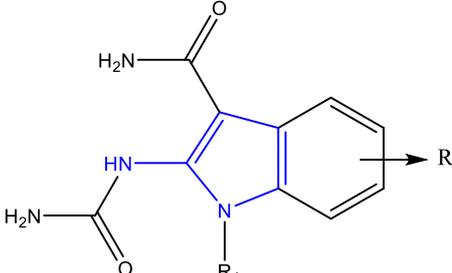
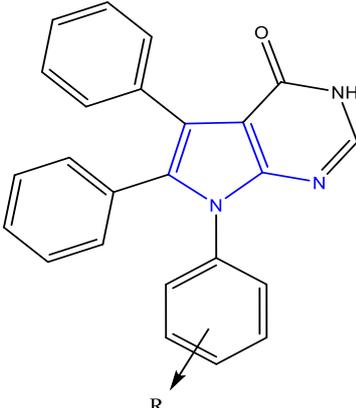
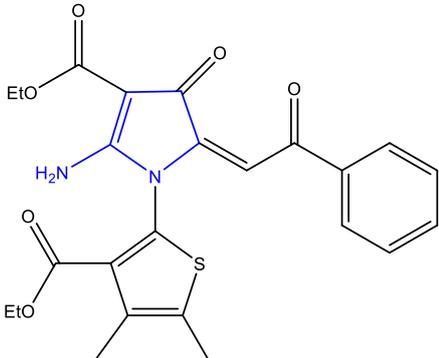
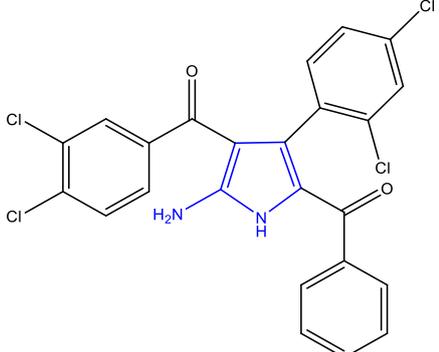
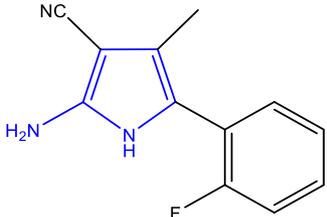
2-аминопирролы с тиаамидным заместителем в 3 положении цикла продемонстрировали противоопухолевую активность в отношении опухолей легких, груди и центральной нервной системы [20]. Авторами установлена зависимость между структурой полученных аминопирролов и их активностью, отмечено, что наиболее эффективными оказались соединения с *N*-ацетильным заместителем в 5 положении цикла.

В качестве потенциального лекарственного средства для лечения воспалительных заболеваний сетчатки предложены аминопирролы – ингибиторы интерлейкина-6 [21].

Описанные в патенте [22] 2-аминопирролы действуют на цАМФ – специфические фосфодиэстеразы, регулирующие деятельность бета-адренорецепторов, и потенциально могут быть использованы для лечения и профилактики заболеваний сердечно-сосудистой и дыхательной систем.

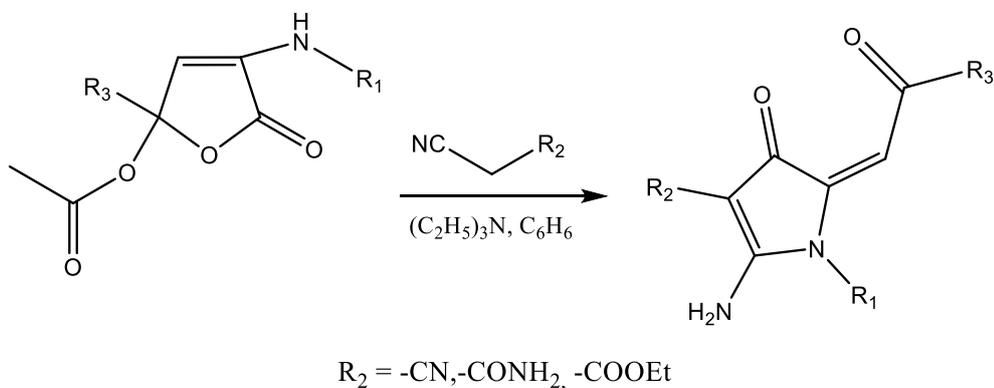
Таблица 1.1

## Виды биологической активности производных 2-аминопиррола

Вид биологической активности	Формула
Ингибитор ИКК киназы $\beta$ [13]	
Антибактериальная [14]	
Анальгетическая [16]	
Ингибитор липоксигеназы 15-LOX-1 [17]	
Ингибитор активности афферентных тазовых нервов [18]	

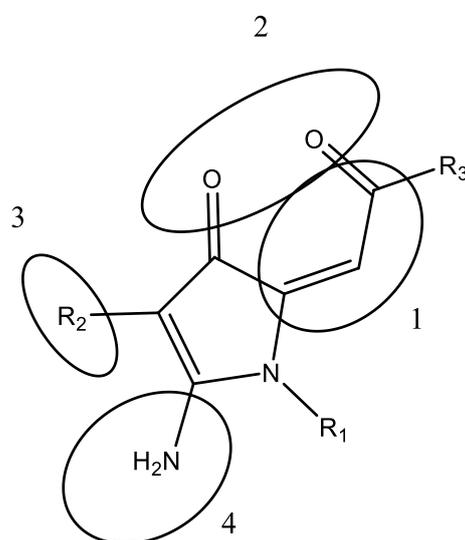


заключается в рециклизации функционализированных фуран-2-онов воздействием СН-нуклеофилов в присутствии основания-катализатора [23]. В качестве СН-нуклеофилов используются производные циануксусной кислоты (этилцианоацетат, 2-цианоацетамид) или динитрилмалоновой кислоты (рис. 1.3):



**Рис. 1.3 – Общая схема синтеза производных 2-АПКК**

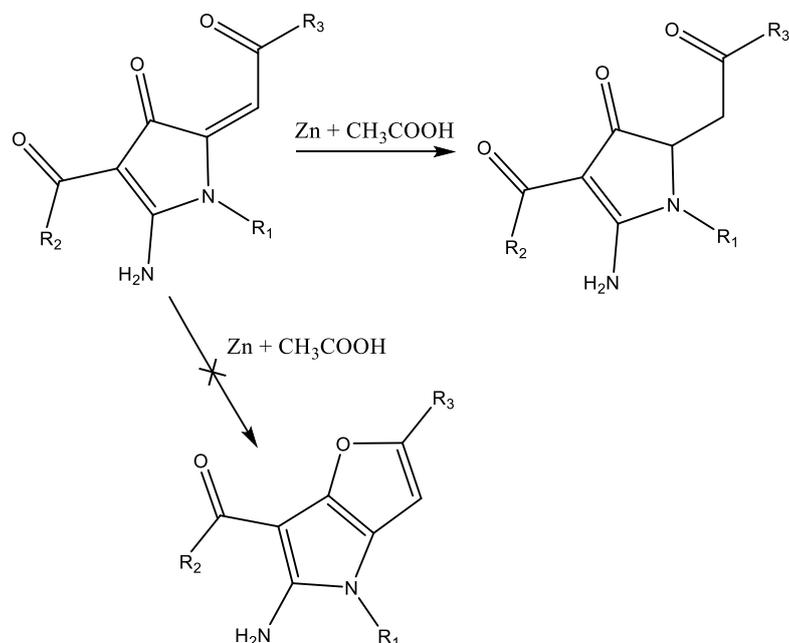
В структуре производных 2-АПКК присутствуют несколько реакционных центров (рис. 1.4), обуславливающих химические превращения этой группы соединений:



**Рис. 1.4 – Реакционные центры в структуре 2-АПКК**

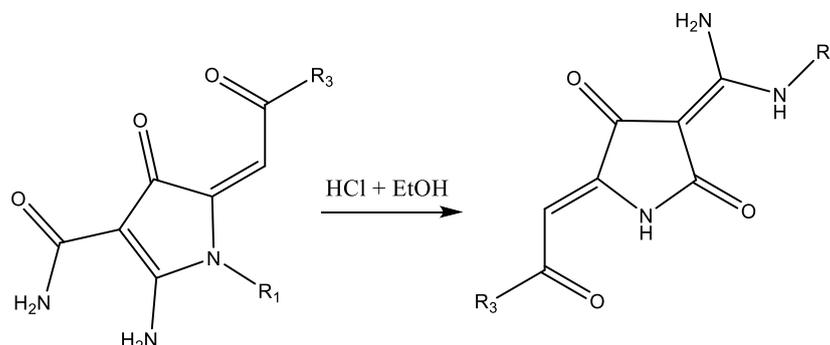
1. халконовая система с экзоциклической двойной связью
2. 1,4 – дикетоновая система
3. сложноэфирная/амидная/нитрильная группа
4. аминогруппа

Описана [24] способность экзоциклической двойной связи к реакции восстановления водородом в момент выделения (из реакции цинковой пыли с уксусной кислотой) (рис. 1.5). В данных условиях происходит только восстановление двойной связи, производные 4Н-фууро[3,2-б]-пирролов не образуются.



**Рис. 1.5 – Реакция восстановления экзоциклической двойной связи**

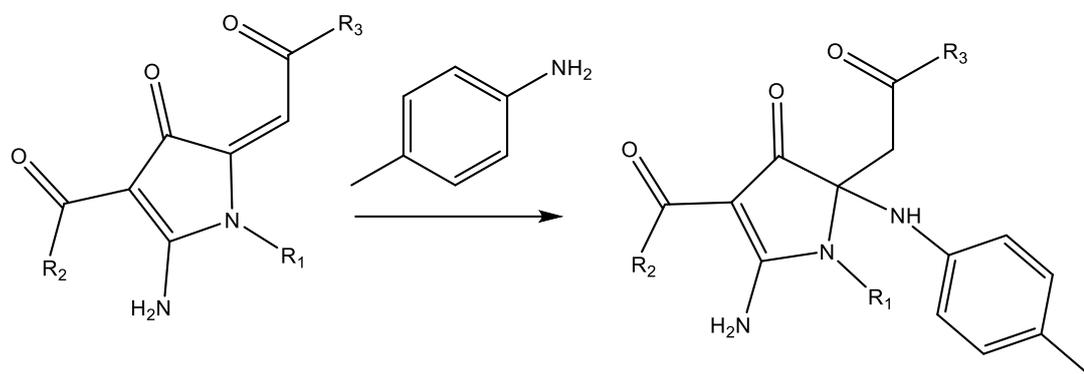
Амиды 2-АПКК способны вовлекаться во внутримолекулярную рециклизацию при нагревании в смеси с хлороводородной кислотой в среде этанола (рис. 1.6) [16]:



**Рис. 1.6 – Внутримолекулярная рециклизация производных 2-АПКК**

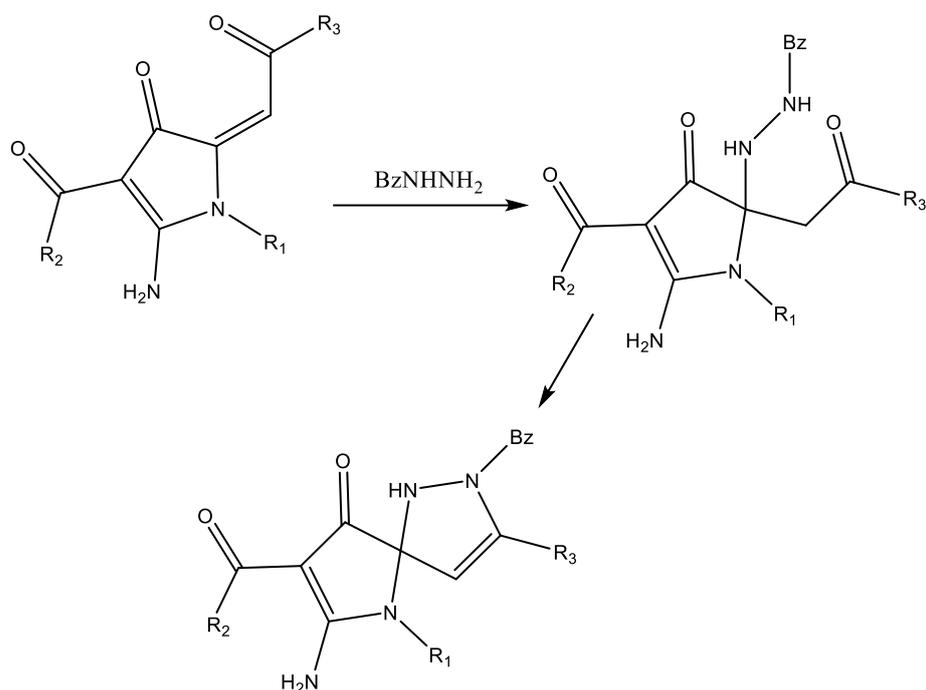
Для 2-аминопирролкарбоксамидов наиболее характерными являются реакции электрофильного присоединения ( $A_E$ ) по двойной связи [16,24]. При

взаимодействии с моноклеофилами, например, с *p*-толуидином в среде уксусной кислоты происходит только присоединение (рис. 1.7):



**Рис. 1.7 – Реакция присоединения *p*-толуидина**

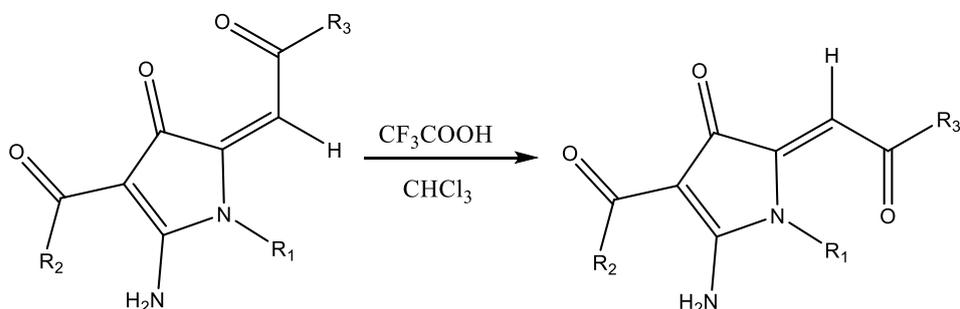
Если в реакцию вводится бинуклеофил (например, ортофенилендиамин или бензоилгидразид), то помимо присоединения может происходить дальнейшая циклизация в спиропроизводное (рис. 1.8) [16]:



**Рис. 1.8 – Реакция производных 2-АПКК с бинуклеофилами**

Для экзоциклической двойной связи 2-аминопирролкарбоксамидов характерна *E/Z* – изомерия. Основным продуктом синтеза [23,25] является *E* – изомер.

Для некоторых производных 2-аминопирролкарбоксамидов характерно превращение в *Z* – изомер под действием трифторуксусной кислоты в хлороформе при перемешивании на магнитной мешалке (рис. 1.9) [26]:



**Рис. 1.9 – Изомеризация производных 2-АПКК**

#### **1.4 Биологическая активность производных 2-аминопирролкарбоновых кислот (2-АПКК)**

Полученные профессором Игидовым Н.М. замещенные 2-аминопирролкарбоновые кислоты (2-АПКК) проявили цитотоксическую активность. В исследовании [27] продемонстрирована способность замещенного этилового эфира 2-амино-1*H*-пиррол-3-карбоновой кислоты вызывать нарушения регуляции клеточного цикла и способствовать накоплению опухолевых клеток в М-фазе, а также индуцировать разрывы ДНК, что обуславливало цитотоксическую активность по отношению к клеткам гастроинтестинальной стромальной опухоли (ГИСО).

В более поздней работе [28] было показано, что тиазолил-замещенные производные 2-АПКК проявляют противоопухолевую активность по отношению к ГИСО на уровне, превышающем активность препарата выбора для терапии ГИСО – иматиниба. Кроме того, активность замещенных 2-АПКК сохранялась и в отношении опухолевого клона ГИСО T-1Res, который был резистентен к иматинибу. Отмечена антирадикальная активность двух наиболее активных соединений этого ряда, а также низкая токсичность [29].

Помимо опухолей желудочно-кишечного тракта была показана эффективность пивалоил-замещенных 2-аминопирролов против клеток саркомы

Юинга, поражающих трубчатые кости [30]. Было установлено, что производные 2-аминопиррола индуцировали гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза.

Дальнейшие исследования продемонстрировали эффективность замещенных производных 2-АПКК по отношению к линиям клеток остеосаркомы, немелкоклеточного рака легких и клеток рака молочной железы [34].

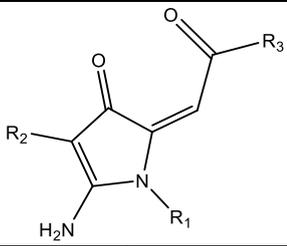
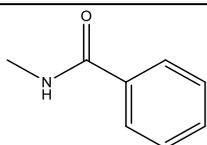
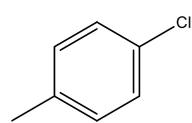
Применение молекулярного докинга в совокупности с биологическими тестами позволили установить дополнительный механизм противоопухолевого действия замещенных производных 2-АПКК. Так, исследователями было обнаружено, что для ряда веществ наблюдается способность ингибировать полимеризацию тубулина [31].

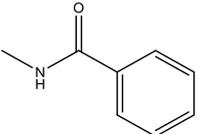
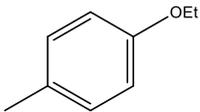
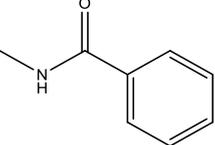
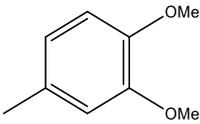
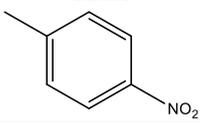
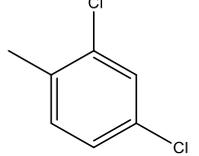
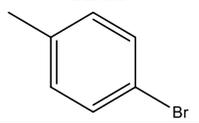
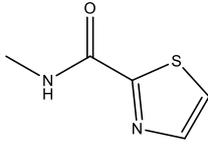
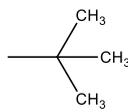
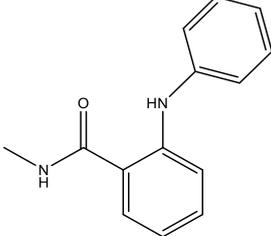
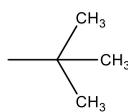
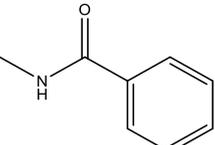
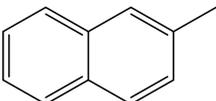
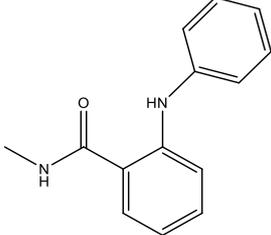
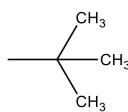
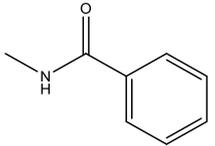
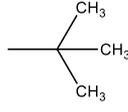
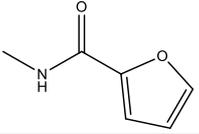
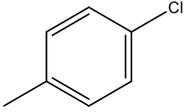
Помимо цитотоксической активности замещенные производные 2-АПКК проявляют антигипоксическую и антирадикальную активность, а также обладают некоторым противовоспалительным действием, что было подтверждено на модели каррагенинового воспаления [32].

С химической точки зрения производные 2-АПКК различаются заместителями в разных положениях цикла. Структуры замещенных 2-аминопирролов, обладающих цитотоксической активностью представлены в таблице 1.2:

**Таблица 1.2**

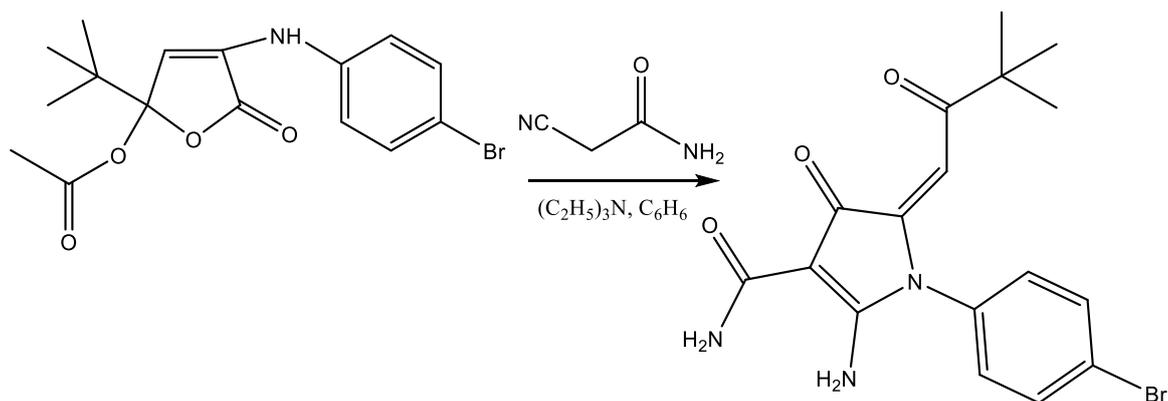
**Замещенные 2-аминопирролы,  
обладающие цитотоксической активностью**

			
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Источник
	-COOEt		[27]

	-COOEt		[33]
	-COOEt	 Или 	[32]
 Или 			[28]
	-COOEt		[34]
	-CONH <sub>2</sub>		[35]
	-CONH <sub>2</sub>		
	-CONH <sub>2</sub>		[36]
	-COOEt		[37]

Среди полученных Игидовым Н.М. производных 2-АПКК для дальнейшего изучения было выбрано одно из наиболее активных соединений – 2-АБФПК, которое продемонстрировало цитотоксический эффект в отношении широкого спектра опухолевых клеток человека (рабдомиосаркомы, ГИСО, лейкомиосаркомы). Авторами патента [38] доказано, что 2-АБФПК эффективен в отношении линий опухолевых клеток, резистентных к препаратам сравнения – паклитакселу и иматинибу мезилату. Отмечена низкая токсичность 2-АБФПК в тесте острой токсичности на лабораторных мышах – более 1000 мг/кг.

2-АБФПК образуется путём взаимодействия 4-(4-бромфениламино)-2-трет-бутил-5-оксо-2,5-дигидрофуран-2-илацетата с 2-цианоацетамидом в присутствии триэтиламина в среде бензола (рис. 1.10) [25,38].



**Рис. 1.10 – Схема получения соединения 2-АБФПК**

### 1.5 Показатели и методы контроля качества фармацевтических субстанций

Фармацевтические субстанции (ФС) – это лекарственные средства в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ, предназначенные для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяющие их эффективность [39].

#### Показатели качества

Общие требования к качеству ФС изложены в ОФС 1.1.0006, частные требования к конкретной субстанции – в соответствующем нормативном документе.

Обязательные показатели качества ФС – это описание, растворимость, подлинность, примеси и количественное определение.

Для доказательства *подлинности* используются современные физико-химические методы (спектральные, хроматографические) и специфичные качественные химические реакции. Если ФС является солью органических кислот или оснований приводятся качественные реакции на неорганические ионы. Дополнительно подлинность может быть подтверждена такими показателями как «Растворимость», «Температура плавления», «Плотность», «Удельное вращение», «Показатель преломления» и др.

Особое внимание уделяют чистоте ФС, которая оказывает значительное влияние на безопасность лекарственного препарата.

К *неспецифичным примесям* относят показатели «Сульфатная зола» и «Тяжелые металлы». Показатели «рН», «Кислотность или щелочность» позволяют обнаружить неспецифические примеси кислотного или основного характера. Неспецифичная примесь «Вода» также нормируется. Это обусловлено тем, что вода ускоряет процессы разложения ФС, также содержание влаги учитывается при расчете количественного содержания основного вещества. При оценке показателей качества «Цветность» и «Прозрачность» могут неспецифично определяться примеси, которые влияют на внешние признаки раствора ФС.

К *специфичным примесям* относят «Родственные примеси», «Остаточные органические растворители», неорганические анионы и катионы, прочие специфические примеси.

*Родственные примеси* – это технологические примеси и продукты деструкции действующего вещества, имеющие сходную с ним структуру. Основными документами, регулирующими порядок нормирования родственных примесей в фармацевтических субстанциях и препаратах, являются гармонизированное руководство ИСН [40] и ОФС «Родственные примеси» [41].

К специфичным примесям также относятся *остаточные органические растворители*, которые используются при синтезе ФС. Большинство из растворителей являются высокотоксичными соединениями, поэтому их

содержание нормируется согласно международному руководству ICH [42] и соответствующей ОФС ГФ [43].

Важный показатель качества ФС – содержание основного вещества. Методика определения данного показателя приводится в разделе *«Количественное определение»*.

К показателям микробиологического контроля относят *«Микробиологическую чистоту»* и *«Стерильность»*. Показатели *«Аномальная токсичность»*, *«Пирогенность»*, *«Бактериальные эндотоксины»* определяются для препаратов для парентерального применения.

### **Современные физико-химические методы контроля качества**

#### *УФ-спектрофотометрия*

Современный фармацевтический анализ характеризуется широким применением различных физико-химических методов, среди которых спектрофотометрия в УФ-области является одним из самых простых и доступных [44 – 46]. Данный метод может использоваться для определения подлинности, примесей и количественного содержания [47 – 52], в также в анализе комплексных препаратов без предварительного разделения компонентов [53-55].

УФ-спектрофотометрия нашла применение в анализе противоопухолевых лекарственных средств, поскольку большинство соединений имеют в своей структуре системы сопряженных двойных связей, а также ауксохромные группы, усиливающие поглощение ультрафиолетового излучения. Так, ГФ РФ XV издания рекомендует УФ-спектрофотометрию как метод подтверждения подлинности субстанции меркаптопурина [56]. Метод УФ-спектрофотометрии применяют для установления подлинности и количественного определения противоопухолевых 2-аминохроменов [57], для количественного определения индол-3-карбинола и оценки степени его высвобождения из твердой дозированной формы [58].

#### *Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)*

Высокоэффективная жидкостная хроматография занимает лидирующее место среди других инструментальных методов по темпам развития. Метод ВЭЖХ включен практически во все современные фармакопеи, в том числе в

Государственную фармакопею РФ, фармакопею США, Британскую фармакопею, фармакопею Японии [59-62], и рекомендуется для определения подлинности, количественного содержания [63], однородности дозирования, чистоты [64-65] и стабильности лекарственных средств.

В анализе противоопухолевых препаратов метод ВЭЖХ широко используется не только для оценки их качества, но и в исследованиях фармакокинетики, а также в терапевтическом лекарственном мониторинге.

Испытания методом ВЭЖХ предусмотрено практически для всех производных хлорэтиламина зарубежного производства и позволяет определить значительное количество примесей различной природы [66]. Определение подлинности и количественного определения мелфалана, хлорамбуцила, циклофосамида в таблетках и лиофилизированных лекарственных формах для приготовления раствора для инъекций также проводится методом обращенно-фазной ВЭЖХ [66].

Немаловажным преимуществом ВЭЖХ является способность количественно определять с высокой чувствительностью и точностью соединения любого химического строения и в любых матрицах. Это наиболее актуально в доклинических и клинических фармакокинетических исследованиях, подразумевающих анализ биологических матриц с очень малыми концентрациями целевых компонентов (лекарственных веществ и их метаболитов) [67-69].

При определении лекарственных веществ в плазме крови наиболее широко применяются силикагели с привитыми  $C_{18}$  и  $C_8$  фазами [70-72]. Наиболее распространенными способами детектирования является спектрофотометрическое детектирование, например, в анализе иматиниба [73], 5-фторурацила [74], темозоломида [75], стауроспорина [76], тамоксифена [77] и масс-спектрометрическое детектирование [78], особенно при анализе метаболитов лекарственных веществ [79,80] и при анализе многокомпонентных образцов [81,82].

Возможно использование флуориметрических детекторов, так при анализе противоопухолевого производного индоло[2,3-а]карбазола мидостаурина в

плазме крови мышей исследователям удалось добиться предела обнаружения в 0,5 нг/мл, а модифицировав метод, предел обнаружения был снижен в 5 раз и составил 0,1 нг/мл [83].

Метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием находит применение не только в фармацевтическом анализе, но и в контроле безопасности фармакотерапии противоопухолевыми препаратами [84].

#### *Газожидкостная хроматография (ГЖХ)*

Метод ГЖХ – основной метод определения остаточных органических растворителей в фармацевтических субстанциях [85-87]. Содержание ООР, используемых на различных стадиях синтеза и очистки АФС, нормируется в зависимости от класса токсичности [43]. При наличии растворителей класса 1 и 2 каждый из них должен быть идентифицирован и определен количественно с помощью валидированных методик. Для растворителей 3 класса не требуются дополнительные испытания, если в условиях теста «Потеря в массе при высушивании» получено значение не более 0,5%.

Для некоторых ООР анализ методом ГЖХ затруднен ввиду плохого разделения этих соединений (например, уксусной кислоты), в этом случае возможно использование дериватизации. В работе [88] представлена методика определения уксусной кислоты путем дериватизации бензилбромидом с последующим анализом методом ГХ.

Анализ диметилформаида, ацетона и метанола в субстанции противоопухолевого препарата темозоламида был проведен с использованием варианта парофазного анализа с использованием низкополярной колонки ZB-624 [89].

Вариант парофазного анализа также использовался при валидации методики определения остаточных количеств изопропилового спирта (растворитель 3 класса токсичности) в субстанции литиевой соли 2,3-дегидро-L-гулоновой кислоты, т.к. в эксперименте по определению потери в массе при высушивании было получено значение, превышающее допустимые 0,5% [90].

### *Валидация аналитических методик*

Разработка методик анализа начинается на стадиях разработки и испытаний лекарственных средств, далее они продолжают использоваться при серийном выпуске фармацевтической продукции [91,92]. Аналитические методики должны быть валидированы, т.е. должно быть экспериментально подтверждено, что разработанные методики пригодны для решения предполагаемых задач [93,94]. Валидация методик является обязательным требованием к регистрационному досье на лекарственное средство согласно требованиям как отечественных, так и зарубежных регуляторов [95,96].

Аналитические методики оцениваются по следующим валидационным характеристикам: специфичности, пределу обнаружения, пределу количественного определения, линейности, правильности, прецизионности, диапазону применения, робастности.

Валидация хроматографических методик имеет свои особенности. Обязательным тестом является проверка пригодности хроматографической системы [97,98]. Данный тест позволяет установить, что разрешение и воспроизводимость хроматографической системы адекватны для выполнения анализа. Пригодность хроматографической системы характеризуется показателями: критерий разделяющей способности хроматографической системы (коэффициент разделения пиков), коэффициент асимметрии пика, критерий воспроизводимости результатов измерений (сходимость инъекций), эффективность хроматографической колонки [99].

При оценке специфичности методики определения родственных примесей исследователям необходимо доказать, что хроматографическая система способна разделять пики основного вещества, идентифицированных и неидентифицированных примесей, возможных продуктов деградации. Для этого проводят стресс-испытания лекарственного средства, используя различные факторы, ускоряющие деструкцию (высокую температуру, повышенную влажность, воздействие кислот, щелочей, окислителей и т.д.) [96,97,100].

В процессе изучения новых биологически активных соединений – потенциальных лекарственных средств, целесообразным является разработка биоаналитических методик, позволяющих проводить фармакокинетические исследования. Такие методики также должны быть валидированы. Основными документами, регламентирующими валидацию биоаналитических методик, являются «Руководство по экспертизе лекарственных средств» [101], Решение Совета Евразийской экономической комиссии «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» [102], руководства по валидации биоаналитических методов EMA и FDA [103,104].

### **1.6 Использование методов УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ для определения константы ионизации ( $pK_a$ ) и коэффициента липофильности ( $\log P$ )**

Константа ионизации и коэффициент липофильности – общепризнанные дескрипторы, определяющие фармакокинетические свойства биологически активных веществ и их способность связываться с рецепторами [105-107].

Коэффициент липофильности характеризует распределение лекарственного вещества в организме: высокие значения  $\log P$  свидетельствуют о том, что вещество преимущественно переходит в липофильные среды организма, а низкие указывают на то, что оно может быть локализовано в гидрофильных тканях и жидкостях, например сыворотке крови [108].

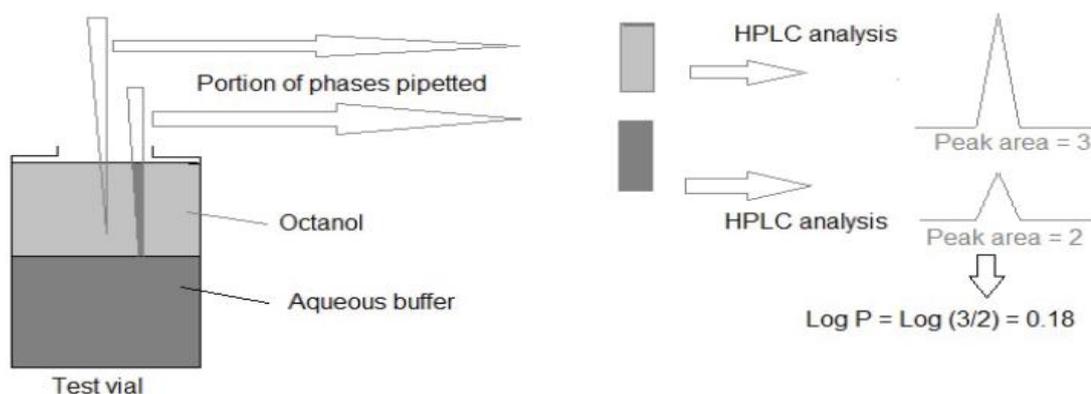
Коэффициент липофильности широко используется в установлении взаимосвязей «структура – активность», позволяющих прогнозировать биологическую активность соединений [109].

Другой константой, позволяющей прогнозировать биологическую активность и доступность лекарственных веществ, является константа ионизации. Ионизация лекарственного вещества может существенно влиять на его проникновение через биологические мембраны: чем больше в растворе

нейтральных, неионизированных молекул, тем лучше всасывание и наоборот [110].

Метод УФ-спектрофотометрии используется для определения констант ионизации, как для известных, так и для новых биологически активных соединений [111-114]. Обязательным условием использования метода УФ-спектрофотометрии является наличие хромофоров рядом с ионизирующей функциональной группой [115]. Определение рКа основано на измерении оптической плотности растворов исследуемого соединения при различных рН. Для соединений с неизвестной рКа используют весь диапазон рН. Наибольший прирост величины оптической плотности происходит при рН, соответствующем константе ионизации [116,117]. Несмотря на то, что спектрофотометрический метод определения рКа требует большего количества времени, чем потенциометрический, он незаменим при анализе соединений, которые плохо растворимы в водных растворах [118].

Использование ВЭЖХ при определении липофильности возможно в разных вариантах. Исторически первым методом определения липофильности химических веществ был метод встряхивания в колбе (Shake-flask), основанный на распределении вещества между двумя несмешивающимися растворителями. В качестве липофильной фазы используется н-октанол, в качестве гидрофильной – бидистиллированная вода. Закрепленная в руководстве OECD методика [119] предусматривает предварительное встряхивание изучаемого вещества с н-октанолом и водой вручную либо на шейкере. Разделение фаз достигается путем дальнейшего центрифугирования образцов. Количество вещества, перешедшее в водную фазу, анализируют любым удобным способом, например, с помощью ВЭЖХ [120]. Схема определения  $\log P$  методом встряхивания в колбе представлена на рис. 1.11.



**Рис. 1.11 – Схема определения log P с использованием ВЭЖХ [120]**

Метод встряхивания позволяет определить липофильность веществ,  $\log P$  которых не превышает 4, значительное влияние на результаты эксперимента оказывает способность изучаемого соединения к ионизации, а также точность отбора фаз. Метод встряхивания достаточно трудоемкий и долгий, в частности, ввиду необходимости насыщения н-октанола, имитирующего липофильную фазу, водой в течение суток [119,121].

Коэффициент липофильности может быть определен напрямую с помощью ВЭЖХ в соответствии с Руководством OECD [122], что широко используется для определения  $\log P$  у биологически активных соединений [123]. Для получения достоверных результатов требуется использование метанола в составе подвижной фазы: его содержание должно быть не менее 25% и не более 70%. Метанол имитирует органическую фазу н-октанола [124,125]. Рекомендуется использование изократического элюирования для избежания проблем с воспроизводимостью получаемых результатов.

Принцип определения  $\log P$  методом ВЭЖХ заключается в установлении взаимосвязи между временем удерживания вещества на колонке с обращенно-фазным сорбентом ( $C_8$ ,  $C_{18}$ ) и коэффициентом распределения н-октанол/вода.

Сначала производят хроматографирование референтных веществ с известной липофильностью [122,126]. Референтные соединения подбирают так, чтобы их липофильность охватывала предполагаемый интервал липофильности

исследуемого соединения, который можно определить, например, вычислительными методами [127].

По результатам хроматографирования строят график зависимости  $\log P$  от логарифмов коэффициентов удерживания ( $\log k'$ ).

Логарифм коэффициента удерживания определяется формулой [128]:

$$\log k' = \log \left( \frac{t_R - t_0}{t_0} \right)$$

$t_R$  – время удерживания исследуемого вещества,  $t_0$  – время удерживания неударживаемого компонента (например, метанол или  $\text{KNO}_3$ ).

Липофильность тестируемого соединения рассчитывается по уравнению регрессии с учетом полученных данных по удерживанию вещества на обращенно-фазном сорбенте [129]:

$$\log P = a \log k' + b$$

где  $\log k'$  - логарифм коэффициента удерживания референтных веществ, либо исследуемого соединения.

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 1

1. Ежегодный рост новых случаев онкологических заболеваний определяет возрастающую потребность в эффективных и безопасных противоопухолевых лекарственных препаратах.
2. Природные и синтетические соединения, содержащие 2-аминопиррольный фрагмент, обладают различными видами биологической активности. Среди замещенных производных 2-аминопирролкарбоновых кислот, синтезированных в Пермской государственной фармацевтической академии, обнаружены соединения с выраженной цитотоксической активностью в отношении широкого спектра опухолевых клеток человека. Одно из наиболее активных и малотоксичных соединений – 2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксамид (2-АБФПК).
3. Для анализа фармацевтических субстанций предпочтение отдается современным высокочувствительным инструментальным методам: УФ-спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, газожидкостной хроматографии. Аналитические методики, используемые для контроля качества лекарственных средств, должны быть валидированы.
4. Константа ионизации и коэффициент липофильности – важные характеристики биологически активных соединений, определяющие их фармакокинетические свойства и способность связываться с рецепторами. Для определения данных констант могут быть использованы современные физико-химические методы, такие как УФ-спектрофотометрия и ВЭЖХ.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

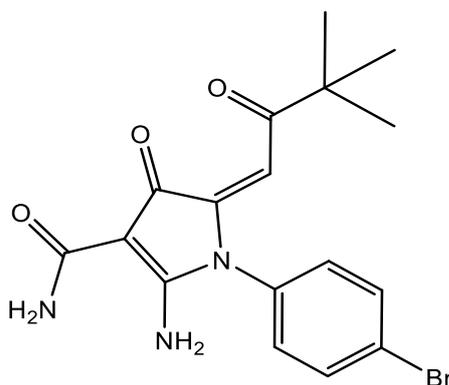
### 2.1. Объекты исследования

#### **2-АБФПК**

*Химическое название:*

2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид

*Структурная формула:*



*Эмпирическая формула:* C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

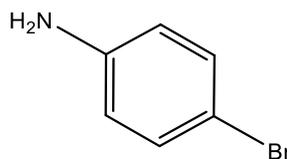
*Молекулярная масса:* 392,25

В период выполнения диссертационной работы были синтезированы следующие лабораторные серии субстанции 2-АБФПК:

0321, 0521, 0921, 0122, 0722, 0922 и 0223.

**4-броманилин** (99,90%, Acros Organics, Бельгия).

*Структурная формула:*



*Описание:* белый кристаллический порошок, растворим в спирте 96%, в диэтиловом эфире, практически не растворим в воде.

### Остаточные органические растворители (ООР)

Растворитель	Тип стандартного образца	Содержание
<i>Бензол</i>	ГСО 7141-95	99,30-99,99%
<i>Ацетонитрил</i>	ГСО 7816-2000	не менее 99,7%
<i>Этанол</i>	ГСО 7969-2001	1 мг/мл
<i>Триэтиламин</i>	BioUltra (GC) (Sigma)	99,5%
<i>Диэтиловый эфир</i>	ТУ 2600-001-45682126-13	не менее 99%

### 2.2. Реактивы и растворители

Используемые при разработке методик и для проведения анализа реактивы и растворители, описаны в фармакопейной статье ГФ XV, ОФС.1.3.0001 Реактивы, а также коммерческие реактивы.

- ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ, Fisher Chemical, UK
- метанол для градиентной ВЭЖХ, Химмед, Россия
- н-октанол 99%, Sigma, USA
- калия дигидрофосфат [7778-77-0]. ГФ XV, Реактивы ОФС.1.3.0001;
- фосфорная кислота концентрированная. Кислота ортофосфорная концентрированная [7664-38-2]. ГФ XV, Реактивы ОФС.1.3.0001;
- уксусная кислота безводная [64-19-7]. ГФ XV, Реактивы ОФС.1.3.0001;
- натрия гидроокись [1310-73-2]. ГФ XV, Реактивы ОФС.1.3.0001;
- кислота хлористоводородная концентрированная [7647-01-0]. ГФ XV, Реактивы ОФС.1.3.0001;
- трифторуксусная кислота. [76-05-1]. ГФ XV, Реактивы ОФС.1.3.0001
- универсальная индикаторная бумага рН 0-12.

#### Приготовление 0,1% раствора трифторуксусной кислоты:

В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 300 мл воды, добавляют 1 мл кислоты трифторуксусной концентрированной, перемешивают, доводят до метки тем же растворителем.

Приготовление фосфатного буферного раствора (pH 3,0):

3,40 г калия дигидрофосфата растворяют в 900 мл воды. Доводят pH до 3,0 потенциометрически с помощью фосфорной кислоты концентрированной и доводят объём раствора водой до 1000,0 мл.

Приготовление фосфатного буферного раствора (pH 6,8):

51,0 мл 27,2 г/л раствора калия дигидрофосфата смешивают с 49 мл 71,6 г/л раствора динатрия гидрофосфата. Если необходимо, доводят pH до 6,8 потенциометрически исходным раствором калия дигидрофосфата или динатрия гидрофосфата.

Приготовление подвижной фазы для определения pKa методом ВЭЖХ:

350 мл ацетонитрила смешивают с 650 мл фосфатного буферного раствора с требуемым значением pH (от 2,33 до 11,10), при необходимости pH подвижной фазы доводят потенциометрически с помощью 0,1М раствора ортофосфорной кислоты или 0,1М раствора натрия гидроксида.

Все растворы, используемые в качестве компонентов подвижной фазы, готовят с использованием воды для хроматографии, затем фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют на УЗ-бане в течение 20 минут.

### 2.3. Оборудование и материалы

- жидкостный хроматограф «LC-20 Prominence» (Shimadzu) с диодноматричным детектором SPD-M20A;
- жидкостный хроматограф «LCMS – 8050» (Shimadzu) с масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь с двойным источником ионизации: электроспрей (ESI) и химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI);
- хроматографическая колонка Luna C18(2) 100 А, 250×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex);
- хроматографическая колонка Zorbax Extend-C18 150×4,6 мм, 3,5 мкм (AgilentTechnologies);

- хроматографическая колонка Luna C18(2) 100 А, 150×3,0 мм, 3 мкм (Phenomenex);
- газовый хроматограф «Хроматэк - Кристалл 5000.2»;
- хроматографическая колонка HP-FFAP (50 м × 0,32 мм × 0,5 мкм);
- хроматографическая колонка HP-5 (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм);
- спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu);
- иономер И-500 М;
- электрод комбинированный ЭСК-10603/7 (стеклянный);
- титратор автоматический по методу Карла Фишера «Metrohm 870 KF Titrino Plus»;
- измеритель температуры плавления Stuart SMP40
- весы аналитические ВЛР-200;
- весы аналитические AND HR-150AG;
- цифровая ультразвуковая баня CD-4820;
- центрифуга с охлаждением «Digicen 21R»;
- универсальный вихревой смеситель MSV-3500;
- перемешивающее устройство ЛАБ-ПУ-04;
- шейкер лабораторный «LAB Dancer»;
- система очистки воды Simplicity UV (Millipore);
- виалы хроматографические вместимостью 2 мл, с завинчивающейся крышкой и септой PTFE/Sil;
- дозатор механический Sartorius Proline 100-1000 мкл;
- мембранные шприцевые нейлоновые фильтры «Agilent Technologies» с размером пор 0,45 мкм;
- бюретки объемом 25 мл, ГОСТ 20292-74;
- бумага фильтровальная лабораторная, ГОСТ 12026-76;
- чашки выпарительные фарфоровые вместимостью 25 мл, ГОСТ 9147-80;
- колбы мерные вместимостью 25, 50, 100, 1000 мл ГОСТ 1770-74;
- пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 мл, ГОСТ 20292-74;

- цилиндры мерные вместимостью 50, 100 мл, ГОСТ 1770-74;
- пробирки типа Эппендорф вместимостью 1,5 и 2 мл.

## 2.4 Методы исследования

Экспериментальные исследования были проведены на базе РИЦ «Фарматест» (лаборатории: физико-химических методов; хроматографических методов) и экспериментальной микробиологической лаборатории ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России.

– Испытания по показателям контроля качества фармацевтической субстанции проведены в соответствии с общими фармакопейными статьями ГФ РФ XV изд.:

<i>Описание</i>	ОФС.1.1.0006
<i>Растворимость</i>	ОФС.1.1.0006 ОФС.1.2.1.0005
<i>Температура плавления</i>	ОФС.1.1.0006 ОФС.1.2.1.0011
<i>Потеря в массе при высушивании</i>	ОФС.1.1.0006 ОФС.1.2.1.0010
<i>Сульфатная зола и тяжелые металлы</i>	ОФС.1.1.0006 ОФС.1.2.2.2.0014 ОФС.1.2.2.2.0012
<i>Определение воды</i>	ОФС.1.1.0006 ОФС.1.2.3.0002

– Количественное определение методом титриметрии проводили согласно требованиям ОФС.1.2.3.0029.

– Потенциометрическое титрование субстанции осуществляли с использованием иономера И-500 М.

– Анализ методом УФ-спектрофотометрии проводили на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu) согласно требованиям ОФС.1.2.1.1.0003.

- Спектры поглощения в ИК-области спектра снимали на ИК-Фурье спектрометре «ФСМ-1201», ЯМР  $^1\text{H}$  спектры соединения были записаны на спектрометре «Bruker Avance III» (ОФС.1.2.1.1.0002; ОФС.1.2.1.1.0007).
- Исследования методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ - и масс-спектрометрическим детектированием проводили на приборах «LC-20 Prominence» (Shimadzu) и «LCMS – 8050» (Shimadzu) согласно требованиям ОФС.1.2.1.2.0005.
- Разработку методик определения остаточных органических растворителей в субстанции методом газожидкостной хроматографии осуществляли на газовом хроматографе «Хроматэк - Кристалл 5000.2» (ОФС.1.2.1.2.0004).
- Коэффициент липофильности ( $\log P$ ) 2-АБФПК определяли в соответствии с руководствами OECD «Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method» и «Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method» [119,122].
- Определение константы ионизации 2-АБФПК проводили двумя способами: по методике А. Альберта и Е. Серджента [118] спектрофотометрическим методом и методом ВЭЖХ.
- Валидацию разработанных методик оценки качества субстанции 2-АБФПК проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012.
- Микробиологическую чистоту субстанции определяли в соответствии требованиями ОФС.1.2.4.0002.18.
- Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программного обеспечения Excel 2019 в соответствии с ОФС.1.1.0013.

### ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ 2-АБФПК

Всестороннее изучение физико-химических свойств нового биологически активного соединения является необходимым для дальнейшей разработки методик оценки его качества и установления показателей качества.

#### 3.1. Физические свойства

**Описание.** Субстанция 2-АБФПК представляет собой жёлтый мелкокристаллический порошок, без запаха.

**Растворимость.** Определение растворимости проводили согласно ОФС.1.2.1.0005, используя растворители различной полярности. Результаты представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1

#### Растворимость 2-АБФПК

Растворитель	$\epsilon$	Количество растворителя (мл) для растворения 1 г вещества	Растворимость
н-гексан	1,89	более 10 000	Практически не растворим
Толуол	2,30	более 10 000	Практически не растворим
Уксусная кислота	6,17	более 10 000	Практически не растворим
Этанол	24,55	800	Мало растворим
Метанол	32,66	30	Растворим
Ацетонитрил	38,00	90	Умеренно растворим
Диметилсульфоксид	46,45	5	Легко растворим
Вода очищенная	78,30	более 10 000	Практически не растворим

$\epsilon$  – диэлектрическая проницаемость [130].

Субстанция 2-АБФПК легко растворима в горячем этаноле и растворима в горячем ацетонитриле, что может быть использовано при необходимости для дополнительной очистки субстанции.

**Нормативное требование:** легко растворим в диметилсульфоксиде, растворим в метаноле, практически не растворим в воде.

**Температура плавления.** Для определения температуры плавления использовали капиллярный метод. По результатам анализа 7 серий субстанции 2-АБФПК (таблица 3.2) нормируемый интервал температуры плавления составляет от 215 до 217 °С:

Таблица 3.2

**Результаты определения температуры плавления субстанции 2-АБФПК**

Серия	№ определения	Температура плавления, °С	Среднее значение, °С
0321	1	215 – 216	215 – 216
	2	215 – 216	
	3	216 – 217	
0521	1	216 – 217	215 – 216
	2	215 – 216	
	3	215 – 216	
0921	1	215 – 216	215 – 216
	2	216 – 217	
	3	215 – 216	
0122	1	216 – 217	216 – 217
	2	215 – 216	
	3	216 – 217	
0722	1	216 – 217	215 – 216
	2	215 – 216	
	3	215 – 216	
0922	1	216 – 217	216 – 217
	2	216 – 217	
	3	215 – 216	
0223	1	215 – 216	215 – 216
	2	216 – 217	
	3	215 – 216	

### 3.2. Показатели и нормы качества

#### Потеря в массе при высушивании

Определение проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0010 (способ 1). Содержание влаги и летучих веществ во всех сериях 2-АБФПК не превышает 0,5% (таблица 3.3).

Таблица 3.3

**Результаты определения потери в массе при высушивании**

<b>Серия</b>	<b>Потеря в массе при высушивании, %</b>
0321	0,16
0521	0,20
0921	0,21
0122	0,11
0722	0,19
0922	0,20
0223	0,25

*Нормативное требование:* не более 0,50%.

**Определение воды (метод К. Фишера)**

Определение воды в сериях субстанции методом К.Фишера проводили с использованием автоматического титратора. Результаты представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4

**Результаты определения воды методом К.Фишера**

<b>Серия</b>	<b>Содержание воды, %</b>
0321	0,36
0521	0,32
0921	0,35
0122	0,29
0722	0,37
0922	0,28
0223	0,32

Содержание воды во всех сериях 2-АБФПК не превышает 0,5%.

*Нормативное требование:* не более 0,50%.

**Сульфатная зола и тяжелые металлы**

Анализ трех серий субстанций 2-АБФПК (0321, 0122 и 0223) показал, что масса сульфатной золы, полученной из 1 г субстанции, не превышает 0,10%. Результаты определения тяжелых металлов в зольном остатке (метод 1) не превышают 0,001%.

*Нормативное требование:* сульфатная зола: не более 0,10%; тяжелые металлы: не более 0,001%.

### 3.3 Спектральные характеристики

#### Спектрометрия в инфракрасной области

ИК-спектр субстанции 2-АБФПК (рис. 3.1), снятый на универсальном лабораторном ИК-Фурье спектрометре «ФСМ-1201» в вазелиновом масле, содержит полосы поглощения  $\text{NH}_2$ -группы в области  $3416 - 3370 \text{ см}^{-1}$ , валентные колебания N-H незамещенной амидной группы в области  $3290 - 3305 \text{ см}^{-1}$ . Обнаруживаются валентные колебания карбониллов и C=C связей в области  $1659 - 1618 \text{ см}^{-1}$ .

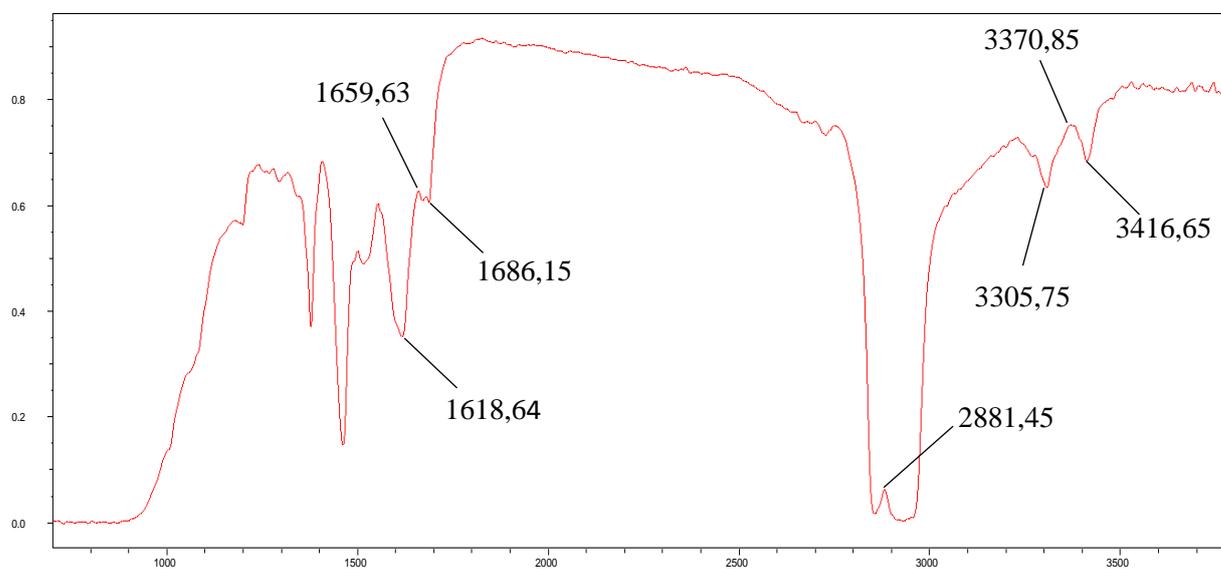


Рис. 3.1 – ИК-спектр 2-АБФПК

Поскольку ГФ РФ (XV изд.) рекомендует ИК-спектрометрию как приоритетный метод для идентификации фармацевтических субстанций, метод был включен в проект нормативной документации для оценки качества по показателю «Подлинность».

*Нормативное требование:* инфракрасный спектр субстанции, снятый в вазелиновом масле в области от  $4000$  до  $400 \text{ см}^{-1}$  по положению полос поглощения должен соответствовать спектру стандартного образца 2-АБФПК.

## Спектроскопия ядерного магнитного резонанса ( $^1\text{H}$ -ЯМР)

ЯМР  $^1\text{H}$  спектр был записан на спектрометре «Bruker Avance III» в дейтерированном диметилсульфоксиде (ДМСО- $d_6$ ) при рабочей частоте 400 МГц, в качестве внутреннего стандарта использовался сигнал от дейтерорастворителя.

Установлено, что в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  (рис. 3.2) присутствуют синглеты протонов аминогруппы при 8,50 – 8,00 м. д., синглеты протонов амидной группы при 7,40 – 6,75 м. д., дублеты протонов бензольного цикла при 7,80 – 7,45 м. д., синглет метилиденового протона при 5,75 – 5,50 м. д., синглет протонов третбутила при 1,25 – 1,00 м. д.

Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  подтверждает структуру исследуемого соединения и может использоваться как дополнительный способ идентификации 2-АБФПК.

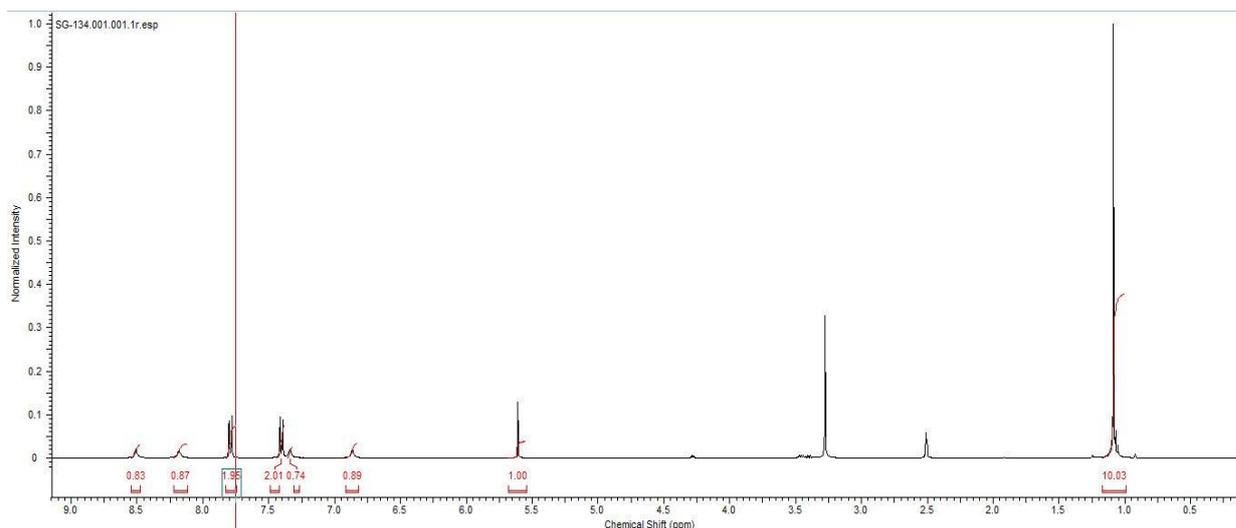


Рис. 3.2 – ЯМР  $^1\text{H}$  спектр 2-АБФПК

## Спектрофотометрия в ультрафиолетовой области

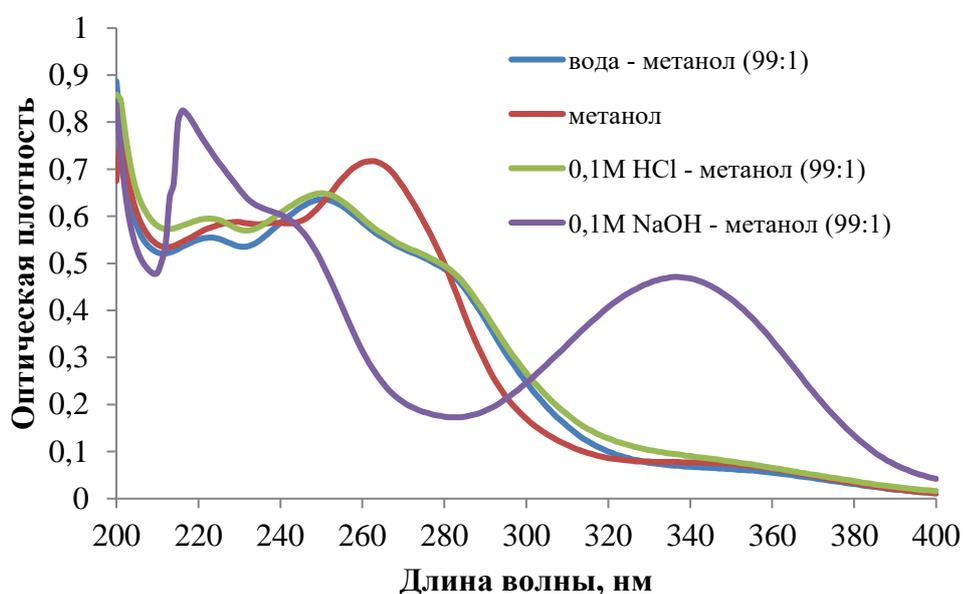
Наличие в структуре 2-АБФПК хромофорных групп обуславливает способность соединения поглощать свет в УФ-диапазоне.

Спектры снимали на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu). В качестве растворителей использовали метанол; воду очищенную; 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной и 0,1 М раствор натрия гидроксида.

С учетом нерастворимости субстанции 2-АБФПК в воде и водных растворах кислот испытуемые растворы готовили по следующей методике: 50

мг субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 20 мл метанола, доводили объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор А). Затем 1,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки одним из вышеуказанных растворителей (раствор Б). Концентрация 2-АБФПК в растворе Б составила 0,001%.

Электронные спектры 0,001% растворов 2-АБФПК, измеренные в диапазоне от 200 до 400 нм в различных растворителях, представлены на рисунке 3.3.



**Рис. 3.3 – УФ-спектры поглощения 2-АБФПК**

УФ-спектры 2-АБФПК в «нейтральных» и «кислых» водно-метанольных растворах имеют 2 максимума поглощения – при 223 нм и 250 нм. В щелочном растворе (рН более 12) характер спектра соединения изменяется: появляются 2 выраженных максимума – при 216 нм и 336 нм. Такое изменение, вероятно, объясняется переходом соединения в имидольную форму за счет слабых кислотных свойств амидной группы. На наличие имидольной формы 2-АБФПК указывает и растворимость вещества в растворах сильных щелочей. Вследствие сольватохромного эффекта в УФ-спектре метанольного раствора 2-АБФПК в сравнении со спектрами «нейтральных» и «кислых» водных растворов наблюдается батохромный сдвиг полос поглощения и значительное увеличение интенсивности поглощения во втором максимуме (263 нм).

### 3.4 Изучение хроматографического поведения 2-АБФПК в режиме обращенно-фазной ВЭЖХ

В исследованиях использовали жидкостный хроматограф «LC-20 Prominence» (Shimadzu) со спектрофотометрическим детектором. Изучение хроматографической подвижности соединения проводили на колонке с обращенно-фазным сорбентом Luna 5u C18(2) 100A (4,6 × 250 мм, 5 мкм), используя подвижные фазы на основе ацетонитрила и воды с добавлением модификаторов органической и неорганической природы. Апробированные составы элюентов представлены в таблице 3.5.

**Таблица 3.5**

**Составы элюентов**

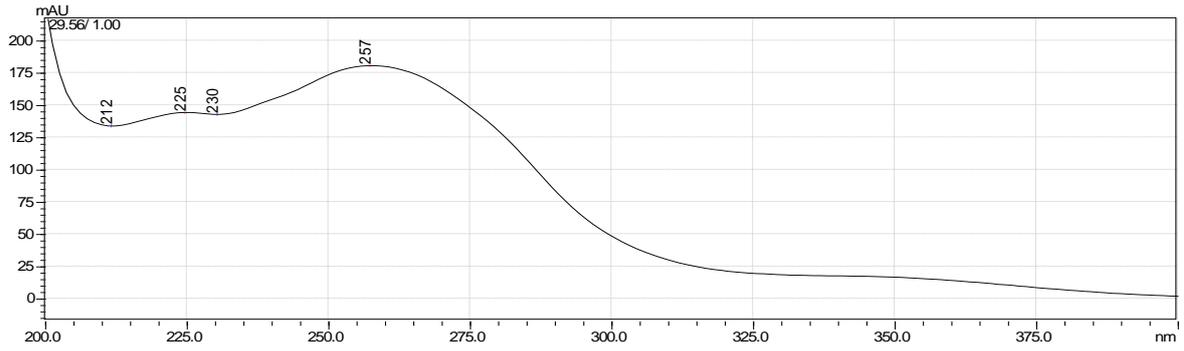
<b>Состав</b>	<b>Соотношение компонентов (%)</b>
вода – ацетонитрил	40 – 60
фосфатный буфер (pH 6,8) – ацетонитрил	50 – 50
фосфатный буфер (pH 3,0) – ацетонитрил	60 – 40
0,1% раствор кислоты трифторуксусной – ацетонитрил	65 – 35

Подвижные фазы с pH более 7 в работе не применялись, ввиду возможности деградации в щелочной среде привитой C<sub>18</sub>-фазы используемого сорбента.

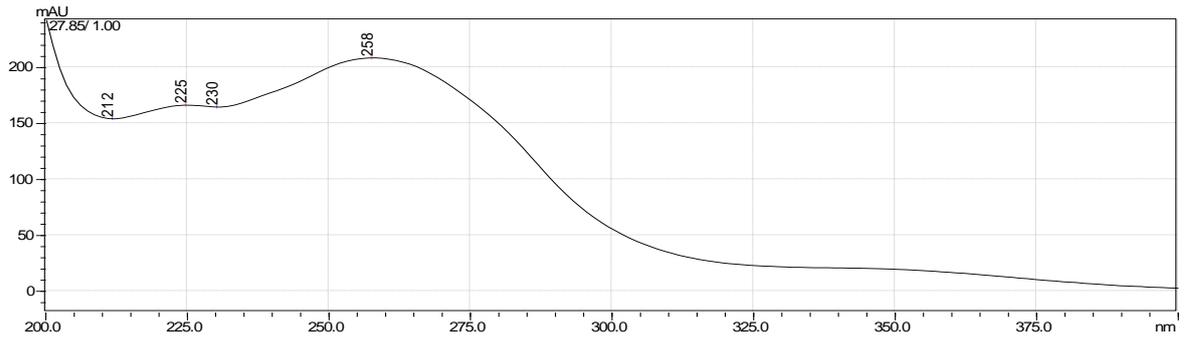
Объектом исследования был метанольный раствор 2-АБФПК с концентрацией 200 мкг/мл. Анализ проводили в изократическом режиме при температуре термостата колонки 40°C. Скорость потока 1 мл/мин, объем вводимой пробы 10 мкл.

В режиме обзорного элюирования были сняты УФ-спектры 2-АБФПК во всех использованных подвижных фазах (рис. 3.4).

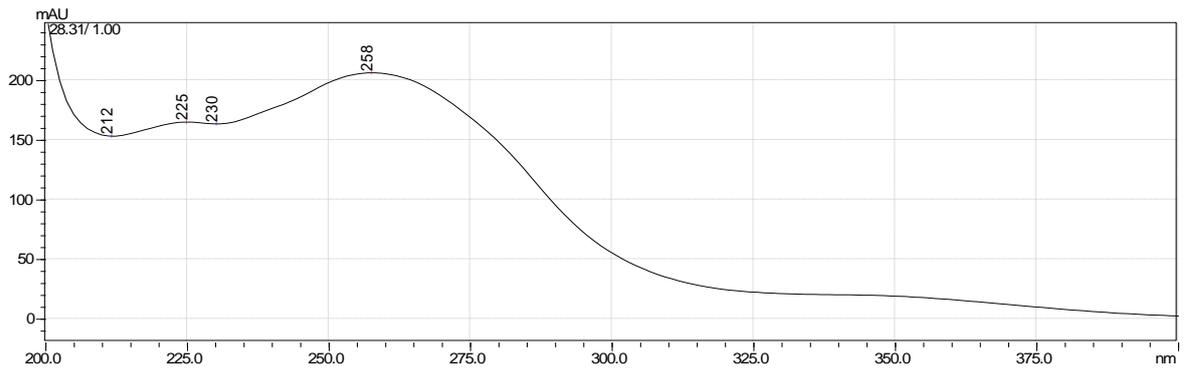
а



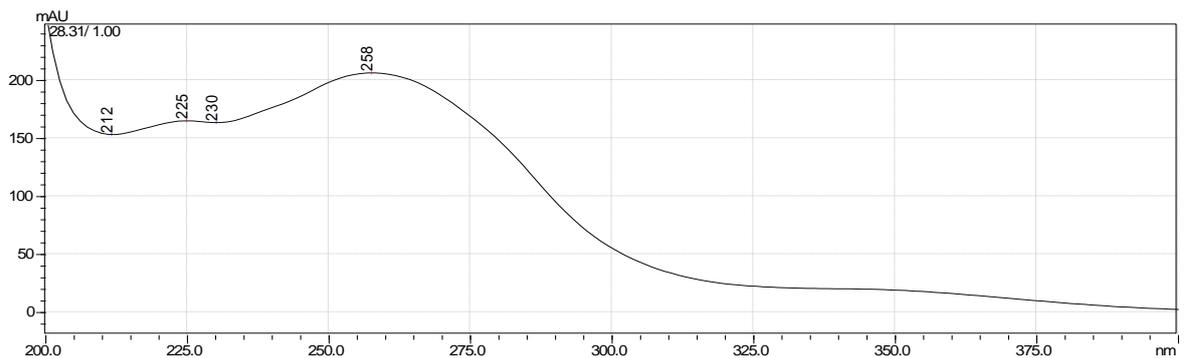
б



в



г



**Рис. 3.4 – УФ-спектры 2-АБПК в подвижных фазах**

**а) вода – ацетонитрил**

**б) фосфатный буфер (рН 6,8) – ацетонитрил**

**в) фосфатный буфер (рН 3,0) – ацетонитрил**

**г) фосфатный буфер (рН 6,8) – ацетонитрил**

Установлено, что характер спектра 2-АБФПК не изменялся в апробированных элюентах различного состава с разными значениями рН. Максимум поглощения изучаемого соединения находился при  $258 \pm 2$  нм. Таким образом, для дальнейших исследований была выбрана длина волны детектирования 258 нм.

Для каждой полученной хроматограммы рассчитывали время удерживания ( $t_R$ ), фактор асимметрии ( $A_s$ ), коэффициент ёмкости ( $k'$ ) и площадь хроматографического пика ( $S$ ). Результаты представлены в таблице 3.6.

По результатам проведенного эксперимента по изучению хроматографической подвижности установлено, что исследуемое соединение хорошо удерживается на обращено-фазном сорбенте при использовании всех выбранных элюентов. Оптимальный диапазон значений коэффициента ёмкости [ $2 < k < 10$ ] наблюдается при содержании ацетонитрила в подвижной фазе от 50% до 35%. Фактор асимметрии хроматографического пика не превышал 1,5, что соответствует требованиям ГФ РФ.

## Хроматографические параметры\* 2-АБФПК

Состав подвижной фазы	$t_R$ , мин	$k'$	$A_s$	S
<b>вода – ацетонитрил</b>				
40:60	5,19	1,35	1,184	8 486 384
50:50	7,95	2,41	1,079	8 102 219
60:40	16,86	3,96	1,030	6 664 423
65:35	29,48	7,42	1,016	5 669 604
<b>фосфатный буфер (pH 6,8) – ацетонитрил</b>				
50:50	7,74	2,58	1,085	6 028 279
60:40	15,85	3,63	1,021	5 912 578
65:35	28,95	6,96	1,006	5 889 866
<b>0,1% раствор трифторуксусной кислоты – ацетонитрил</b>				
50:50	7,92	2,88	1,081	6 023 203
60:40	16,77	4,84	1,021	5 924 390
65:35	29,10	8,97	1,006	5 881 273
<b>фосфатный буфер (pH 3,0) – ацетонитрил</b>				
50:50	7,79	2,80	1,083	5 955 972
60:40	16,14	3,64	1,022	5 906 229
65:35	28,31	7,09	1,005	5 849 722

\*Значения хроматографических параметров рассчитывались как среднее значение трёх параллельных определений.

Пример хроматограммы раствора 2-АБФПК представлен на рисунке 3.5.

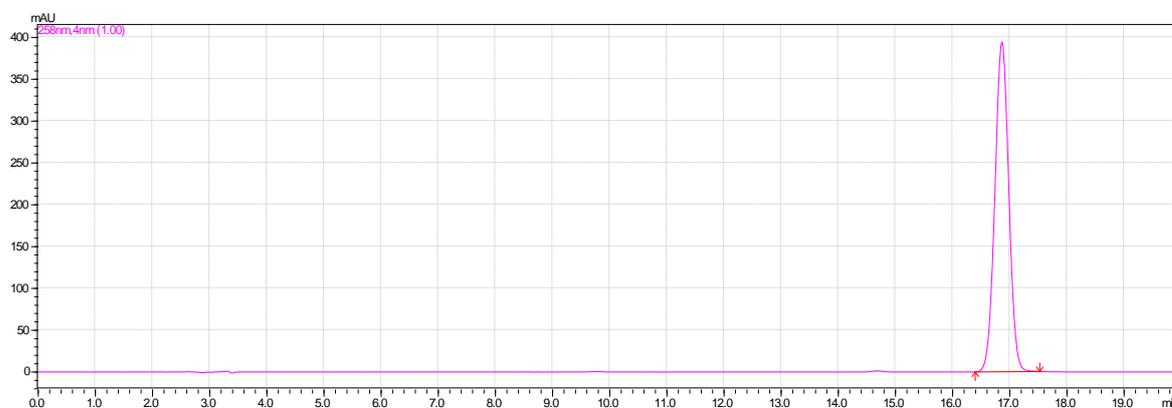
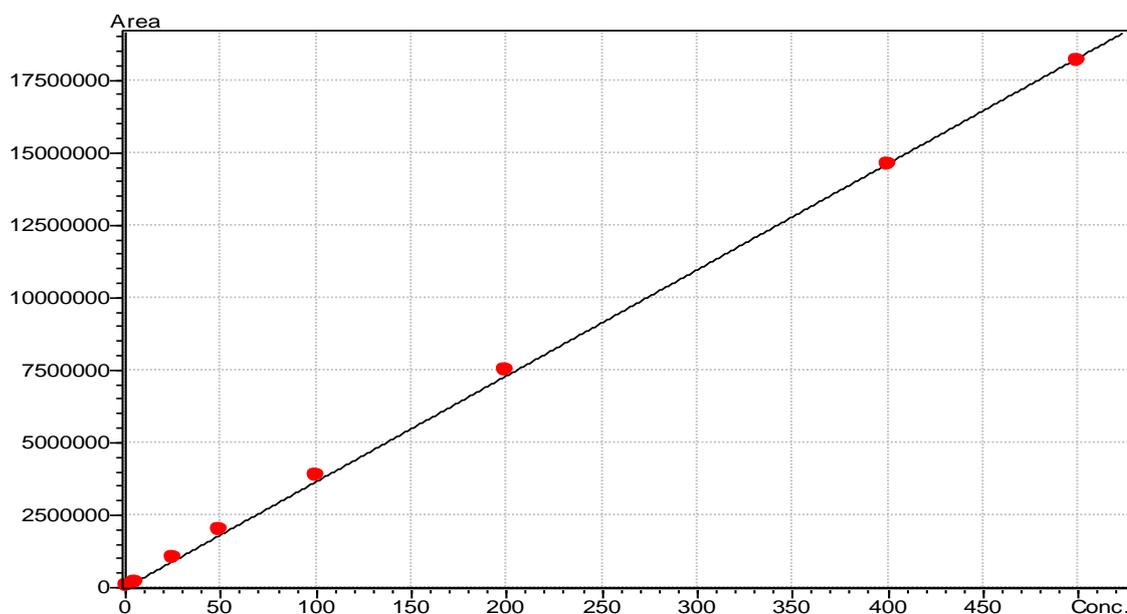


Рис. 3.5 – Хроматограмма 2-АБФПК в подвижной фазе состава вода – ацетонитрил (60:40)

Для оценки линейности отклика спектрофотометрического детектора от концентрации 2-АБФПК были приготовлены 8 метанольных растворов в диапазоне концентраций от 1 до 500 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали 3 раза в системе вода – ацетонитрил (60:40) и рассчитывали среднюю площадь пика. Калибровочный график приведен на рисунке 3.6.



**Рис. 3.6 – График зависимости площади пика 2-АБФПК от концентрации**

Уравнение графика:  $S = 36559 \cdot C$ , где  $S$  – площадь хроматографического пика;  $C$  – концентрация 2-АБФПК в растворе. Коэффициент корреляции: 0,9998. Полученный коэффициент корреляции составил более 0,999, что свидетельствует о линейности отклика детектора в широком диапазоне концентраций.

### **3.5 Изучение физико-химических характеристик 2-АБФПК, определяющих его биодоступность**

Одними из важнейших физико-химических характеристик биологически активных соединений являются константа ионизации ( $pK_a$ ) и коэффициент липофильности ( $\log P$ ), которые определяют фармакокинетические свойства и способность связываться с рецепторами-мишенями.

### 3.5.1 Определение констант ионизации 2-АБФПК

#### *Метод УФ – спектрофотометрии*

Результаты исследования характера спектра поглощения 2-АБФПК в растворах с различным значением рН среды были положены в основу спектрофотометрического определения константы ионизации 2-АБФПК.

Для определения константы ионизации спектрофотометрическим методом использовали методику, разработанную А. Альбертом и Е. Серджендом [118]. Методика основана на измерении спектров равновесной смеси прототропных форм соединения при нескольких значениях рН вблизи предполагаемого значения рКа.

Ультрафиолетовые спектры регистрировали на спектрофотометре «Shimadzu UV-1800» в области от 200 до 400 нм.

Фосфатный буферный раствор с рН 3,0 на основе калия дигидрофосфата был приготовлен в соответствии с ОФС.1.3.0003 «Буферные растворы». Из данного буфера готовили остальные буферные растворы (рН от 1,67 до 12,00 с шагом в 1 единицу) путем добавления 0,1М раствора ортофосфорной кислоты или 0,1М раствора гидроксида натрия до требуемого значения рН. В качестве крайних точек использовали растворы 0,1 М кислоты хлористоводородной и гидроксида натрия, приготовленные согласно ОФС.1.3.0002 «Титрованные растворы». Контроль рН растворов осуществляли на иономере «И-500» (Аквилон).

Для подтверждения того, что в крайних точках вещество полностью ионизировано (для 0,1М NaOH) или неионизировано (0,1М HCl) регистрировали УФ-спектры 2-АБФПК в 0,01М NaOH и 0,01М HCl, что согласуется с методикой Альберта и Сердженда. Отклонение в величинах оптической плотности не превышало 1%, что свидетельствует о том, что в крайних точках существует только либо ионизированная, либо неионизированная молекула.

Учитывая плохую растворимость 2-АБФПК в воде, готовили исходный метанольный раствор субстанции с концентрацией 100 мкг/мл. Рабочие растворы с концентрацией 10 мкг/мл получали путем разведения исходного раствора соответствующим буферным раствором.

Поскольку ранее для 2-аминопирролкарбоксамидов не проводились исследования по определению показателя ионизации, для предварительной оценки величины  $pK_a$  был использован метод определения точки «перегиба» на графике зависимости оптической плотности от  $pH$  раствора. В этом случае регистрировались УФ-спектры поглощения 2-АБФПК в широком диапазоне  $pH$  (от 1 до 12). Точка перегиба на кривой принималась за приблизительное значение константы ионизации.

Далее для более точного определения константы анализировали УФ-спектры 2-АБФПК в узком интервале значений  $pH$ , вблизи которых фиксировалась предварительное значение  $pK_a$ . Расчет  $pK_a$  производили по формуле:

$$pK_a = pH + \lg \frac{A_m - A_x}{A_x - A_i}$$

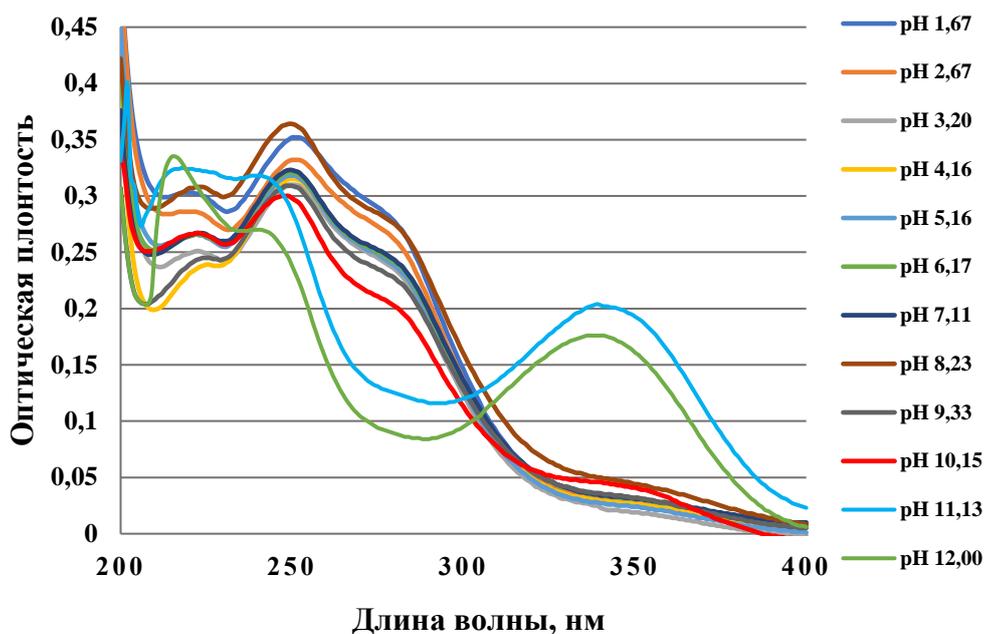
где,

$A_m$  – это оптическая плотность неионизированного соединения;

$A_x$  – оптическая плотность соединения в соответствующих буферных растворах ( $pH$  от 1,67 до 12,00);

$A_i$  – оптическая плотность ионизированного соединения.

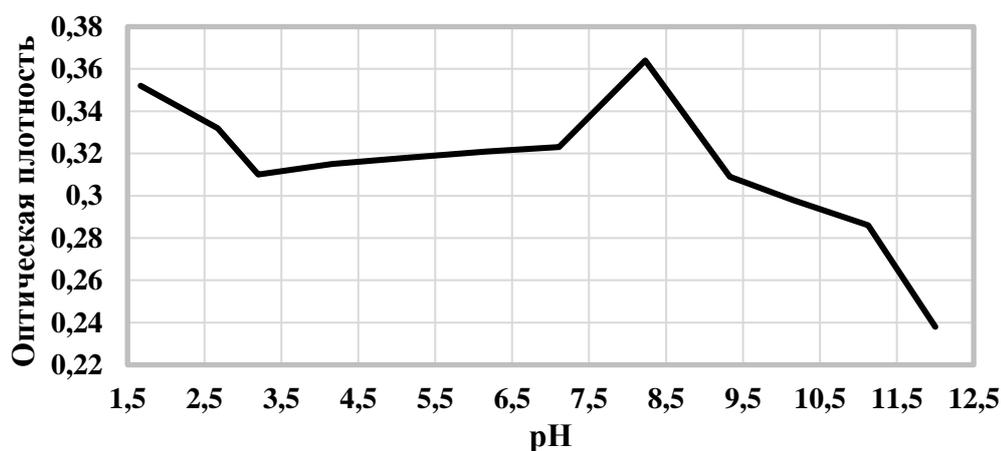
Анализ спектров 2-АБФПК, снятых в диапазоне  $pH$  1-12, показал наличие выраженного максимума поглощения при 250 нм, а также «плеча» при 225 нм. В сильнощелочной среде ( $pH > 11$ ) наблюдается батохромный сдвиг и появляются максимумы поглощения при 216 и 336 нм (рисунок 3.7).



**Рис. 3.7 – УФ-спектры поглощения 2-АБФПК при разных значениях pH буферных растворов**

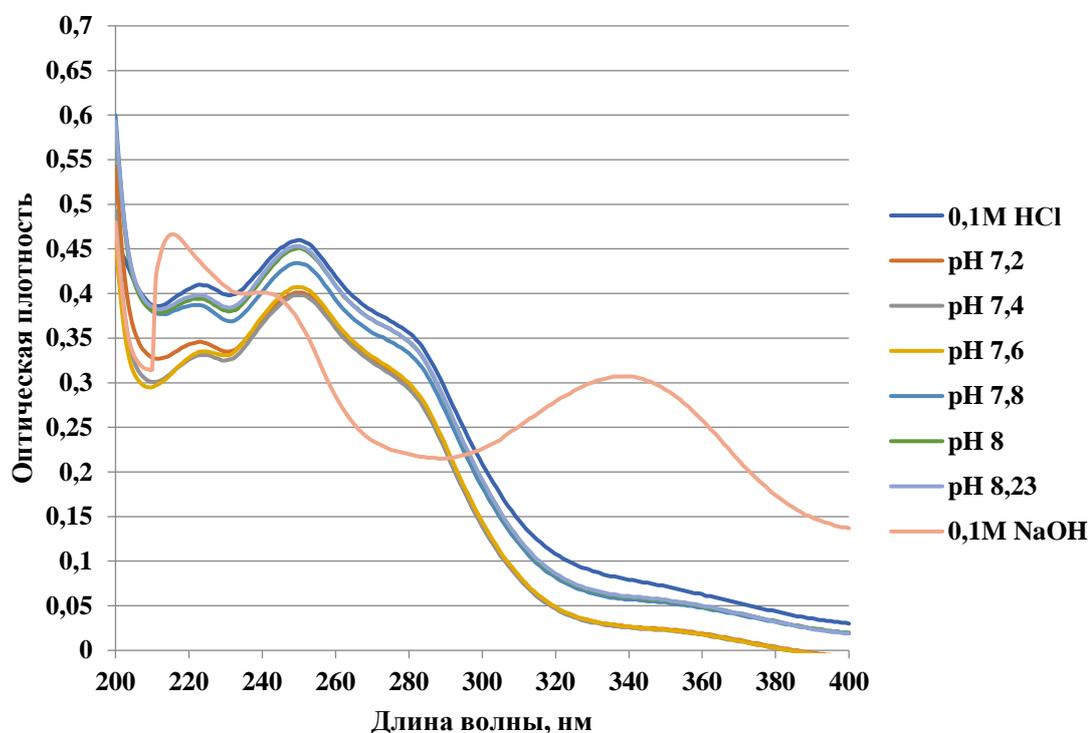
Для предварительного определения  $pK_a$  и построения графика зависимости оптической плотности от pH, была выбрана длина волны 250 нм, соответствующая максимальному поглощению 2-АБФПК.

Согласно построенному графику (рис. 3.8), точка перегиба, определяемая наибольшим изменением оптической плотности исследуемого соединения, располагается в области pH около 8,2.



**Рис. 3.8 – Зависимость оптической плотности растворов 2-АБФПК от pH**

Далее определяли точное значение рКа в узком интервале рН от 7,2 до 8,23 с шагом в 0,2. Для этого регистрировали спектры 2-АБФПК в буферных растворах с соответствующим рН (рис. 3.9).



**Рис. 3.9 – УФ – спектры 2-АБФПК в буферных растворах (рН 7,2 – 8,23)**

Оптическая плотность раствора 2-АБФПК ( $\lambda = 250$  нм) при каждом рН использовалась в расчетах точного значения рКа (таблица 3.7). Среднее значение рКа 2-АБФПК составило  $7,64 \pm 0,14$ .

**Таблица 3.7**

**Результаты определения рКа методом УФ – спектрофотометрии**

рН	Оптическая плотность при 250 нм (n = 3)	рКа	Оптическая плотность в крайних точках
7,2	0,401	7,53	$A_m$ (в 0,1М НСl) = 0,470 $A_i$ (в 0,1М NaOH) = 0,369
7,4	0,398	7,79	
7,6	0,407	7,82	
7,8	0,434	7,52	
8,02	0,445	7,54	
8,23	0,450	7,62	

Для оценки воспроизводимости получаемых результатов были проведены дополнительные эксперименты по определению рКа 2-АБФПК методом УФ-спектрофотометрии с привлечением двух химиков. Исследования проводились в разные дни, на разных приборах. Полученные результаты представлены в таблице 3.8.

**Таблица 3.8**

**Результаты оценки воспроизводимости определения рКа методом УФ-спектрофотометрии**

<b>Результаты определения рКа 2-АБФПК</b>		
<b>№</b>	<b>Химик 1</b>	<b>Химик 2</b>
1	7,53	7,75
2	7,79	7,43
3	7,66	7,86
4	7,52	7,54
5	7,34	7,47
6	7,62	7,91
<b>рКа<sub>ср.</sub></b>	<b>7,58</b>	<b>7,66</b>
<b>SD</b>	<b>0,15</b>	<b>0,21</b>
<b>RSD</b>	<b>1,98</b>	<b>2,74</b>
<b>S<sup>2</sup></b>	<b>0,0225</b>	<b>0,0441</b>
<b><math>F_{\text{расчет.}} = 1,96 &lt; F_{\text{табл}} = 5,05</math></b>		

Рассчитанный критерий Фишера не превышает табличного значения для 6 измерений, что подтверждает воспроизводимость результатов, полученных двумя химиками.

### **Метод ВЭЖХ-УФ**

Определение рКа методом ВЭЖХ основано на различной способности ионизированных и неионизированных форм аналита удерживаться на обращенно-фазном сорбенте в зависимости от рН среды подвижной фазы. Поскольку при изменении рН подвижной фазы меняется соотношение ионизированных и неионизированных форм соединения, следовательно, будет изменяться и его фактор удерживания (коэффициент емкости).

В качестве объекта исследования выступал метанольный раствор 2-АБФПК и нитрата калия (неудерживаемого компонента). Концентрация каждого из компонентов в растворе составила 100 мкг/мл.

Хроматографический анализ проводили на жидкостном хроматографе «LC-20 Prominence» (Shimadzu) с диодноматричным детектором SPD-M20A в следующих условиях:

<i>Хроматографическая колонка</i>	Zorbax Extend-C18, 150×4,6 мм, 3,5 мкм
<i>Режим</i>	изократический
<i>Температура термостата колонки</i>	40°C
<i>Скорость потока</i>	1 мл/мин
<i>Детектор</i>	спектрофотометрический, 258 нм для 2-АБФПК
<i>Объем вводимой пробы</i>	10 мкл

В качестве подвижной фазы использовали элюент состава ацетонитрил – фосфатный буфер (35:65). Фосфатные буферные растворы с различными значениями pH готовили аналогично, как для спектрофотометрического определения. Исследования осуществляли в диапазоне pH элюентов от 2 до 11,5, рекомендованном для данной хроматографической колонки.

Коэффициенты емкости ( $k'$ ) 2-АБФПК при различных значениях pH рассчитывали по формуле:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

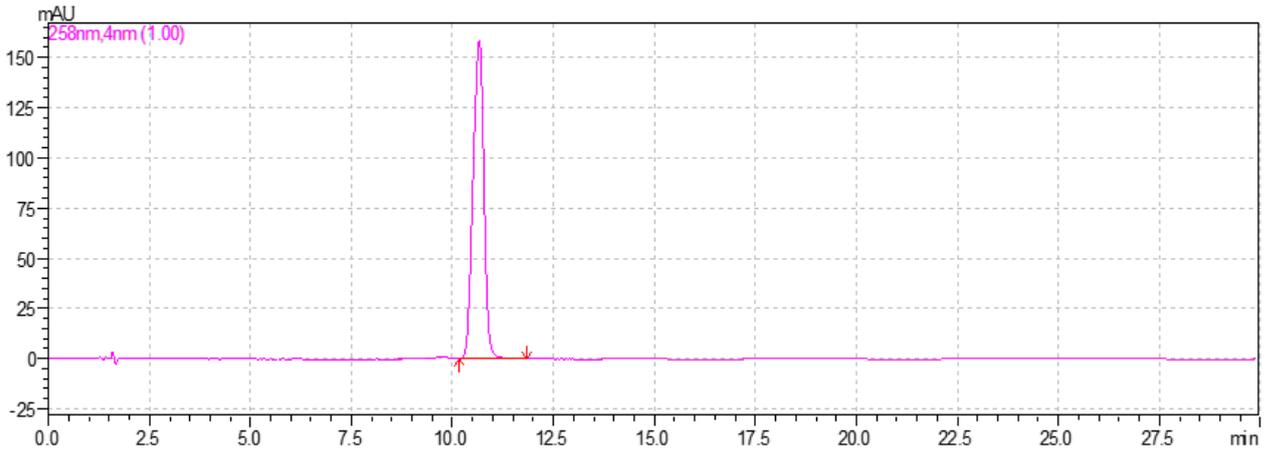
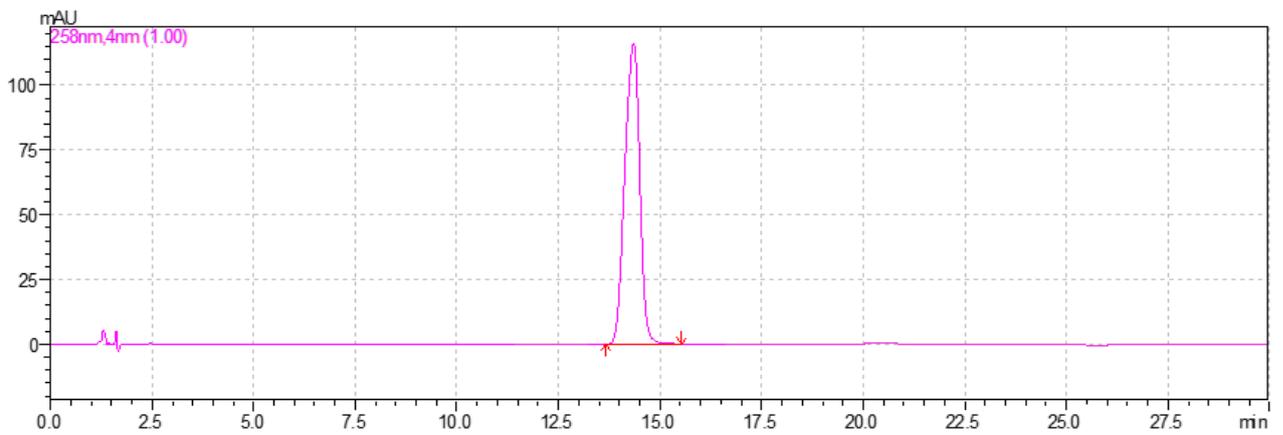
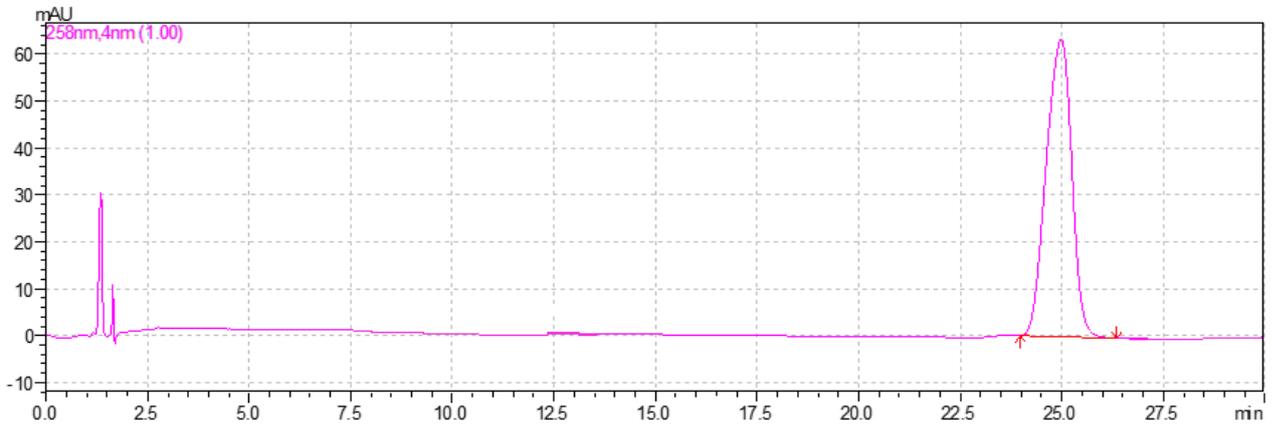
где,

$t_R$  – время удерживания 2-АБФПК;

$t_0$  – время удерживания неудерживаемого компонента ( $\text{KNO}_3$ ).

Результаты расчетов представлены в таблице 5.3.

Растворы 2-АБФПК (100 мкг/мл) хроматографировали в трехкратной повторности для каждого значения pH подвижной фазы в интервале от 2 до 11. Примеры полученных хроматограмм представлены на рисунке 3.10.

**а****б****в**

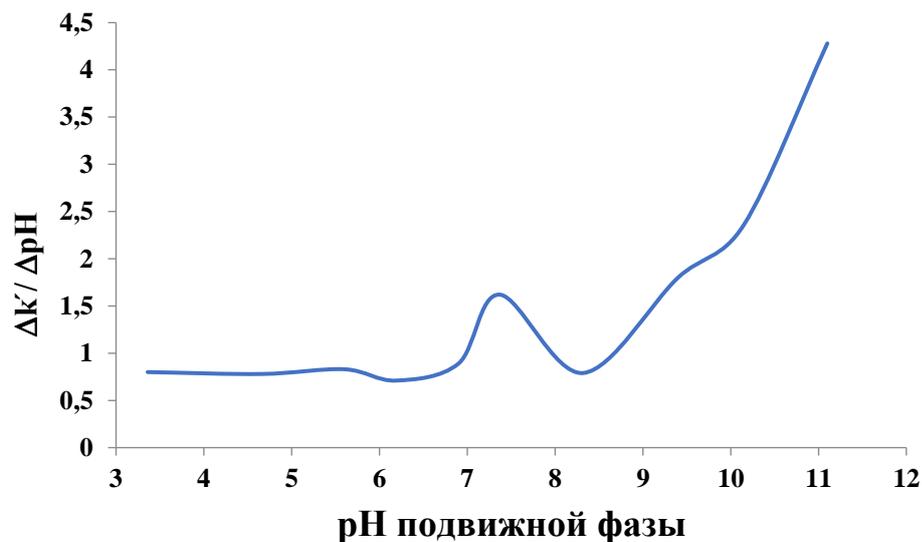
**Рис. 3.10 – Хроматограммы 2-АБФПК при различных значениях рН элюента (а – 2,35; б – 6,90; в – 11,10)**

Таблица 3.9

**Параметры удерживания 2-АБФПК при различных рН элюента**

<b>рН</b>	<b>t<sub>0</sub> (n = 3)</b>	<b>t<sub>R</sub> (n = 3)</b>	<b>k'</b>	<b>Δk'/ΔрН</b>
2,33	1,29	10,65	7,26	–
3,36	1,27	11,53	8,08	0,80
4,66	1,22	12,32	9,1	0,78
5,6	1,21	13,16	9,88	0,83
6,19	1,21	13,67	10,3	0,71
6,9	1,2	14,31	10,93	0,89
<b>7,37</b>	<b>1,19</b>	<b>15,1</b>	<b>11,69</b>	<b>1,62</b>
8,32	1,19	15,99	12,44	0,79
9,4	1,19	18,3	14,38	1,80
10,15	1,21	20,75	16,15	2,36
11,10	1,18	25,04	20,22	4,28

По рассчитанным коэффициентам удерживания (таблица 3.9) строили график в координатах  $\Delta k' / \Delta pH$  – рН (рис. 3.11):



**Рис. 3.11 – Дифференциальная кривая для определения рКа 2-АБФПК методом ВЭЖХ**

Перегиб кривой в точке с рН 7,4 соответствует значению рКа 2-АБФПК.

Полученные значения рКа (7,64 методом УФ-спектрофотометрии и 7,40 методом ОФ-ВЭЖХ) сопоставимы и указывают на наличие свойств слабой кислоты. Слабокислотные свойства 2-АБФПК (за счет амидно-имидольной таутомерии) подтверждает и растворимость вещества в растворах сильных

щелочей. Также в молекуле присутствует «основной» центр (первичная аминогруппа, связанная с гетероциклом), что определяет амфотерные свойства исследуемого соединения, и, следовательно, возможность существования нескольких констант ионизации. Однако доступными методами вторую константу определить не удалось. Вероятной причиной является недостижение уровня кислотности, необходимого для ионизации «основного» центра.

### 3.5.2 Определение коэффициента липофильности ( $\log P$ ) 2-АБФПК

#### *Метод встряхивания в колбе (Shake-flask)*

Поскольку на данный момент для 2-аминопирролкарбоксамидов не получены данные по липофильности, был произведен предварительный теоретический расчет  $\log P$  соединения 2-АБФПК с помощью доступных программ и сервисов (таблица 3.10).

**Таблица 3.10**

**Теоретические значения  $\log P$  2-АБФПК**

<b>Программа/сервис</b>	<b>Значение</b>
FILTER-IT program	1,92
Swiss ADME	1,92
ALOGPS 2.1 program	2,50
Molinspiration Calculator of Molecular properties	1,61

Теоретический расчет показал, что значение  $\log P$  изучаемого соединения находится в интервале от -2 до 4 единиц, что позволяет использовать в экспериментальных исследованиях метод встряхивания.

Определение коэффициента липофильности проводилось согласно руководству OECD «Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method» [120]. На подготовительном этапе н-октанол насыщался водой путем встряхивания в течение 4 часов на встряхивателе ЛАБ-ПУ-04.

Водные растворы 2-АБФПК с концентрациями 50, 100 и 150 мкг/мл готовили из исходного метанольного раствора 2-АБФПК (10 мг/мл).

*Методика определения:*

в пробирку типа Эппендорф помещали 1,0 мл водного раствора 2-АБФПК и соответствующий объем н-октанола. Используемые соотношения органической и водной фаз (октанол/вода) – 2:1; 1:1; 1:2. Образцы встряхивали на вихревом смесителе в течение 5 минут со скоростью 900 об/мин, затем центрифугировали в течение 10 минут при 15 000 об/мин для разделения водной и органической фаз. Водную фазу отбирали с помощью шприца и помещали в виалу.

Концентрацию 2-АБФПК определяли методом ВЭЖХ-УФ в следующих условиях:

<i>Колонка</i>	Luna C18(2) 100А, 250×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex)
<i>Подвижная фаза</i>	вода – ацетонитрил (50:50)
<i>Режим</i>	изократический
<i>Температура термостата колонки</i>	40°С
<i>Скорость потока</i>	1 мл/мин
<i>Детектор</i>	спектрофотометрический, 258 нм
<i>Объем вводимой пробы</i>	10 мкл

Расчет концентрации 2-АБФПК проводили по методу «внешнего» стандарта. В качестве стандартных использовали водные растворы 2-АБФПК соответствующей концентрации (50, 100 и 150 мкг/мл).

Расчёт коэффициента липофильности проводился по формуле:

$$\log P = \log \left( \frac{A_{st} - A_w}{A_w} * \frac{V_w}{V_o} \right)$$

где,

$A_{st}$  – площадь пика вещества в стандартном растворе,

$A_w$  – площадь пика вещества в водной фазе после их уравнивания,

$V_w$  – объем водной фазы,

$V_o$  – объем н-октанола.

Каждое экспериментальное значение  $\log P$  является средним четырёх последовательных измерений (таблица 3.11):

Таблица 3.11

Экспериментально установленные значения  $\log P$  2-АБФПК

Соотношение октанол/вода	Концентрация 2-АБФПК, мкг/мл	$\log P$ ( $X_{cp.} \pm SD$ )
1:1 (1,0 мл : 1,0 мл)	50	$1,35 \pm 0,03$
	100	$1,32 \pm 0,01$
	150	$1,32 \pm 0,02$
2:1 (2,0 мл : 1,0 мл)	50	$1,55 \pm 0,09$
	100	$1,51 \pm 0,03$
	150	$1,56 \pm 0,06$
1:2 (0,5 мл : 1,0 мл)	50	$1,84 \pm 0,03$
	100	$1,92 \pm 0,01$
	150	$1,84 \pm 0,06$

**Метод ОФ-ВЭЖХ**

Принцип определения  $\log P$  методом ВЭЖХ, согласно руководству OECD «Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method», заключается в установлении взаимосвязи между удерживанием вещества на колонке с обращенно-фазным сорбентом и его коэффициентом распределения в системе н-октанол/вода. Для этого осуществляют в аналогичных условиях хроматографирование референтных веществ с известной липофильностью и строят график зависимости  $\log P$  от логарифмов коэффициентов ёмкости ( $\log k$ ).

Поскольку 2-АБФПК не демонстрирует выраженных кислотных, либо основных свойств в качестве референтных были выбраны соединения нейтрального характера (таблица 3.12). Референтные соединения выбирались таким образом, чтобы диапазон  $\log P$  включал ранее полученные результаты методом встряхивания в колбе и теоретические значения, полученные с помощью специализированного программного обеспечения.

## Референтные соединения

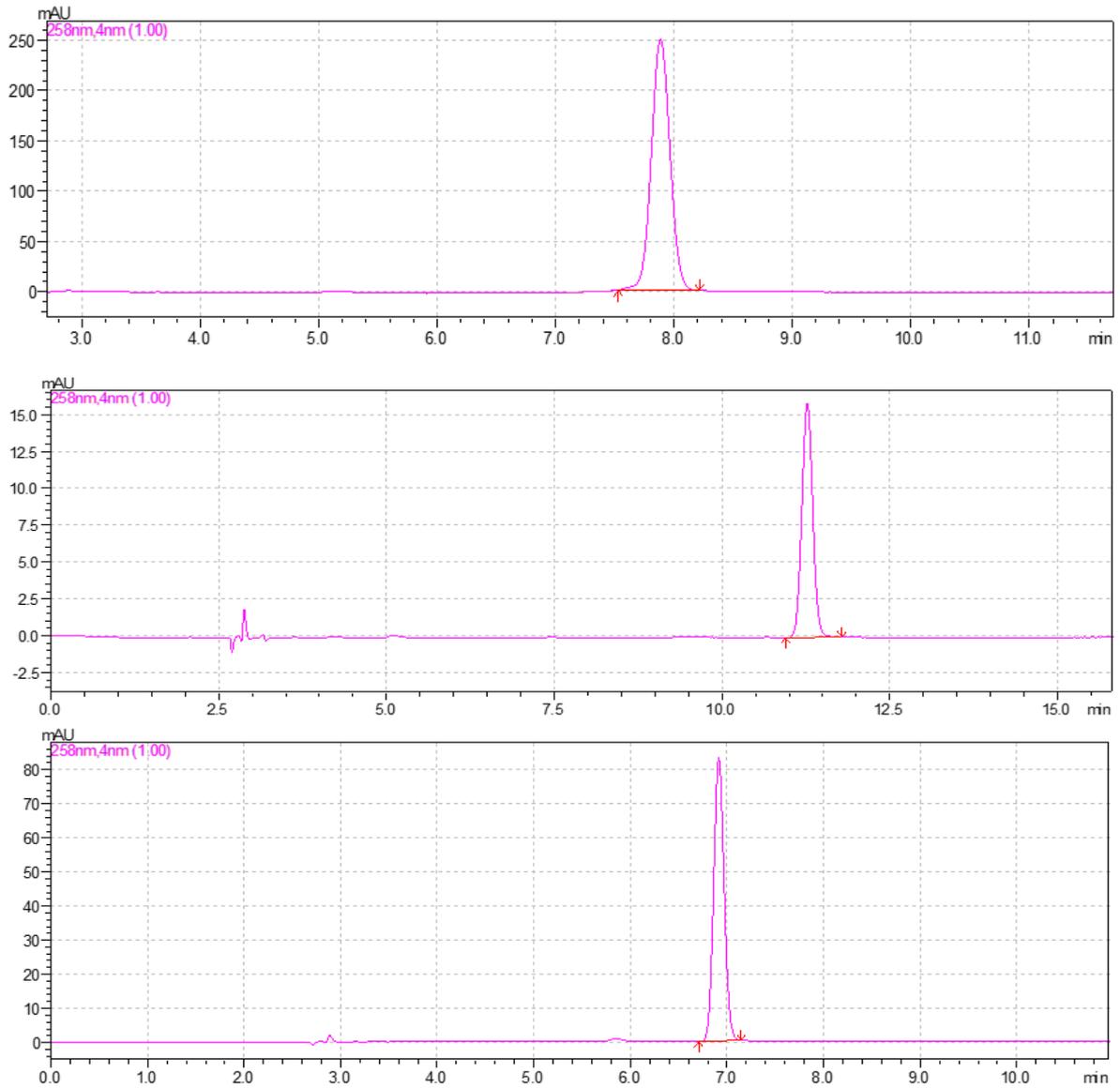
Референтное соединение	log P*
2-нитрофенол	1,80
Анизол	2,11
Бензол	2,13
Бензилхлорид	2,30
Толуол	2,73
Бромбензол	2,99
Этилбензол	3,15
Бензофенон	3,18
Тимол	3,30

\*Данные из руководства [122] и общедоступной базы данных PubChem [132]

Для проведения эксперимента были приготовлены растворы эталонных соединений, калия нитрата и 2-АБФПК в подвижной фазе. Концентрация соединений в растворе составила 200 мкг/мл.

ВЭЖХ-анализ проводили на обращенно-фазной колонке Luna C18(2) 100 А, 250×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex). При хроматографировании растворов учитывали требования Руководства [122]. В качестве подвижной фазы использовали смесь состава метанол – вода (70:30). Элюирование осуществляли в изократическом режиме со скоростью потока 1 мл/мин, температура термостата колонки – 40°С. Детектирование аналитов – спектрофотометрическое.

В указанных условиях референтные соединения, калия нитрат (несорбируемый компонент) и 2-АБФПК элюировались в виде симметричных пиков с воспроизводимыми временами удерживания и площадями. Каждый раствор анализировался в трехкратной повторности. Примеры хроматограмм 2 - АБФПК и референтных соединений представлены на рисунке 3.12.



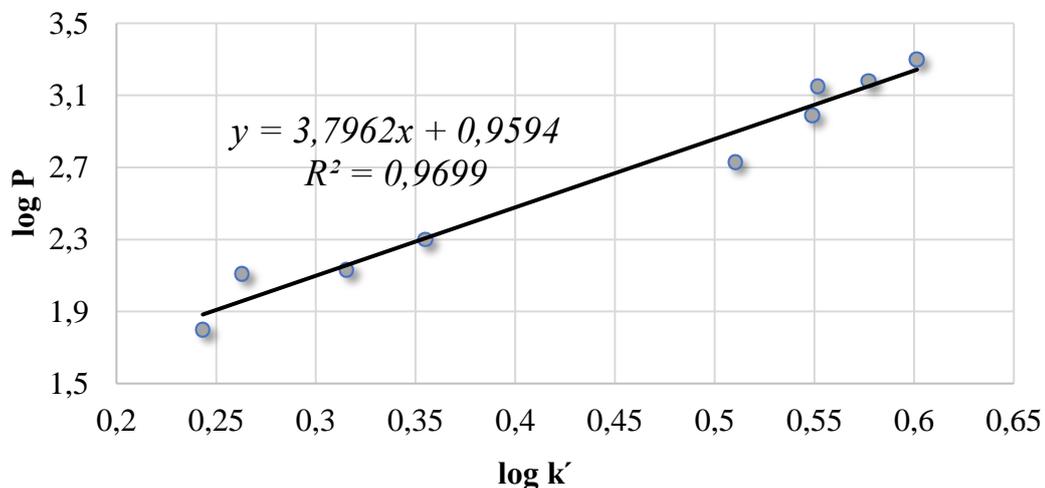
**Рис. 3.12 – Примеры хроматограмм, полученные при определении  $\log P$  методом ВЭЖХ (а – 2 -АБФПК; б – бромбензол; в – анизол)**

По результатам эксперимента для каждого референтного соединения и 2 - АБФПК были рассчитаны логарифмы коэффициентов ёмкости (таблица 3.13).

**Логарифмы коэффициентов ёмкости  
референтных соединений и 2 - АБФПК**

$log k' = log \left( \frac{t_R - t_0}{t_0} \right)$				
Соединение	$t_R$ , мин.	$t_0$ (KNO <sub>3</sub> ), мин	$log k'$	$log P$
2-нитрофенол	6,75	2,45	0,2433	1,80
Анизол	6,95		0,2630	2,11
Бензол	7,52		0,3155	2,13
Бензилхлорид	8,00		0,3548	2,3
Толуол	10,39		0,5102	2,73
Бромбензол	11,13		0,5488	2,99
Этилбензол	11,19		0,5516	3,15
Бензофенон	11,72		0,5771	3,18
Тимол	12,25		0,6015	3,3
<b>2 - АБФПК</b>	<b>7,94</b>		<b>0,3458</b>	<b>?</b>

С учетом полученных данных был построен график зависимости логарифма коэффициента ёмкости соединений от логарифма коэффициента удерживания (рис. 3.10).



**Рис. 3.13 – График зависимости логарифма коэффициента липофильности от логарифма коэффициента ёмкости**

Коэффициент корреляции составил  $R^2 = 0,9699$ , что соответствует требованиям Руководства (более 0,9).

Рассчитанное по уравнению графика линейной регрессии значение  $log P$  2-АБФПК составило 2,27.

Разница в результатах определения  $\log P$  двумя методами может объясняться следующими причинами. ОФ-ВЭЖХ является косвенным методом, поскольку в отличие «Shake-flask» - методики напрямую не измеряет распределение соединения между 2 фазами. ВЭЖХ позволяет определить липофильность по связанной хроматографической характеристике – коэффициенту ёмкости, что влечёт за собой возможные погрешности.

Другой причиной может быть и влияние выборки референтных соединений. Оптимальными референтами согласно руководству OECD являются структурно похожие вещества. Такие соединения в настоящее время недоступны, поскольку липофильность других 2-аминопирролкарбоксамидов не изучалась.

Тем не менее, полученные результаты соотносятся с теоретически рассчитанными значениями коэффициента липофильности. Экспериментальные значения  $\log P$  2-АБФПК находятся в диапазоне от 1,32 до 2,27, что позволяет характеризовать изучаемое соединение как умеренно липофильное и предположить его достаточную биодоступность при пероральном применении.

### **3.6 Микробиологическая чистота**

Микробиологическая чистота субстанции 2-АБФПК исследовалась в экспериментальной микробиологической лаборатории ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России под руководством к.фарм.н. Федоровой Т.В. в соответствии с требованиями ОФС.1.2.4.0002.18 для субстанций синтетического происхождения, предназначенных для производства нестерильных лекарственных препаратов (категория 2.2).

Установлено, что в проанализированных образцах субстанции (серии 0321; 0722; 0223) отсутствуют бактерии *Escherichia coli*, содержание аэробных микроорганизмов, плесневых и дрожжевых грибов соответствует фармакопейным требованиям.

*Нормативное требование:*

- общее число аэробных микроорганизмов – не более  $10^3$  КОЕ в 1 г (мл);
- общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более  $10^2$  КОЕ в 1 г (мл);
- отсутствие *Escherichia coli* в 1 г (мл).

### ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Изучены физические свойства нового биологически активного соединения 2-АБФПК. Субстанция представляет собой желтый мелкокристаллический порошок, растворимый в метаноле, практически не растворимый в воде, с температурой плавления в интервале от 215 до 217°C. Нормированы основные показатели качества субстанции: сульфатная зола (не более 0,1%), тяжелые металлы (не более 0,001%). Определены показатели «Потеря в массе при высушивании» и «Вода». Содержание воды в исследованных образцах не превышает 0,5%.
2. ИК-спектр субстанции подтверждает структуру 2-АБФПК: обнаруживаются полосы поглощения  $\text{NH}_2$ -группы, валентные колебания N-H незамещенной амидной группы и валентные колебания карбониллов и C=C связей. Метод ИК-спектроскопии рекомендован для подтверждения подлинности субстанции. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса ( $^1\text{H}$ -ЯМР) может использоваться как дополнительный метод идентификации 2-АБФПК.
3. Исследован характер поглощения 2-АБФПК в УФ-области спектра. Установлена зависимость УФ - спектра соединения от pH среды растворителя и природы растворителя. В «нейтральных» и «кислых» водных растворах УФ-спектр имеет 2 максимума поглощения при 223 нм и 250 нм, в метанольном растворе наблюдается bathochromic сдвиг полос поглощения и значительное увеличение интенсивности поглощения во втором максимуме (263 нм). Максимумы поглощения 2-АБФПК в «щелочных» растворах находятся при 216 нм и 336 нм. Изменение характера спектра в щелочной среде, а также способность соединения растворяться в растворах сильных щелочей свидетельствует о наличии слабокислотных свойств 2-АБФПК за счет амидно-имидольной таутомерии.
4. Изучено хроматографическое поведение 2-АБФПК на разделительной колонке с обращенно-фазным сорбентом. Установлено, что приемлемое значение коэффициента ёмкости наблюдается при содержании ацетонитрила в подвижной фазе от 35% до 50%. В качестве длины волны спектрофотометрического

детектирования выбрана длина 258 нм. Подтверждена линейность отклика детектора от концентрации 2-АБФПК в растворе в диапазоне от 1 до 500 мкг/мл.

5. Двумя независимыми методами (УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ), определена константа ионизации 2-АБФПК. Рассчитанные значения рКа (7,64 и 7,40, соответственно) сопоставимы и подтверждают наличие свойств слабой кислоты.

6. Изучено распределение 2-АБФПК в системе октанол – вода методом «встряхивания в колбе». Для определения содержания вещества в водной фазе использовался метод ВЭЖХ. Рассчитанные значения коэффициента липофильности ( $\log P$ ) 2-АБФПК находятся в диапазоне от 1,32 до 1,92.

7. Исходя из кислотно-основных свойств и липофильности, выбраны референтные соединения для определения  $\log P$  2-АБФПК методом ВЭЖХ. Рассчитанный коэффициент липофильности 2-АБФПК составил 2,27. Экспериментально установленные значения коэффициента липофильности 2-АБФПК согласуются с теоретически рассчитанными значениями и позволяют отнести его к умеренно липофильным соединениям.

8. Определена микробиологическая чистота субстанции 2-АБФПК. Установлено, что в испытанных образцах отсутствуют бактерии *Escherichia coli*, содержание аэробных бактерий, плесневых и дрожжевых грибов соответствует требованиям Государственной фармакопеи (XV изд.) для категории 2.2.

## ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА СУБСТАНЦИИ 2-АБФПК ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ «ПОДЛИННОСТЬ» И «КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ»

### 4.1 Химические методы анализа

#### 4.1.1 Разработка титриметрической методики количественного определения

Выбор метода количественного определения осуществлялся с учетом наличия в структуре 2-АБФПК нескольких реакционноспособных центров: первичной аминогруппы, незамещенной амидной группы, экзоциклической двойной связи, ковалентно связанного атома брома.

Были проведены эксперименты по изучению возможности применения потенциометрического ацидиметрического титрования в среде протогенного растворителя по первичной аминогруппе, связанной с гетероциклом. В качестве титранта использовали 0,1М раствор хлорной кислоты. Однако по результатам нескольких параллельных измерений не удалось однозначно установить конечную точку титрования, поскольку не наблюдалось скачка потенциала индикаторного электрода.

Отрицательный результат дали реакции электрофильного присоединения по экзоциклической двойной связи (реакции с бромом и йодом).

Была исследована возможность использования для количественного анализа видоизмененного метода Кьельдаля по незамещенной амидной группе в 3 положении пиррольного цикла 2-АБФПК. Но, несмотря на достаточное время минерализации и апробацию разных соотношений реагентов, результаты параллельных определений не были воспроизводимыми.

2-АБФПК содержит в своей структуре ковалентно связанный атом брома, который может быть количественно определен аргентометрическим методом после предварительной минерализации. Для 2-АБФПК был опробован способ восстановительной минерализации водородом в момент выделения, который рекомендован ГФ XIV издания для количественного определения бромкамфоры [131].

Минерализацию проводили с использованием смеси цинкового высокодисперсного порошка (5 мкм, 99%) и калия гидроксида раствора 30%.

Нами были апробированы несколько способов индикации конечной точки титрования:

1. методом Фаянса (адсорбционный индикатор – эозинат натрия, среда – уксуснокислая);
2. методом Фольгарда в модификации Кольтгофа (индикатор – железоаммонийные квасцы, среда – азотнокислая);
3. методом Мора (индикатор – калия хромат, среда – азотнокислая).

По результатам анализа серий субстанции 2-АБФПК, было установлено, титрование по варианту Фольгарда в модификации Кольтгофа приводит к завышенным результатам, количественное содержание ( $X$ , %) составило более 110%. Вариант титрования по Фаянсу показал более воспроизводимые результаты, однако  $X$ , % находилось в пределах 103 – 105%. Завышенные результаты количественного определения могут объясняться сложностью определения точки эквивалентности.

Использование метода Мора позволило достичь границ количественного содержания 2-АБФПК в разных сериях субстанций в пределах 99,1 – 100,7%.

Таким образом, для количественного определения 2-АБФПК в субстанции нами предложен argentометрический метод после предварительной минерализации.

#### Методика.

250 мг 2-АБФПК (точная навеска) растворяют в 25 мл метанола, добавляют 10 мл калия гидроксида раствора 30% и 2 г порошка цинка, кипятят в течение 60 минут с обратным холодильником. После кипячения холодильник промывают 5 мл спирта 95% и продолжают кипячение в течение 5 минут. Суспензию охлаждают до комнатной температуры и фильтруют в мерную колбу на 50 мл через фильтр «синяя лента». Фильтр промывают 10 мл воды. Доводят рН фильтрата до 7 уксусной кислотой разведённой 30%. Раствор в колбе доводят водой очищенной до метки и перемешивают.

10,0 мл раствора помещают в коническую колбу на 100 мл, добавляют 0,25 мл калия хромата 5% и титруют 0,01М раствором серебра нитрата до перехода окраски в оранжево-жёлтую.

Раствор серебра нитрата 0,01М готовят непосредственно перед титрованием путем разведения 0,1М раствора.

1 мл 0,01М раствора серебра нитрата соответствует 3,92 мг безводного 2-АБФПК ( $C_{17}H_{18}BrN_3O_3$ ).

Количественное содержание 2-АБФПК в субстанции (X, %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{T * K * (V - V_k) * 50 * 100 * 100}{a * (100 - W) * 10} = \frac{T * K * (V - V_k) * 50 * 100 * 10}{a * (100 - W)}$$

где,

$T$  – титр серебра нитрата по 2-АБФПК, мг/мл;

$K$  – поправочный коэффициент титранта,

$V$  – объем титрованного раствора серебра нитрата, пошедший на титрование,  $V_k$

– объем титрованного раствора серебра нитрата, пошедший на титрование контрольного опыта, мл;

$a$  – навеска субстанции 2-АБФПК, мг;

$W$  – содержание воды, %.

#### 4.1.2 Валидация титриметрической методики определения 2-АБФПК

Валидацию титриметрической методики аргентометрического титрования для количественного определения 2-АБФПК проводили по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность и прецизионность (как сходимость и внутрилабораторная прецизионность). Объектом исследования выступала серия субстанции 2-АБФПК 0922.

##### Специфичность

Для подтверждения специфичности методики титровали контрольный опыт (аликвоту раствора объемом 10 мл), который был приготовлен согласно разработанной методике без добавления субстанции 2-АБФПК.

Установлено, что на титрование «контрольного опыта» расходуется не более 0,10 мл титранта, что не влияет на результаты количественного определения 2-АБФПК.

### Линейность

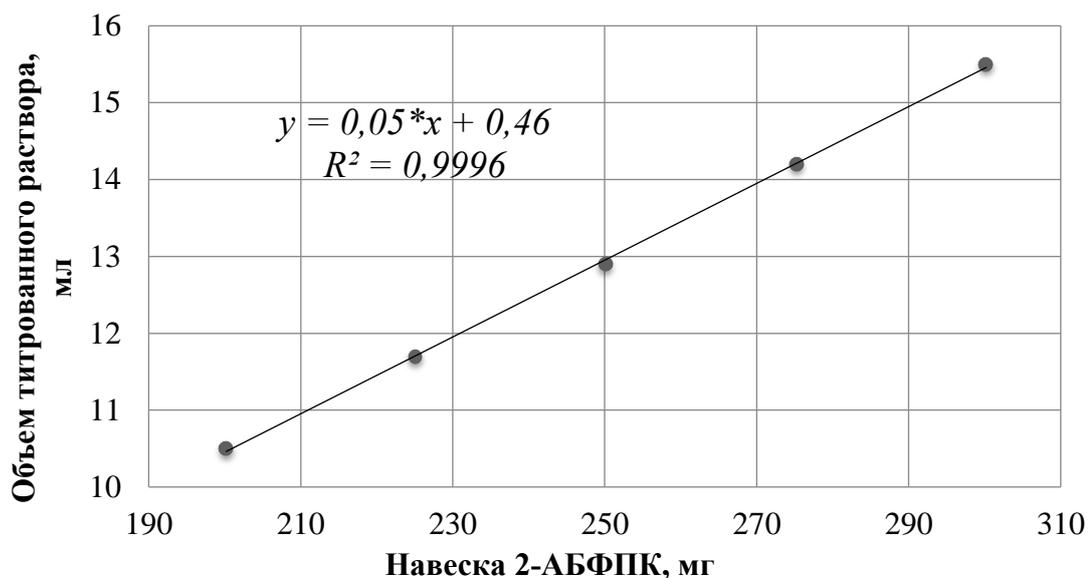
Линейность методики устанавливали путем определения зависимости между объемом 0,01М раствора серебра нитрата, пошедшего на титрование, и массой навески 2-АБФПК. Навеску субстанции для каждого уровня концентрации брали отдельно и осуществляли пробоподготовку в соответствии с разработанной методикой. Линейность исследовалась в диапазоне от 80 до 120% от номинальной массы навески 2-АБФПК (250 мг). Результаты титрования различных навесок субстанции для определения линейности представлены в таблице 4.1.

**Таблица 4.1**

**Результаты оценки линейности методики количественного определения 2-АБФПК в субстанции**

Навеска, мг	% от номинального значения	V титранта, мл	R <sup>2</sup>	b	a	t <sub>a</sub>
200,2	80,08	10,5	0,9996	0,05	0,4608	3,11
225,1	90,04	11,7				
250,1	100,04	12,9				
275,3	110,12	14,2				
300,2	120,08	15,5				
K <sub>ц</sub> = 0,9939; W = 0,28%; V <sub>к</sub> = 0,10 мл						

Калибровочный график представлен на рисунке 4.1.



**Рис. 4.1 – Калибровочный график количественного определения 2-АБФПК аргентометрическим методом**

Полученные данные подтверждают линейный характер зависимости объема титранта от навески 2-АБФПК в аналитической области методики. Значение  $t$ -критерия Стьюдента свободного члена уравнения линейной регрессии не превышает табличное:  $t_a < t_{\text{табл}} = 3,18$  ( $P = 95\%$ ,  $n = 5$ ). Рассчитанный коэффициент корреляции  $0,9996$  удовлетворяет критериям приемлемости (более  $0,99$ ).

#### Правильность

Правильность разработанной методики оценивали путем титрования навесок 2-АБФПК на 3 уровнях: 80, 100 и 120% от номинальной массы навески (250 мг). На каждом уровне проводили по три определения количественного содержания и рассчитывали открываемость ( $R$ ) 2-АБФПК в процентах. Результаты представлены в таблице 4.2.

Установлено, что открываемость 2-АБФПК при использовании разработанной методики находится в пределах 98 – 102%, истинное значение открываемости (100 %) находится внутри доверительного интервала среднего результата количественного определения.

**Оценка правильности методики количественного определения  
2-АБФПК в субстанции**

№	Введено, мг	Найдено, мг	Открываемость R, %	Метрологические характеристики
1	200,2	197,7	98,75	$R_{cp} = 99,84\%$ $SD = 1,01$ $RSD = 1,01 \%$ $\Delta R_{cp} = \pm 0,78$
2	195,7	196,8	100,56	
3	206,3	208,4	101,02	
4	251,8	248,4	98,65	
5	248,1	250,3	100,89	
6	254,9	254,2	99,73	
7	310,5	306,8	98,81	
8	289,6	292,2	100,90	
9	307,1	304,9	99,28	
<b>Критерий Стьюдента <math>t_{\text{расч.}} = 0,48 &lt; t_{\text{табл.}} = 2,31</math></b>				

Рассчитанное значение критерия Стьюдента (0,48) не превышает табличное значение (2,31), что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки и правильности разработанной методики.

Прецизионность

Прецизионность методики оценивали в двух вариантах: как сходимость, и как внутрилабораторная прецизионность. Эксперимент проводился двумя аналитиками на однородном образце субстанции 2-АБФПК (серия 0922, W = 0,28%), в разные дни с использованием разных наборов реагентов. Каждый аналитик проводил по 6 определений. Результаты количественного определения, полученные аналитиками, и их статистическая обработка представлены в таблице 4.3:

**Оценка прецизионности методики количественного определения  
2-АБФПК в субстанции**

Аналитик 1			Аналитик 2		
Навеска, мг	V титранта, мл (Kn = 0,9939)	X, %	Навеска, мг	V титранта, мл (Kn = 1,0001)	X, %
250,7	13,00	100,52	251,0	13,05	101,42
250,4	12,85	99,47	248,9	12,85	100,69
250,9	13,05	100,83	250,6	12,80	99,62
249,9	12,75	98,89	250,7	12,90	100,36
249,8	12,95	100,49	250,0	12,75	99,46
250,9	13,10	101,22	249,8	12,65	98,76
– (КО)*	0,10	–	– (КО)*	0,10	–
<b>X<sub>ср.</sub> = 100,24%</b>			<b>X<sub>ср.</sub> = 100,05%</b>		
<b>SD = 0,88</b>			<b>SD = 0,96</b>		
<b>RSD = 0,88%</b>			<b>RSD = 0,96%</b>		
<b>S<sup>2</sup> = 0,7744</b>			<b>S<sup>2</sup> = 0,9216</b>		
<b>Критерий Фишера: F<sub>расчѐт.</sub> = 1,19 &lt; F<sub>табл.</sub> = 5,05</b>					

\* контрольный опыт

Относительное стандартное отклонение результатов количественного определения, полученными каждым из аналитиков, не превышает 1%, что свидетельствует об удовлетворительной сходимости результатов.

Рассчитанный критерий Фишера не превышает табличных значений, следовательно, различия между результатами определений, проведенных двумя аналитиками, статистически незначимы, и разработанная методика обладает удовлетворительной внутрилабораторной прецизионностью.

Аналитическая область методики

Доказанный диапазон применения методики, в пределах которого методика обладает требуемой линейностью, правильностью и прецизионностью, составляет от 80 до 120% от номинального значения определяемой аналитической характеристики (содержания 2-АБФПК в субстанции).

## 4.2 Спектрофотометрия в УФ-области

### 4.2.1 Разработка методики

Исследования по разработке спектрофотометрической методики анализа соединения 2-АБФПК проводили с использованием в качестве растворителя метанола. Выбор растворителя обосновывался хорошей растворимостью соединения, наличием выраженного максимума поглощения в спектре метанольного раствора 2-АБФПК при 263 нм (рис. 4.2), а также практическим удобством приготовления испытуемых растворов, предусматривающим применение одного растворителя.

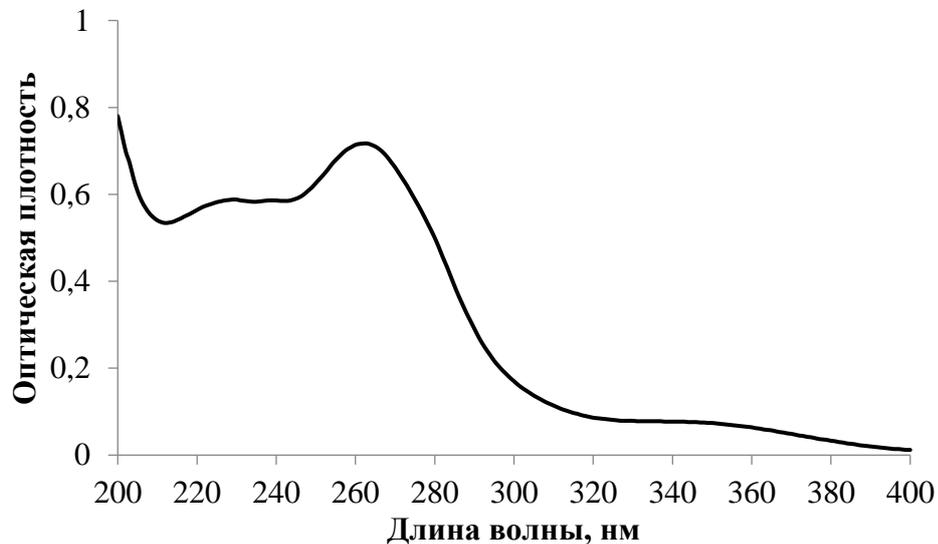


Рис. 4.2 – УФ-спектр 2-АБФПК в метаноле

Для расчета удельного показателя поглощения ( $A^{1\%}_{1\text{см}}$ ) было приготовлено 5 метанольных растворов в диапазоне концентраций от 2,5 до 15 мкг/мл:

0,0508 г субстанции 2-АБФПК помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 20 мл метанола, доводили до метки тем же растворителем и перемешивали. Затем по 0,25; 0,5; 1,0; 1,25 и 1,5 мл полученного раствора переносили в мерные колбы вместимостью 100 мл и доводили до метки метанолом. Далее измеряли оптическую плотность растворов при длине волны 263 нм в кварцевых кюветах (толщина слоя 10 мм) и рассчитывали  $A^{1\%}_{1\text{см}}$  (таблица 4.4).

Таблица 4.4

## Расчет удельного показателя поглощения 2-АБФПК

Концентрация 2-АБФПК		Оптическая плотность*	Удельный показатель поглощения
мкг/мл	%		
2,54	0,000254	0,135	531
5,08	0,000508	0,274	539
10,16	0,001016	0,554	545
12,70	0,001270	0,687	541
15,24	0,001524	0,828	543
			среднее значение <b>539,8</b>

\* – среднее 3 определений.

Постоянство значения  $A^{1\%}_{1\text{см}}$  2-АБФПК свидетельствует о соблюдении основного закона светопоглощения.

Для определения стабильности исследуемого соединения в растворах измеряли оптическую плотность раствора с концентрацией 0,001016% в течение 1 часа с интервалом 10 минут (таблица 4.5).

Таблица 4.5

## Определение стабильности оптической плотности раствора 2-АБФПК

Время, мин	Оптическая плотность*
0	0,545
10	0,547
20	0,544
30	0,547
40	0,543
50	0,542
60	0,548

\*среднее 3 определений.

Полученные результаты доказывают стабильность испытуемого раствора 2-АБФПК.

Таким образом, для доказательства подлинности и количественного определения 2-АБФПК в субстанции методом УФ-спектрофотометрии предложена следующая методика:

около 0,05 г (точная навеска) субстанции (стандартного образца) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл метанола, доводят

объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают (раствор А). 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до метки метанолом (раствор Б). Концентрация 2-АБФПК в растворе Б составляет 0,001%. Оптическую плотность испытуемых и стандартных растворов измеряют при длине волны 263 нм в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения – метанол.

Для идентификации 2-АБФПК используют УФ-спектры. УФ-спектры поглощения стандартного раствора 2-АБФПК и испытуемого раствора в области от 220 до 400 нм должны иметь максимумы и минимумы при одних и тех же длинах волн.

Количественное содержание основного вещества в субстанции (X, %) рассчитывают по следующей формуле:

$$X = \frac{A_x * a_0 * 50 * 100 * 100 * P * 100}{A_0 * a_x * 50 * 100 * 100 * (100 - W)} = \frac{A_x * a_0 * P * 100}{A_0 * a_x * (100 - W)}$$

где,

$A_x$  – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_0$  – оптическая плотность раствора стандартного образца;

$a_x$  – навеска субстанции, в граммах;

$a_0$  – навеска стандартного образца, в граммах;

$P$  – содержание 2-АБФПК в стандартном образце, %;

$W$  – содержание воды, %.

#### **4.2.2 Валидация методики количественного определения 2-АБФПК в субстанции методом УФ-спектрофотометрии**

Методика спектрофотометрического определения 2-АБФПК была валидирована по показателям специфичность, линейность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная воспроизводимость), правильность, аналитическая область.

В качестве стандартного образца использовали субстанцию 2-АБФПК, дважды перекристаллизованную из этанола и высушенную до постоянной массы (серия 0922, W – 0,28%).

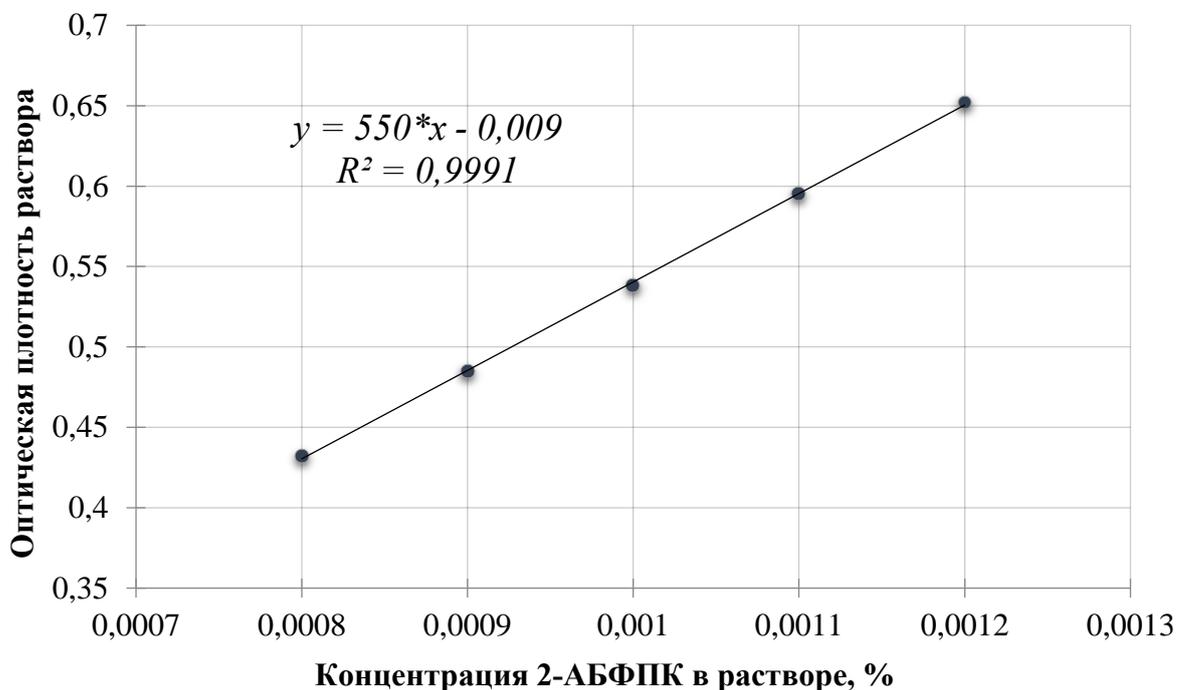
### Специфичность

Оценку специфичности проводили путем сравнения спектров испытуемых растворов с УФ-спектром стандартного образца 2-АБФПК. Наблюдалось соответствие положений максимума поглощения при 263 нм, минимума при 213 нм и плато в области от 227 до 244 нм.

### Линейность

Для определения линейности готовили и анализировали пять калибровочных растворов в диапазоне от 80 до 120% от номинальной концентрации 2-АБФПК в испытуемом растворе (0,001%). Оптическую плотность (A) растворов измеряли при максимуме поглощения 263 нм.

Калибровочный график приведен на рисунке 4.3.



**Рис. 4.3 – Калибровочный график количественного определения 2-АБФПК методом УФ-спектрофотометрии**

Полученные данные подтверждают линейную зависимость оптической плотности от концентрации 2-АБФПК в растворе в пределах аналитической

области методики (8 – 12 мкг/мл). Уравнение графика имеет вид  $A = 550 \cdot C - 0,009$  (где  $A$  – оптическая плотность раствора,  $C$  – концентрация 2-АБФПК в растворе (%)). Коэффициент корреляции составил 0,9991, что соответствует фармакопейным требованиям, предъявляемым к методикам количественного определения.

### Правильность

Правильность методики устанавливали путем анализа модельных растворов с концентрациями 2-АБФПК, соответствующих 80, 100 и 120% от номинального содержания в испытуемом растворе. Для каждого уровня концентрации готовили по три испытуемых раствора. По результатам количественного определения рассчитывали величину обнаруживаемости ( $R$ ) соединения 2-АБФПК (таблица 4.6).

**Таблица 4.6**

### Оценка правильности методики

№	Введено, $c$	$A_x^*$	Найдено, $c$	Обнаруживаемость $R, \%$	Метрологические характеристики
1	0,0410	0,433	0,0405	98,71	$R_{cp} = 99,62\%$ $SD = 0,84$ $RSD = 0,84\%$ $\Delta R_{cp} = \pm 0,65\%$ <b>t-критерий</b> <b>Стьюдента</b> <b>(расчет.) = 1,36</b>
2	0,0396	0,420	0,0393	99,14	
3	0,0408	0,432	0,0404	98,97	
4	0,0498	0,535	0,0500	100,42	
5	0,0511	0,550	0,0514	100,60	
6	0,0528	0,561	0,0524	99,31	
7	0,0636	0,674	0,0630	99,06	
8	0,0604	0,653	0,0610	101,05	
9	0,0621	0,660	0,0617	99,34	
$a_0: 0,0544$ г $A_0: 0,582$					

\*среднее 3 определений

Установлено, что при использовании разработанной спектрофотометрической методики обнаруживаемость соединения 2-АБФПК находится в пределах 98 – 102%, истинное значение обнаруживаемости (100%) лежит внутри доверительных интервалов средних результатов анализа. Расчетное значение критерия Стьюдента не превышает табличного значения (2,31), что

указывает на отсутствие значимой систематической ошибки и соответствие методики требованиям по параметру правильность.

### Прецизионность

Двумя аналитиками в разные дни с использованием разных реактивов было проведено определение количественного содержания 2-АБФПК в однородном образце субстанции. Объектом исследования при оценке сходимости и прецизионности методики выступала серия субстанции 2-АБФПК 0521 ( $W = 0,32\%$ ). В качестве стандартного образца использовали очищенную субстанцию серии 0922 (содержание основного вещества, определенное аргентометрическим методом:  $100,05\%$  (п.4.1.2)). Результаты 6 параллельных определений каждого из аналитиков и их метрологическая оценка представлены в таблицах 4.7 и 4.8.

**Таблица 4.7**

**Результаты количественного определения 2-АБФПК в субстанции методом УФ-спектрофотометрии**

<b>Аналитик 1</b>						
<b>№</b>	<b><math>a_x, \varepsilon</math></b>	<b><math>a_x, \varepsilon</math> (без учета содержания воды)</b>	<b><math>A_x^*</math></b>	<b><math>a_0, \varepsilon</math></b>	<b><math>A_0^*</math></b>	<b>Содержание, %</b>
1	0,0525	0,0523	0,561	0,0509	0,545	100,17
2	0,0547	0,0545	0,598	0,0488	0,536	99,89
3	0,0521	0,0519	0,553	0,0551	0,581	101,04
4	0,0568	0,0566	0,612	0,0526	0,569	99,96
5	0,0512	0,0510	0,549	0,0494	0,531	100,14
6	0,0575	0,0573	0,615	0,0548	0,592	99,35
<b>Аналитик 2</b>						
<b>№</b>	<b><math>a_x, \varepsilon</math></b>	<b><math>a_x, \varepsilon</math> (без учета содержания воды)</b>	<b><math>A_x^*</math></b>	<b><math>a_0, \varepsilon</math></b>	<b><math>A_0^*</math></b>	<b>Содержание, %</b>
1	0,0531	0,0529	0,561	0,0533	0,568	99,51
2	0,0510	0,0508	0,547	0,0504	0,542	100,11
3	0,0552	0,0550	0,590	0,0491	0,528	99,76
4	0,0578	0,0576	0,618	0,0522	0,559	100,21
5	0,0568	0,0566	0,611	0,0524	0,564	100,31
6	0,0530	0,0528	0,561	0,0517	0,551	99,69

\*среднее 3 определений

**Метрологическая оценка результатов количественного определения  
2-АБФПК в субстанции**

Аналитик 1				Аналитик 2			
$X_{\text{ср}}, \%$	SD	RSD, %	$S^2$	$X_{\text{ср}}, \%$	SD	RSD, %	$S^2$
100,09	0,55	0,55	0,3025	99,93	0,32	0,32	0,1024
<b>Критерий Фишера: <math>F_{\text{расчет.}} = 2,95 &lt; F_{\text{табл}} = 5,05</math></b>							

Полученные данные демонстрируют удовлетворительную сходимость результатов каждого из аналитиков (RSD среднего результата не превышает 0,55%). Рассчитанный критерий Фишера не превышает табличного значения, следовательно, средние результаты количественного определения, полученные двумя аналитиками, статистически достоверно не отличаются друг от друга.

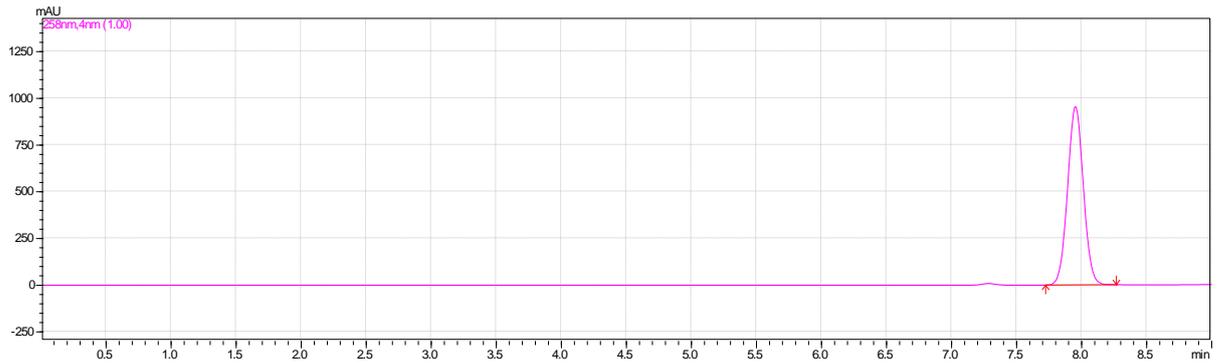
Аналитическая область методики

Валидационная оценка методики количественного определения 2-АБФПК в субстанции методом УФ-спектрофотометрии показала соответствие показателей линейности, правильности и прецизионности фармакопейным требованиям в интервале от 80 до 120% от номинального содержания 2-АБФПК в испытуемом растворе (0,0008 – 0,0012 %).

### 4.3 Высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием

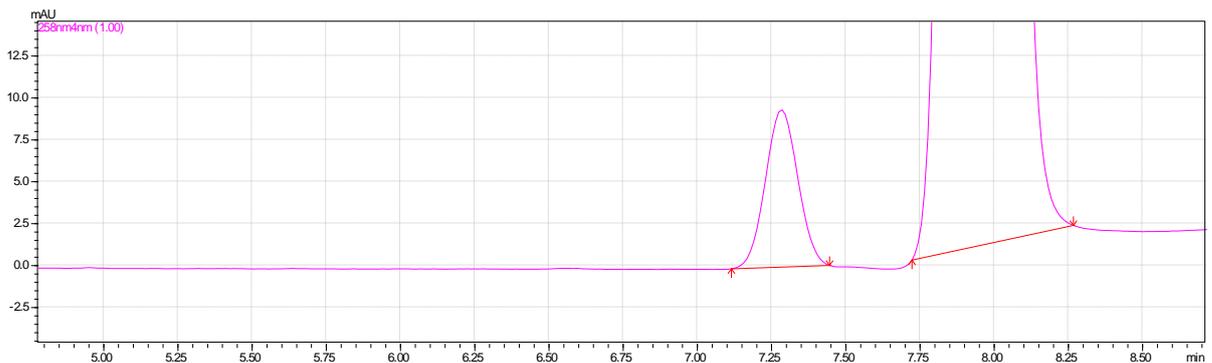
#### 4.3.1 Разработка методики

Исследования по изучению хроматографического поведения 2-АБФПК на обращенно-фазном сорбенте, представленные в разделе 3.4, показали, что соединение элюируется в виде симметричного пика при использовании «кислых» и «нейтральных» элюентов с содержанием ацетонитрила в диапазоне от 35 до 50%. В качестве подвижной фазы для разработки ВЭЖХ-методики была выбрана смесь ацетонитрил – фосфатный буфер (рН 6,8). С целью уменьшения времени анализа содержание органического компонента в хроматографической системе увеличили до 50%. Соответствующая хроматограмма представлена на рисунке 4.4. Время удерживания 2-АБФПК составило 7,95 мин.



**Рис. 4.4 – Хроматограмма метанольного раствора 2-АБФПК с концентрацией 200 мкг/мл**

Коэффициент разделения между пиком 2-АБФПК и пиком ближайшей примесей составил более 2,915 (рис. 4.5). Следовательно, примесь не будет влиять на результаты количественного определения.



**Рис. 4.5 – Разделение пиков 2-АБФПК и ближайшей примеси на хроматограмме испытуемого раствора для количественного определения**

Разработанные хроматографические условия были положены в основу методики контроля качества субстанции 2-АБФПК по показателям «Подлинность» и «Количественное определение».

*Приготовление испытуемого раствора и раствора стандартного образца:* около 0,025 г (точная навеска) субстанции (или стандартного образца) помещают в мерную колбу на 25 мл, растворяют в 10 мл метанола, доводят объем раствора тем же растворителем до метки. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 10 мл, доводят объем раствора метанолом до метки, перемешивают и

фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата.

Хроматографируют раствор стандартного образца, получая не менее 5 хроматограмм, и испытуемый раствор, получая не менее 3 хроматограмм в следующих условиях:

<i>Хроматографическая колонка</i>	Luna C18(2) 100 А, 250×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex) или аналогичная
<i>Подвижная фаза</i>	фосфатный буфер с рН 6,8 – ацетонитрил (50:50)
<i>Режим элюирования</i>	изократический
<i>Температура термостата колонки</i>	40°С
<i>Скорость потока</i>	1 мл/мин
<i>Детектор</i>	спектрофотометрический, 258 нм
<i>Объем вводимой пробы</i>	10 мкл

Идентификацию проводят по времени удерживания. Время удерживания пика 2-АБФПК на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика на хроматограмме стандартного раствора.

Количественное содержание основного вещества в субстанции (%) рассчитывают по следующей формуле:

$$X = \frac{S_x * a_0 * 25 * 10 * 100 * P * 100}{S_0 * a_1 * 25 * 10 * 100 * (100 - W)} = \frac{S_x * a_0 * P * 100}{S_0 * a_1 * (100 - W)}$$

где,

$S_x$  – площадь пика 2-АБФПК на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика 2-АБФПК на хроматограмме раствора стандартного образца;

$a_1$  – навеска субстанции, в граммах;

$a_0$  – навеска стандартного образца, в граммах;

$P$  – содержание 2-АБФПК в стандартном образце, %;

$W$  – содержание воды, %.

### 4.3.2 Валидация методики количественного определения 2-АБФПК в субстанции методом ВЭЖХ-УФ

#### Специфичность методики

Для подтверждения специфичности методики хроматографировали подвижную фазу и растворитель. На хроматограммах растворителя и подвижной фазы отсутствовали пики на времени удерживания пика 2-АБФПК.

#### Проверка пригодности хроматографической системы

Пригодность хроматографической системы оценивали путем пятикратного хроматографирования раствора стандартного образца. Рассчитанные хроматографические параметры пика 2-АБФПК представлены в таблице 4.9.

**Таблица 4.9**

#### **Результаты оценки пригодности хроматографической системы**

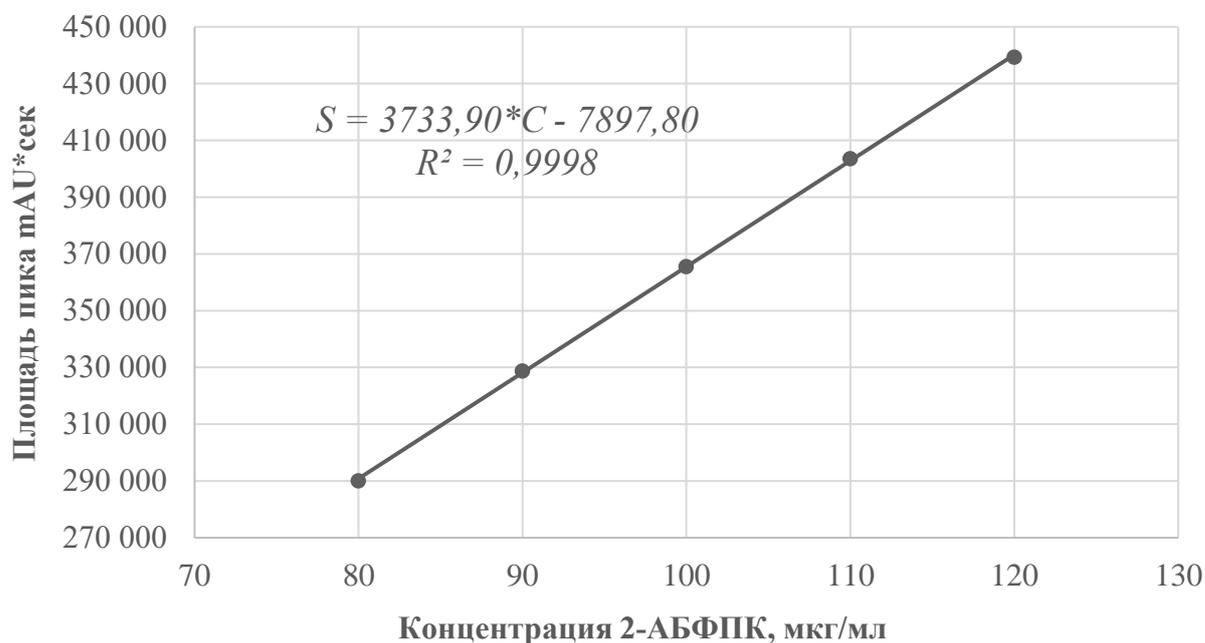
<b>№</b>	<b>S пика 2-АБФПК, mAU*сек</b>	<b>N, ТТ</b>	<b>A<sub>s</sub></b>
1	365 533	15 768	1,102
2	364 802	15 222	1,089
3	365 120	16 013	1,093
4	365 444	15 804	1,115
5	365 089	15 921	1,082
	<i>X<sub>ср.</sub> = 365 197,60</i> <i>SD = 294,75</i> <i>RSD = 0,08%</i>		

По результатам проведенного эксперимента нами предложены следующие критерии приемлемости хроматографической системы:

- относительное стандартное отклонение площади пика 2-АБФПК на хроматограмме стандартного образца для пяти повторных введений не более 2,0 %;
- фактор асимметрии пиков не более 1,5;
- эффективность колонки, рассчитанная по пику 2-АБФПК, не менее 2000 теоретических тарелок.

### Линейность

Линейность методики количественного определения устанавливали путем определения зависимости между концентрацией 2-АБФПК и площадью пика на хроматограммах калибровочных растворов в интервале концентраций 80 – 120% относительно концентрации 2-АБФПК в испытуемом растворе. Для этого готовили метанольные растворы с концентрациями соединения: 80; 90; 100; 110; 120 мкг/мл. Растворы анализировали в разработанных условиях. Калибровочный график представлен на рисунке 4.6.



**Рис. 4.6 – График зависимости площади хроматографического пика 2-АБФПК от концентрации 2-АБФПК**

Между концентрацией 2-АБФПК и площадью хроматографического пика соблюдается линейная зависимость. Коэффициент корреляции составил 0,9998, что соответствует требованиям ГФ XV изд.

### Правильность

Для оценки правильности методики было приготовлено 9 модельных испытуемых растворов на 3 уровнях концентрации, соответствующих 80, 100 и 120% от номинального содержания 2-АБФПК в растворе согласно разработанной

методике. Определяли количественное содержание 2-АБФПК и рассчитывали величину открываемости (R). Данные представлены в таблице 4.10:

Таблица 4.10

## Результаты оценки правильности методики

№	Введено, г	S пика, mAU*сек	Найдено, г	Открываемость R, %
1	0,0205	297 887	0,0206	100,49
2	0,0209	299 874	0,0207	99,04
3	0,0203	291 564	0,0202	99,51
4	0,0250	365 590	0,0253	101,2
5	0,0256	365 497	0,0253	98,83
6	0,0254	365 111	0,0253	99,61
7	0,0304	437 471	0,0303	99,67
8	0,0301	440 941	0,0305	101,33
9	0,0308	440 856	0,0305	99,03
$a_0: 0,0252 \text{ г}$ $S_0: 364 201$				$R_{cp} = 99,86\%$ $SD = 0,94$ $RSD = 0,94\%$ $\Delta R_{cp} = \pm 0,72$
<b>Критерий Стьюдента <math>t_{расчет.} = 0,45 &lt; t_{табл} = 2,31</math></b>				

Таким образом, при использовании разработанной методики количественного определения открываемость 2-АБФПК находится в пределах 98 – 102 %, истинное значение содержания соединения (100%) лежит внутри доверительных интервалов средних результатов анализа. Расчетное значение критерия Стьюдента не превышает табличного значения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки. Следовательно, разработанная методика валидна по параметру «правильность».

Прецизионность

Повторяемость и внутрилабораторную прецизионность разработанной методики определяли путем анализа однородного образца субстанции 2-АБФПК (серия 0223, содержание воды 0,32%) двумя аналитиками в разные дни. Каждый аналитик проводил количественное определение основного вещества в субстанции в шестикратной повторности.

В качестве стандартного образца использовалась субстанция 2-АБФПК (серия 0922, содержание 100,05%).

Результаты, полученные каждым из аналитиков, и их метрологическая обработка представлены в таблицах 4.11 и 4.12.

Таблица 4.11

## Результаты оценки прецизионности методики

Аналитик 1					
№	$a_x, \text{г}$	$S_x^*, \text{mAU}^*\text{сек}$	$a_0, \text{г}$	$S_0^*, \text{mAU}^*\text{сек}$	Содержание, %
1	0,02511	365 548	0,02514	364 392	100,81
2	0,02502	364 421	0,02506	363 095	100,90
3	0,02551	366 998	0,02544	368 755	99,62
4	0,02542	367 457	0,02537	367 582	100,14
5	0,02539	369 875	0,02499	362 499	100,80
6	0,02502	362 547	0,02519	364 978	100,38
Аналитик 2					
№	$a_x, \text{г}$	$S_x^*, \text{mAU}^*\text{сек}$	$a_0, \text{г}$	$S_0^*, \text{mAU}^*\text{сек}$	Содержание, %
1	0,02529	368 103	0,02526	366 429	100,71
2	0,02521	364 415	0,02539	368 011	100,10
3	0,02524	362 215	0,02507	362 962	99,49
4	0,02569	371 156	0,02516	364 959	99,97
5	0,02572	370 251	0,02551	369 626	99,72
6	0,02548	366 741	0,02525	366 429	99,55

\*среднее 3 определений

Таблица 4.12

Метрологическая оценка результатов количественного определения  
2-АБФПК в субстанции методом ВЭЖХ-УФ

Аналитик 1				Аналитик 2			
$X_{\text{ср}}, \%$	SD	RSD, %	$S^2$	$X_{\text{ср}}, \%$	SD	RSD, %	$S^2$
100,44	0,50	0,50	0,2500	99,92	0,45	0,45	0,2025
<b>Критерий Фишера: <math>F_{\text{расчет.}} = 1,23 &lt; F_{\text{табл}} = 5,05</math></b>							

Установлено, что относительное стандартное отклонение результатов количественного определения, полученными каждым из аналитиков, не превышает 1%, что свидетельствует об удовлетворительной сходимости методики. Рассчитанный критерий Фишера не превышает табличное значение, следовательно, различия между результатами определений, проведенных двумя аналитиками статистически незначимы.

Аналитическая область методики

По результатам проведенных валидационных испытаний методики качественного и количественного определения 2-АБФПК установлено, что методика ВЭЖХ специфична, позволяет получать точные и воспроизводимые результаты в пределах аналитической области (80 – 120 мкг/мл).

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. Разработана методика аргентометрического титрования 2-АБФПК в субстанции по ковалентно связанному атому брома с индикацией конечной точки титрования методом Мора. В результате валидации доказано, что методика специфична, линейна в диапазоне от 80 до 120% от номинальной массы навески соединения (коэффициент корреляции  $R^2 = 0,9996$ ). Открываемость 2-АБФПК находится в пределах 98 – 102%. Экспериментально рассчитанные RSD (%) результатов количественного определения (менее 1%) и критерий Фишера (1,19) свидетельствует об удовлетворительной сходимости и внутрилабораторной прецизионности методики.

2. Наличие выраженного максимума поглощения в спектре метанольного раствора 2-АБФПК ( $\lambda_{\max}$  263нм), высокое значение показателя удельного поглощения ( $E^{1\%}_{1\text{см}}$  540), а также стабильность значений оптической плотности, позволило использовать собственное поглощение 2-АБФПК для разработки спектрофотометрической методики оценки качества субстанции по показателям «Подлинность» и «Количественное определение». Методика обладает специфичностью, линейностью в аналитическом диапазоне 8 – 12 мкг/мл (коэффициент корреляции  $R^2 = 0,9991$ ). Методика обеспечивает правильные и воспроизводимые результаты: истинное значение открываемости 2-АБФПК лежит внутри доверительных интервалов средних результатов анализа ( $99,62 \pm 0,65$ ); сходимость результатов (RSD (%)) не превышает 0,55%; критерий Фишера (2,95), рассчитанный при оценке внутрилабораторной воспроизводимости, не превышает табличного значения.

3. Разработана методика оценки показателей «Подлинность» и «Количественное определение» 2-АБФПК в субстанции методом обращенно-фазной ВЭЖХ-УФ с использованием подвижной фазы состава фосфатный буфер с рН 6,8 – ацетонитрил (50:50). При проведении валидации методики установлены: специфичность разработанных хроматографических условий, линейность отклика детектора в диапазоне концентраций от 80 до 120 мкг/мл (коэффициент корреляции  $R^2 = 0,9998$ ), правильность и прецизионность получаемых результатов

(открываемость 2-АБФПК с учетом доверительных интервалов находится в пределах  $99,86 \pm 0,72$ ; RSD (%) результатов анализа не превышает 0,5%; расчетный критерий Фишера (1,23) не превышает критического значения).

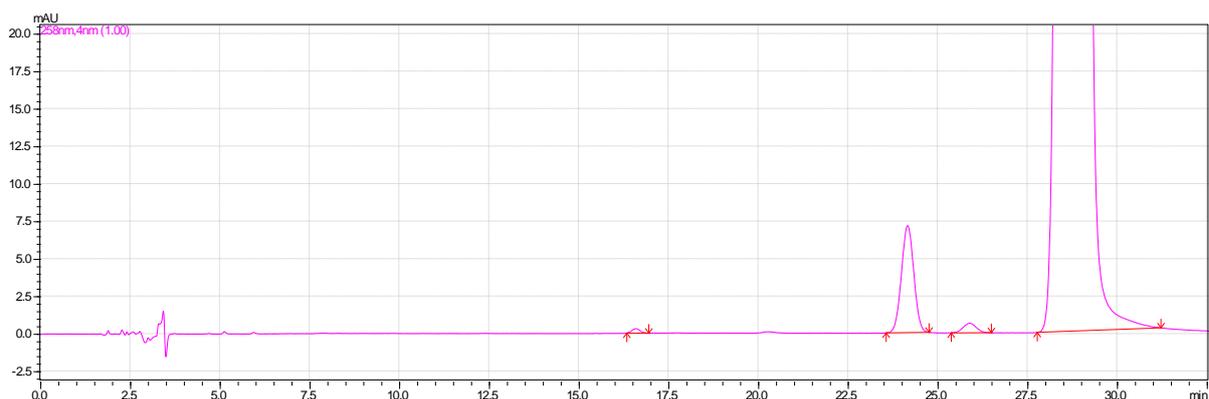
## ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ РОДСТВЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ И ОСТАТОЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

### 5.1. Определение родственных примесей 2-АБФПК методом ВЭЖХ

#### 5.1.1 Разработка методики определения родственных примесей в субстанции 2-АБФПК методом ВЭЖХ

При анализе метанольного раствора с высокой концентрацией 2-АБФПК (2 мг/мл) с использованием подвижной фазы состава фосфатный буфер с рН 6,8 – ацетонитрил на хроматограмме наблюдали наличие пиков примесей. Наиболее четкое разделение хроматографического пика основного вещества и пиков примесей наблюдалось при содержании 35 % ацетонитрила в элюенте. Детектирование проводили при длине волны 258 нм. Соответствующая хроматограмма представлена на рисунке 5.1.

Пригодность предлагаемых условий ВЭЖХ для разделения родственных примесей в субстанции соединения подтверждается удовлетворительными значениями показателей разрешения, эффективности хроматографической системы, симметрии пиков (таблица 5.1).

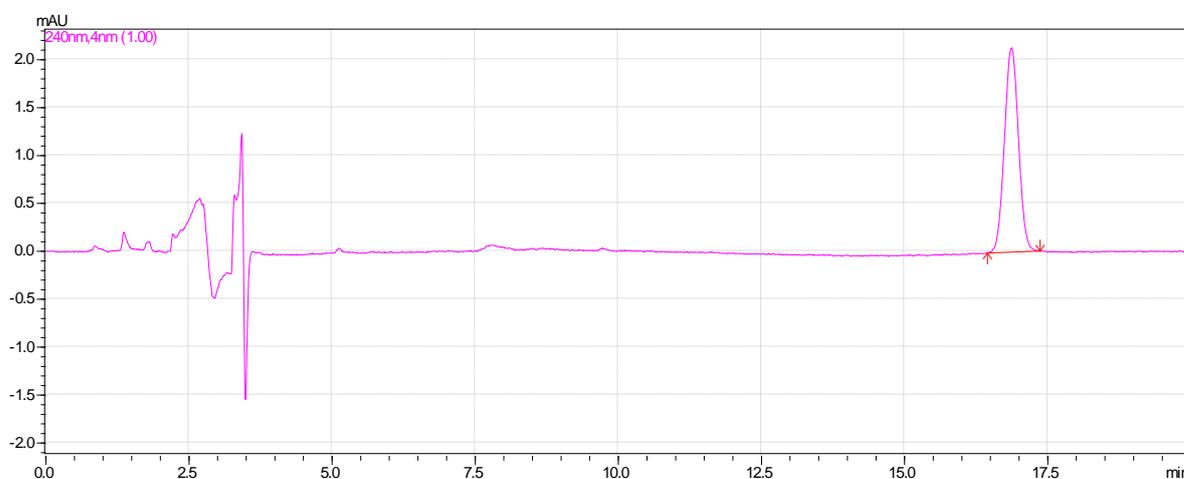


**Рис. 5.1 – Хроматограмма метанольного раствора 2-АБФПК  
(2 мг/мл)**

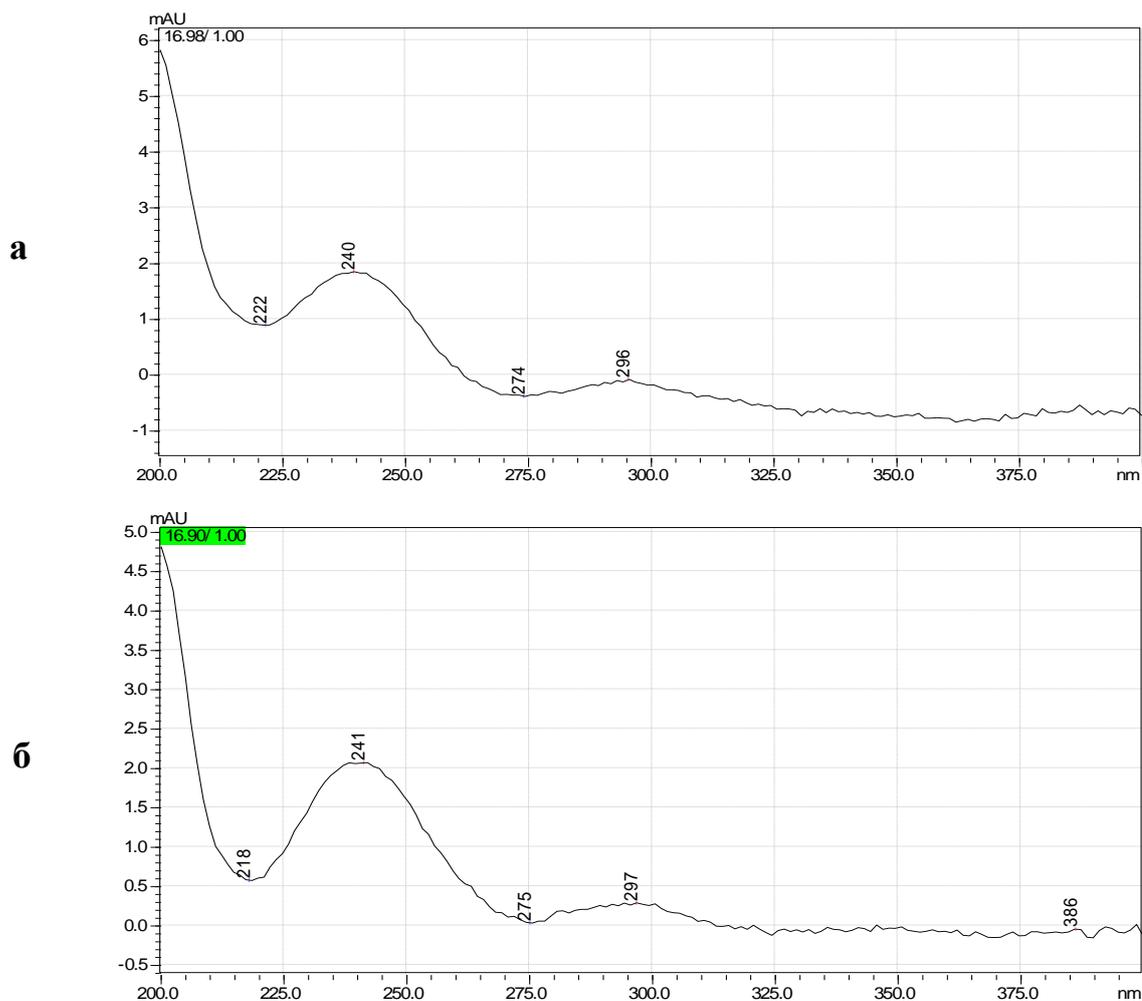
**Параметры пригодности хроматографических условий**

Разделяемые компоненты	$t_R$ , мин	RRT	$A_s$	$R_s$	N, ТТ
Примесь 1	16,84	0,60	1,00	--	23 241
Примесь 2	23,85	0,85	1,02	13,06	22 798
Примесь 3	25,53	0,91	1,03	2,58	23 370
2-АБФПК	28,17	1,00	0,97	3,73	22 681

Примесь 1 была идентифицирована как 4-броманилин (4-БА), который используется на одной из стадий синтеза субстанции. Идентификация проводилась по совпадению времен удерживания пиков 4-БА на хроматограмме его стандартного раствора с концентрацией 2 мкг/мл (рис. 5.2) и хроматограмме испытуемого раствора 2-АБФПК (2 мг/мл), а также совпадению УФ-спектров (рис. 5.3). УФ-спектры 4-БА в испытуемом и стандартном растворе характеризовались максимумами поглощения при  $240 \pm 2$  нм и  $293 \pm 2$  нм.



**Рис. 5.2 – Хроматограмма метанольного раствора 4-броманилина (2 мкг/мл)**



**Рис. 5.3 – Сравнение УФ-спектров 4-БА в стандартном растворе (а) и в испытуемом растворе 2-АБФПК (б)**

На этапе разработки методики была проанализирована серия 0521 субстанции 2-АБФПК по показателю «Родственные примеси». Расчет содержания примесей проводили методом внешнего стандарта, используя в качестве раствора сравнения разведение основного соединения (концентрация 2 мкг/мл, что составляет 0,1% от содержания 2-АБФПК в испытуемом растворе (2 мг/мл)).

Концентрацию каждой примеси (С, %) рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{S * C_0}{S_0}$$

где,

$S$  – площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика 2-АБФПК на хроматограмме раствора сравнения;

$C_0$  – концентрация 2-АБФПК в растворе сравнения.

Содержание 4-БА составило 0,007 %, примеси с RRT 0,85 – 0,31%, примеси с RRT 0,91 – 0,13%.

Учитывая высокое содержание неидентифицированных примесей, было принято решение провести дополнительную очистку субстанции. Схема синтеза 2-АБФПК предусматривает очистку соединения путем перекристаллизации из абсолютного этилового спирта. Поскольку 2-АБФПК имеет хорошую растворимость в горячем ацетонитриле, нами была предпринята попытка использовать данный растворитель для перекристаллизации субстанции.

Очищенная таким образом субстанция была повторно проанализирована по показателю «Родственные примеси». Полученные результаты (таблица 5.2) показывают, что после дополнительной очистки содержание примеси с RRT 0,85 снижается более чем в 2 раза, примесь с RRT 0,91 не обнаруживается.

Таблица 5.2

#### Содержание примесей в субстанции 2-АБФПК

Примесь	Содержание (%)	
	Без дополнительной очистки	С дополнительной очисткой
4-броманилин	0,007 %	0,007 %
RRT 0,85	0,41 %	0,14 %
RRT 0,91	0,13 %	Не обнаружена

Хроматограмма раствора очищенной субстанции представлена на рисунке 5.4.

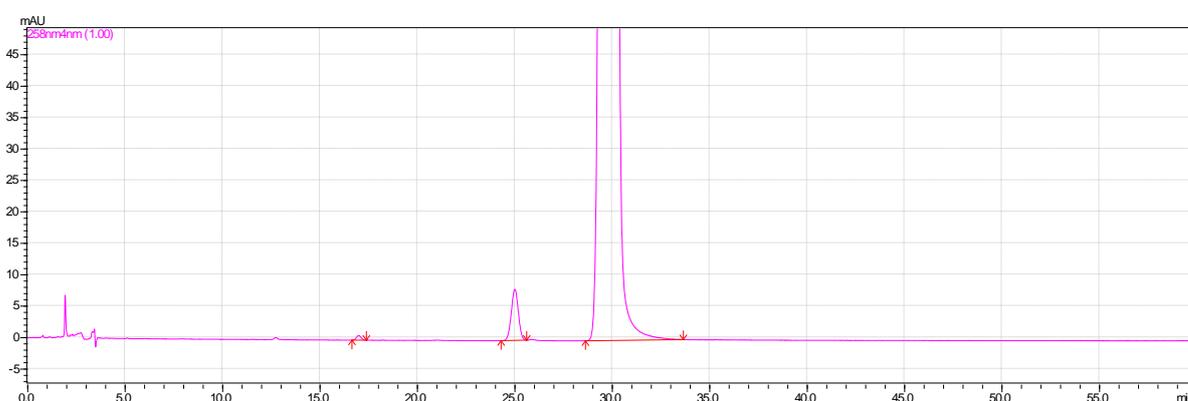


Рис. 5.4 – Хроматограмма испытуемого раствора субстанции 2-АБФПК после перекристаллизации ацетонитрилом

Учитывая идентификацию примеси 4-броманилина и доступность стандартного образца (СО), нами было проведено количественное определение данной примеси по разработанной методике с использованием раствора СО (концентрация 4-БА в растворе 2 мкг/мл). Детектирование вели при длине волны 240 нм, соответствующей максимальному поглощению 4-БА.

Было установлено, что результаты, полученные с применением стандартного раствора 4-броманилина, более чем в 10 раз отличаются от результатов, полученных с помощью раствора сравнения. Поэтому для оценки содержания идентифицированной примеси в субстанции рекомендуется использовать расчет по стандартному раствору 4-броманилина.

Содержание 4-броманилина в субстанции, рассчитанное по стандартному раствору, составило 0,075%, что в 10 раз выше результата, полученного с помощью раствора сравнения (0,007%).

Поэтому для оценки содержания идентифицированной примеси в субстанции необходимо использовать расчет по стандартному раствору 4-броманилина.

### **5.1.2 Валидация методики определения родственных примесей в субстанции 2-АБФПК**

По результатам исследований, представленных в разделе 5.1.1, предложена следующая методика определения родственных примесей в субстанции 2-АБФПК.

*Приготовление испытуемого раствора:*

около 0,05 г 2-АБФПК (точная навеска) помещают в мерную колбу на 25 мл, растворяют в 10 мл метанола, доводят объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивают и фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата.

*Приготовление раствора сравнения:*

0,5 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу на 50 мл, доводят объем раствора до метки метанолом, перемешивают. 1 мл полученного раствора

помещают в мерную колбу на 10 мл, доводят объем раствора до метки метанолом, перемешивают (концентрация 2-АБФПК 2 мкг/мл).

*Приготовление раствора для определения чувствительности (при анализе неидентифицированных примесей):*

1 мл раствора сравнения помещают в мерную колбу на 10 мл, доводят объем раствора до метки метанолом, перемешивают.

*Приготовление стандартного раствора 4-броманилина:*

около 0,025 г (точная навеска) стандартного образца 4-броманилина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 5 мл метанола, доводят объем раствора метанолом до метки, перемешивают. 1,0 мл раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора метанолом до метки, перемешивают.

1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем метанолом до метки и перемешивают (концентрация 4-броманилина 2 мкг/мл).

*Приготовление раствора для определения чувствительности (при анализе примеси 4-броманилина):*

1 мл стандартного раствора 4-броманилина помещают в мерную колбу на 10 мл, доводят объем раствора до метки метанолом, перемешивают.

Анализ родственных примесей в субстанции проводят в следующих хроматографических условиях:

<i>Хроматографическая колонка</i>	Luna C18(2) 100 А, 250×4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex) или аналогичная
<i>Подвижная фаза</i>	фосфатный буфер с рН 6,8 – ацетонитрил (65:35)
<i>Режим элюирования</i>	изократический
<i>Температура термостата колонки</i>	40 °С
<i>Скорость потока элюента</i>	1 мл/мин
<i>Детектор</i>	спектрофотометрический, длины волн детектирования: 258 нм – при анализе неидентифицированных примесей 240 нм при анализе идентифицированной примеси 4-броманилина
<i>Объем вводимой пробы</i>	10 мкл

При анализе неидентифицированных примесей последовательно хроматографируют растворитель, раствор для определения чувствительности методики, раствор сравнения (не менее 5 хроматограмм), испытуемый раствор (не менее 3 хроматограмм).

Содержание каждой неидентифицированной примеси ( $X$ , %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S * 0,1}{S_0}$$

где,

$S$  – площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика 2-АБФПК на хроматограмме раствора сравнения;

$0,1$  – концентрация 2-АБФПК в растворе сравнения (% от содержания 2-АБФПК в испытуемом растворе).

При анализе идентифицированной примеси 4-броманилина последовательно хроматографируют растворитель, раствор для определения чувствительности методики, стандартный раствор 4-броманилина (не менее 5 хроматограмм), испытуемый раствор (не менее 3 хроматограмм).

Содержание 4-БА ( $X$ , %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S * a_0 * 25 * P * 100}{S_0 * a * 25 * 50 * 10 * 100} = \frac{S * a_0 * P}{S_0 * a * 500}$$

где,

$S$  – площадь пика 4-БА на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика 4-БА на хроматограмме стандартного раствора;

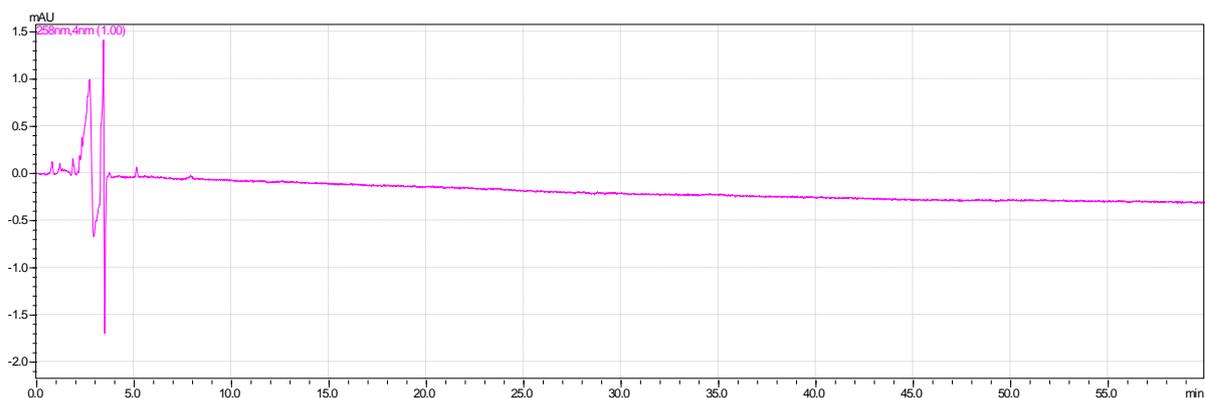
$a$  – навеска субстанции 2-АБФПК, г;

$a_0$  – навеска стандартного образца 4-БА, г;

$P$  – содержание 4-БА в стандартном образце, %.

### Специфичность

Для установления специфичности методики хроматографируют подвижную фазу и растворитель. Хроматограмма растворителя представлена на рисунке 5.5.



**Рис. 5.5 – Хроматограмма растворителя**

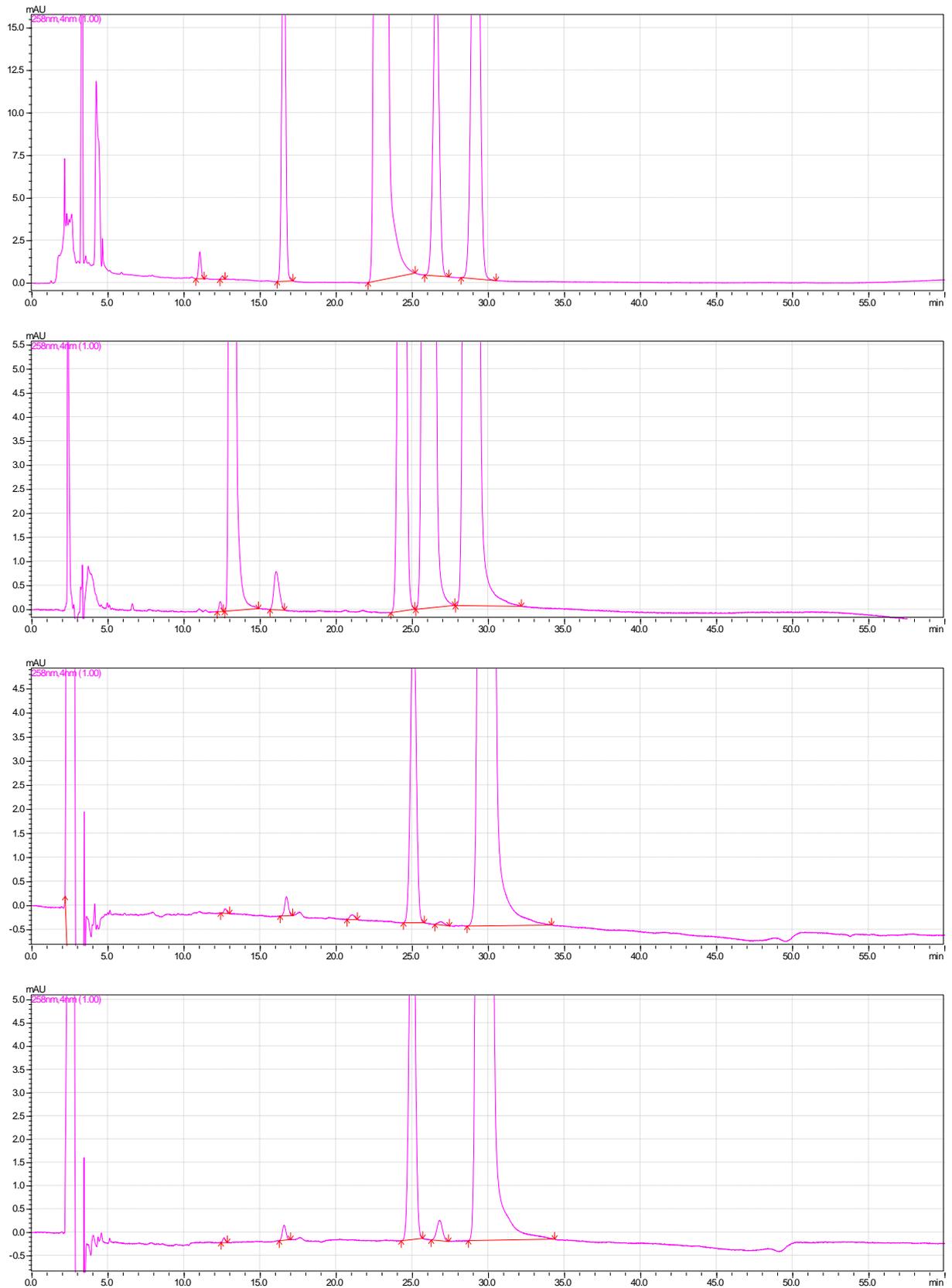
Установлено, что на хроматограммах подвижной фазы и растворителя, снятых при 258 и 240 нм, отсутствуют пики, близкие ко временам удерживания пиков 2-АБФПК, 4-БА и ранее обнаруженных неидентифицированных примесей. Хроматографические пики, имеющие времена удерживания менее 5 мин, относятся к «системным», поскольку они наблюдались и на хроматограмме растворителя (метанола). Данные пики не должны учитываться при анализе родственных примесей.

В процессе изучения специфичности методики были проведены стресс-испытания раствора 2-АБФПК с целью подтверждения удовлетворительной разделительной способности разработанных хроматографических условий по отношению к потенциальным продуктам деградации.

Испытуемый раствор 2-АБФПК с концентрацией 2 мг/мл подвергали следующим воздействиям:

- нагревание при 80° С в течение 2 часов;
- воздействие 0,1М хлороводородной кислоты при 80° С в течение 2 часов;
- воздействие 0,1М гидроксида натрия при 80° С в течение 2 часов;
- воздействие 3% раствора пероксида водорода при 80° С в течение 2 часов.

Анализ хроматограмм растворов, подвергнутых принудительному разложению (рис. 5.6), показал, что используемая хроматографическая система полностью разделяет пик исследуемого вещества, 4-броманилина и пики неидентифицированных примесей. Разрешение ( $R_s$ ) для критичных пар пиков на всех хроматограммах составляет более 1,5:



**Рис. 5.6 – Хроматограммы растворов, подвергнутых действию:**  
**а – щелочи; б – кислоты; в – окислителя; г – повышенной температуры**

Во всех стрессовых условиях наблюдается рост концентрации примесей. Установлено, что наиболее интенсивное разложение 2-АБФПК происходит в присутствии щелочи. Так, площадь пика 4-броманилина более чем в 300 раз превышает площадь пика на хроматограмме испытуемого раствора, не подвергнутого деградации. Значительно увеличиваются площади пиков примесей с относительными временами удерживания 0,85 и 0,91.

В кислых условиях наблюдается менее интенсивное разложение соединения: площадь пика 2-АБФПК уменьшилась в 2 раза, а площадь пика 4-броманилина выросла примерно в 15 раз. На хроматограмме раствора, подвергнутого разложению в кислых условиях, появляется пик примеси с RRT 0,45, который хорошо разделяется с соседними пиками ( $R_s$  2,31 и 5,51).

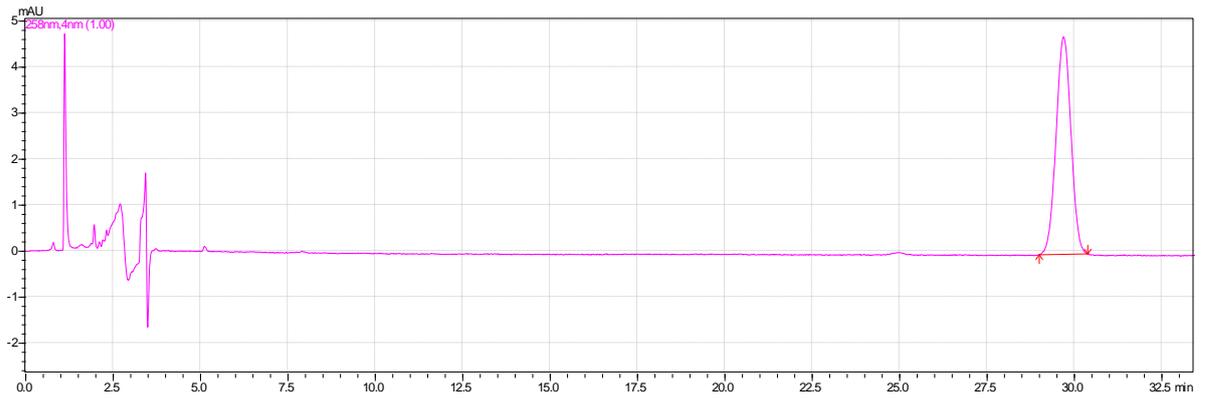
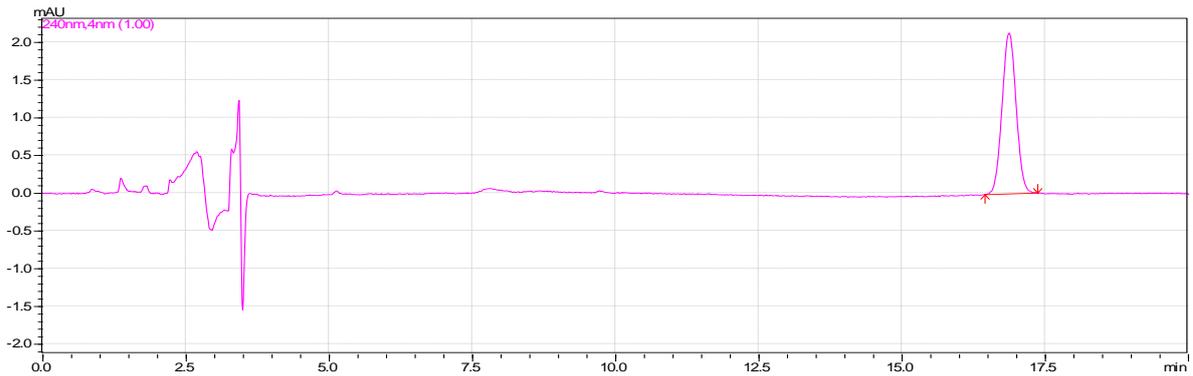
Под воздействием окислителя на хроматограмме появляется дополнительный пик с относительным временем удерживания 0,09.

Воздействие повышенной температуры приводит деградации соединения, однако, рост примесей не такой интенсивный, как в случае щелочных или кислых условий.

Таким образом, разработанные хроматографические условия позволяют разделять пики 2-АБФПК, родственных примесей и возможных продуктов деструкции соединения.

#### Проверка пригодности хроматографической системы

Для оценки пригодности хроматографической системы при определении неидентифицированных примесей проводили пятикратное хроматографирование раствора сравнения 2-АБФПК, при анализе идентифицированной примеси – пятикратное хроматографирование стандартного раствора 4-БА. Примеры хроматограмм приведены на рисунке 5.7.

**а****б**

**Рис. 5.7 – Хроматограммы раствора сравнения 2-АБФПК (а), стандартного раствора 4-БА (б)**

Для пика каждого соединения рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD) площади, фактор асимметрии ( $A_s$ ), эффективность хроматографической колонки (N). Результаты представлены в таблице 5.3.

**Результаты оценки пригодности хроматографической системы при  
анализе родственных примесей**

<b>2-АБФПК</b>			
<b>№</b>	<b>S пика 2-АБФПК, мАУ*сек</b>	<b>N, ТТ</b>	<b>A<sub>s</sub></b>
1	74 268	22 372	1,013
2	74 315	22 688	1,045
3	74 806	22 608	1,027
4	74 099	22 146	1,022
5	74 380	22 076	1,010
	$X_{cp} = 74\,373,60$ $SD = 263,15$ $RSD = 0,35\%$		
<b>4-БА</b>			
<b>№</b>	<b>S пика 2-АБФПК, мАУ*сек</b>	<b>N, ТТ</b>	<b>A<sub>s</sub></b>
1	36 419	21 688	1,034
2	36 456	20 909	1,074
3	36 384	20 969	1,066
4	36 514	21 333	1,084
5	36 442	21 100	1,072
	$X_{cp} = 36\,443,00$ $SD = 48,14$ $RSD = 0,13\%$		

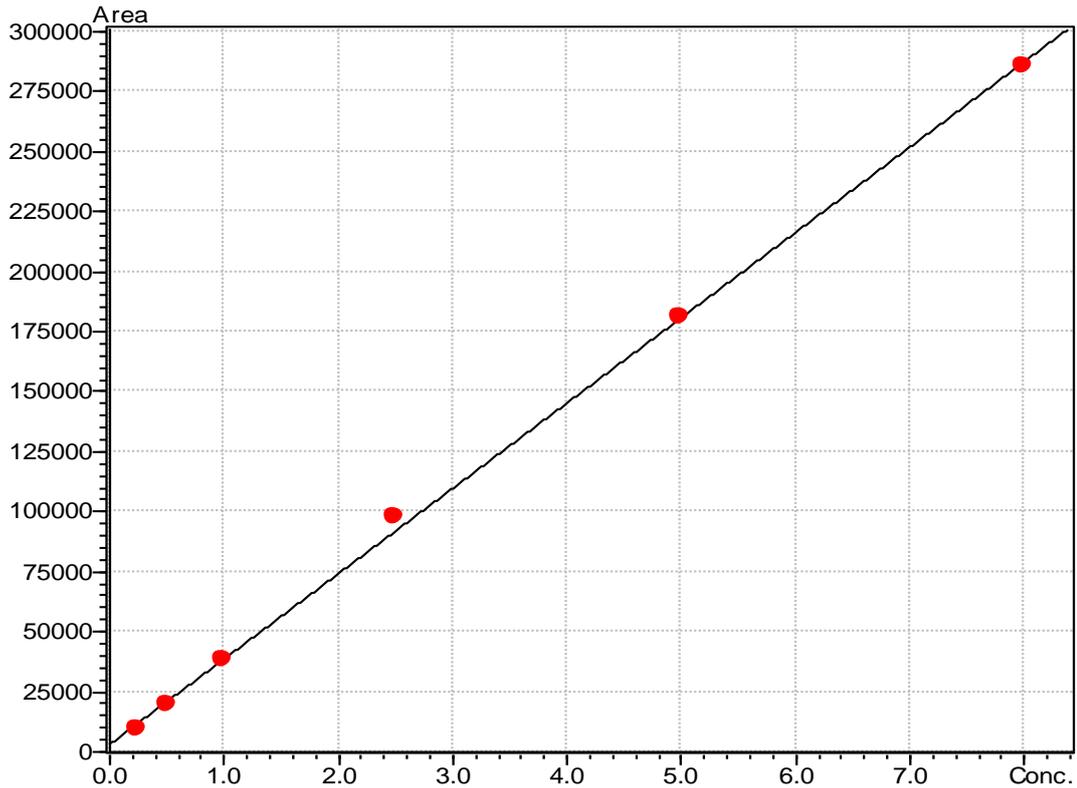
По результатам проведенного эксперимента нами предложены следующие критерии приемлемости хроматографической системы:

- относительное стандартное отклонение площадей пиков 2-АБФПК и 4-БА для пяти повторных введений раствора сравнения не более 2,0 %;
- фактор асимметрии пиков не более 2,5;
- эффективность колонки, рассчитанная по пикам 2-АБФПК и 4-БА, не менее 2000 теоретических тарелок.

Линейность

С учетом результатов по определению содержания примесей в субстанции 2-АБФПК линейность методики для анализа неидентифицированных примесей оценивалась в диапазоне от 0,0125 до 0,4%, для анализа 4-БА в диапазоне от 0,01 до 0,12 % от содержания 2-АБФПК в испытуемом растворе (рис. 5.8 – 5.9).

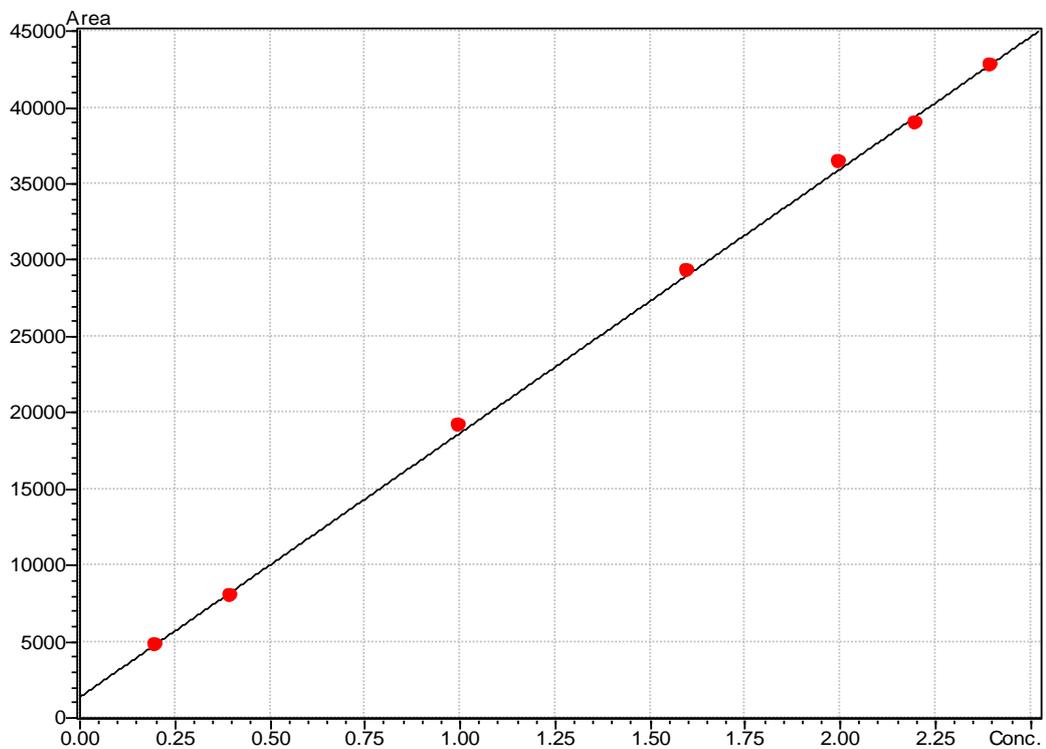
Для этого были приготовлены серия растворов 2-АБФПК с концентрациями 0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 и 8,00 мкг/мл и серия растворов 4-БА с концентрациями 0,20; 0,40; 1,00; 1,60; 2,00; 2,20; 2,40 мкг/мл.



Уравнение графика:  $S = 35535,85 * C + 3209,97$

Коэффициент корреляции: **0,9993**

**Рис. 5.8 – Калибровочный график количественного определения неидентифицированных примесей (по пику 2-АБФПК)**



Уравнение графика:  $S = 17306,19 * C + 1379,65$

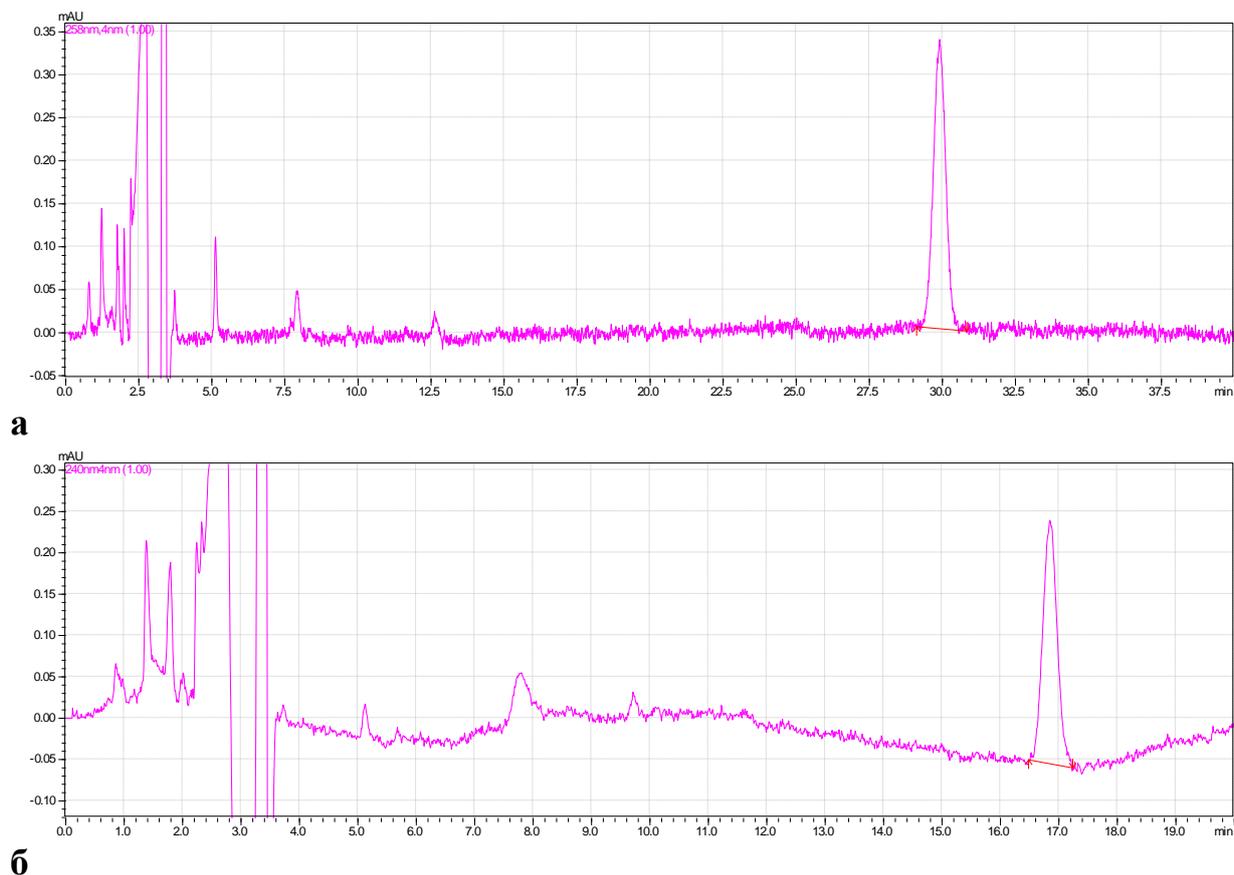
Коэффициент корреляции: **0,9995**

**Рис. 5.9 – Калибровочный график количественного определения 4-БА**

Таким образом, полученные данные подтверждают линейность методик определения идентифицированных и неидентифицированных примесей в исследованных диапазонах. Коэффициент корреляции в обоих случаях составил более 0,99, что соответствует требованиям ГФ XV.

#### Предел количественного определения

Согласно требованиям ГФ XV издания аналитическая область методик количественного определения примесей лежит в интервале от предела количественного определения (ПКО) до 120% от допустимого содержания определяемой примеси. Нами был установлен ПКО валидируемой методики по значению соотношения сигнал/шум (S/N). Соотношению S/N 10/1 соответствует концентрация 2-АБФПК 0,25 мкг/мл, концентрация 4-БА – 0,20 мкг/мл (рис. 5.10).



**Рис. 5.10 – Хроматограммы растворов 2-АБФПК (а) и 4-БА (б) с концентрациями, соответствующими ПКО**

#### Правильность методики определения идентифицированной примеси 4-БА

Правильность методики подтверждали путем анализа приготовленных модельных растворов 4-броманилина известных концентраций на уровне 10, 25,

50, 100 и 120% от нормируемого содержания (2 мкг/мл; 0,1% от концентрации 2-АБФПК в испытуемом растворе).

Модельные растворы готовили по следующей *методике*:

точную навеску стандартного образца 4-броманилина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 5 мл метанола, доводят объем раствора метанолом до метки, перемешивают. 1,0 мл раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем метанолом до метки, перемешивают. 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем метанолом до метки и перемешивают.

Для каждого уровня концентрации готовят по три модельных раствора. Растворы анализировали по разработанной методике, используя для расчета оптическую плотность стандартного раствора 4-БА.

Полученные результаты и их метрологическая оценка представлены в таблице 5.4.

Таблица 5.4

**Результаты количественного определения 4-БА  
в модельных растворах**

№	Введено, г	S пика, mAU*сек	Найдено, г	Открываемость R, %
1	0,0026	3 566	0,00247	94,90
2	0,0027	3 783	0,00262	96,95
3	0,0024	3 364	0,00233	96,99
4	0,0068	10 072	0,00697	102,49
5	0,0066	9 420	0,00652	98,76
6	0,0059	8 462	0,00586	99,24
7	0,0124	18 195	0,01259	101,53
8	0,0134	19 408	0,01343	100,22
9	0,0121	17 294	0,01197	98,90
10	0,0254	36 716	0,02541	100,02
11	0,0261	37 611	0,02602	99,71
12	0,0251	36 149	0,02501	99,65
13	0,0315	45 236	0,03130	99,37
14	0,0325	47 031	0,03254	100,13
15	0,0316	45 036	0,03116	98,62
<b>a<sub>0</sub>: 0,0254 г</b> <b>S<sub>0</sub>: 36 708</b>				<b>R<sub>ср</sub> = 99,17%</b> <b>SD = 1,86</b> <b>RSD = 1,88%</b> <b>ΔR<sub>ср</sub> = 1,02</b> <b>Критерий</b> <b>Стьюдента:</b> <b>t<sub>расчет.</sub> = 1,73 &lt;</b> <b>t<sub>табл.</sub> = 2,13</b>

Границы открываемости 4-БА находятся в пределах 90 – 110%, истинное значение открываемости (100 %) лежит внутри доверительного интервала среднего результата количественного определения, расчетный критерий Стьюдента (2,13) не превышает табличное значение. Следовательно, разработанная методика валидна по показателю «Правильность».

Прецизионность методики определения идентифицированной примеси 4-БА

Для изучения прецизионности методики была проанализирована субстанция серии 0122 двумя аналитиками в разные дни. Каждый аналитик

проводил анализ в шестикратной повторности. Полученные результаты представлены в таблице 5.5.

**Таблица 5.5**

**Результаты оценки прецизионности методики количественного определения 4-БА**

Аналитик 1			Аналитик 2		
Навеска, г	S пика, mAU*сек	Рассчитанное содержание, %	Навеска, г	S пика, mAU*сек	Рассчитанное содержание, %
0,0521	29 836	0,0791	0,0540	34 300	0,0880
0,0491	28 474	0,0801	0,0506	30 826	0,0844
0,0522	30 611	0,0810	0,0539	29 413	0,0756
0,0509	28 523	0,0774	0,0515	29 292	0,0788
0,0485	25 211	0,0718	0,0489	29 331	0,0831
0,0496	29 374	0,0818	0,0496	27 352	0,0764
<b>a<sub>0</sub>: 0,0246 г</b> <b>S<sub>0</sub>: 35 620</b>		<b>X<sub>ср</sub> = 0,0785%</b> <b>SD = 0,0036</b> <b>RSD = 4,59%</b> <b>S<sup>2</sup> = 0,00001296</b>	<b>a<sub>0</sub>: 0,0271 г</b> <b>S<sub>0</sub>: 39 122</b>		<b>X<sub>ср</sub> = 0,0811%</b> <b>SD = 0,0049</b> <b>RSD = 6,04%</b> <b>S<sup>2</sup> = 0,00002401</b>
<b>Критерий Фишера: F<sub>расчет</sub> = 1,85 &lt; F<sub>табл.</sub> = 5,05</b>					

Разработанная методика характеризуется удовлетворительной сходимостью, относительное стандартное отклонение результатов каждого из аналитиков не превышает допустимых для методик определения примесей 10%. Рассчитанный критерий Фишера не превышает табличного значения, что является доказательством статистической незначимости различий между средними результатами, полученными каждым из аналитиков.

#### Аналитическая область методики

Полученные в ходе валидации результаты свидетельствуют, что разработанная методика определения родственных примесей в субстанции 2-АБФПК специфична, обладает линейностью, обеспечивает получение правильных и воспроизводимых результатов в интервале концентраций от 0,25 мкг/мл до 8,00 мкг/мл (для неидентифицированной примеси) и от 0,20 мкг/мл до 2,40 мкг/мл (для 4-БА).

Анализ серий субстанции 2-АБФПК по показателю «Родственные примеси»

С помощью разработанной и валидированной методики были проанализированы 4 серии субстанции изучаемого соединения на наличие «родственных примесей».

Результаты анализа представлены в таблице 5.6.

Таблица 5.6

**Содержание «родственных примесей» в субстанции 2-АБФПК, %**

Серия	4-БА	Примесь (RRT 0,85)	Любая другая неидентифицированная примесь	Общее содержание примесей
0521	0,075	0,14	0,03	0,245
0122	0,028	0,21	–	0,238
0922	0,044	0,19	0,02	0,254
0223	0,019	0,24	0,02	0,279

По результатам определения содержания примесей в разных сериях субстанции 2-АБФПК установлены следующие предельные нормы: 4-БА не более 0,1%, неидентифицированной примеси (RRT 0,85) – не более 0,3%, единичной неидентифицированной примеси – не более 0,1%, сумма примесей – не более 0,5%.

**5.1.3 Изучение строения неидентифицированной примеси 2-АБФПК с RRT 0,85 методом ВЭЖХ-МС/МС**

Проведенные исследования (раздел 5.1.2) показали, что субстанция 2-АБФПК, синтезированная по авторской методике, содержит примеси с RRT 0,85 и 0,91 в количестве, превышающем 0,4% и 0,1% соответственно. После введения в схему синтеза дополнительной стадии очистки субстанции (путем перекристаллизации из ацетонитрила) примесь с RRT 0,91 не обнаруживалась, содержание примеси с RRT 0,85 снизилось примерно в 2,5 раза. В ходе последующего анализа было установлено, что, несмотря на очистку, примесь с RRT 0,85 присутствует во всех сериях субстанции, причем ее содержание в некоторых образцах превышает 0,2% (таблица 5.6).

Нами была предпринята попытка установить природу данных примесей с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС.

Исследования проводили на жидкостном хроматомасс-спектрометре «LCMS–8050» (Shimadzu) с детектором типа тройной квадруполь.

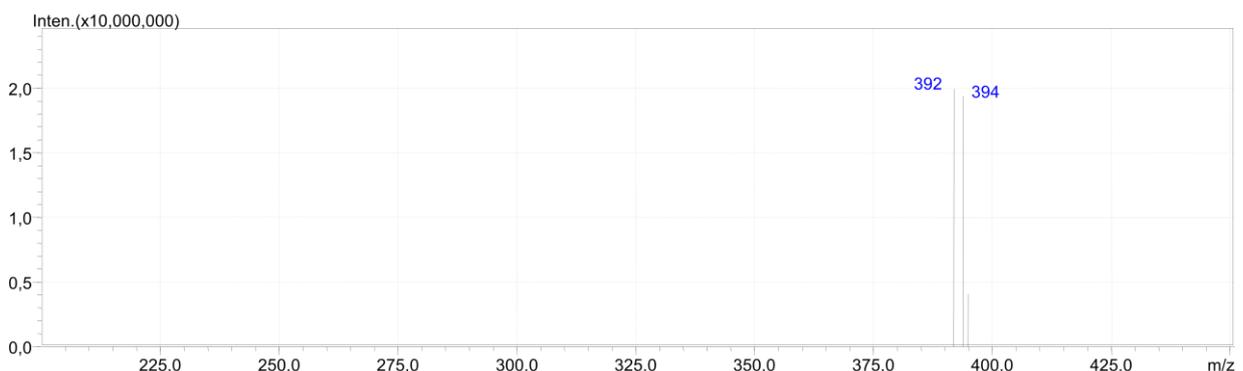
Первым этапом нашей работы стало изучение условий тандемного масс-спектрометрического детектирования самого соединения 2-АБФПК.

*Условия хроматографического анализа:* обращенно-фазная колонка: «Luna 3 мкм C18(2) 100 А» («Phenomenex») размером 150×3,0 мм; подвижная фаза: ацетонитрил – 0,1% раствор муравьиной кислоты (50:50); скорость потока элюента: 0,25 мл/мин; температура термостата колонки: 40° С.

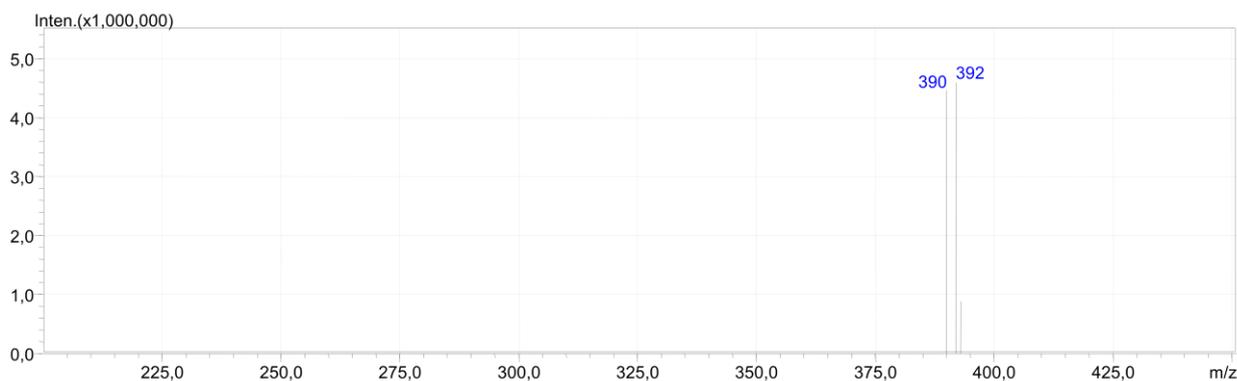
*Масс-спектрометрические условия:* тип ионизации: электроспрей (+/–); напряжение на капилляре: 4000 В; температура интерфейса: 300 °С; температура нагреваемого блока: 300 °С; температура линии десольватации 250 °С; поток газа-распылителя: 2 л/мин; поток газа-осушителя: 10 л/мин; поток нагреваемого газа: 10 л/мин.

Объектом исследования являлся метанольный раствор субстанции с концентрацией 2-АБФПК 100 нг/мл.

Предварительно были получены масс-спектры 2-АБФПК в режимах сканирования положительных и отрицательных ионов (рис. 5.11). Диапазон сканирования составлял 200 – 450 Да.



**а**



б

**Рис. 5.11 – Масс-спектры 2-АБФПК:  
сканирование положительных ионов (а), отрицательных ионов (б)**

Анализ полученных масс-спектров 2-АБФПК показал наличие интенсивных ионов со значениями  $m/z$  392 и 394 в режиме положительной ионизации, 390 и 392 – в режиме отрицательной ионизации. Данные сигналы соответствуют протонированным  $[M+H]^+$  и депротонированным  $[M-H]^-$  молекулам изучаемого соединения. Дуплет сигналов в масс-спектрах объясняется присутствием в структуре изучаемого соединения атома брома, состоящего из двух стабильных изотопов с массами 79 и 81.

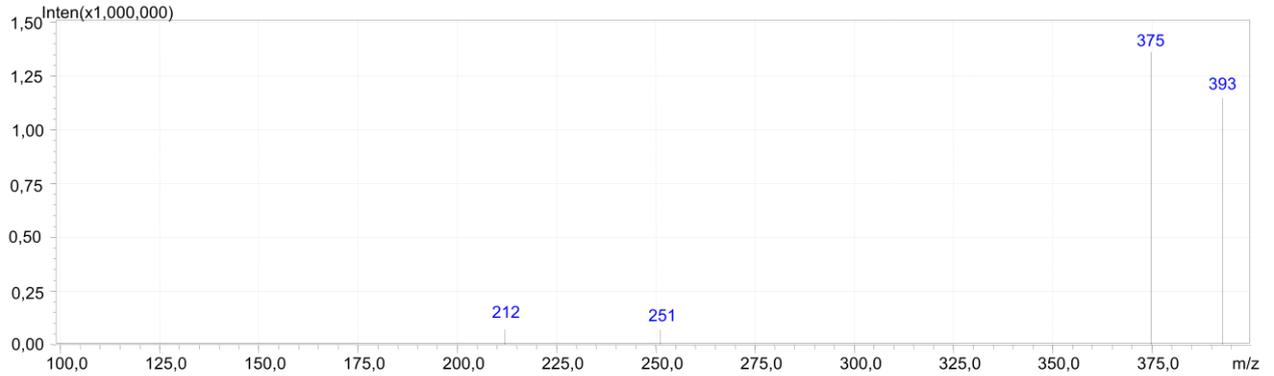
Установлено, что интенсивность молекулярных ионов в режиме положительной ионизации примерно в 4 раза выше, чем при отрицательной ионизации.

Далее были получены масс-спектры фрагментных ионов (product ions) путем соударительной диссоциации ионов-предшественников (precursor ions) на втором квадруполе ( $Q_3$ ) масс-спектрометрического детектора. Ионами-предшественниками являлись молекулярные ионы с  $m/z$  392 и 394 в режиме положительной ионизации, 390 и 392 – при отрицательной ионизации. Энергию соударительной диссоциации (CE) варьировали в диапазоне от 5 до 30 eV (с шагом 5 eV).

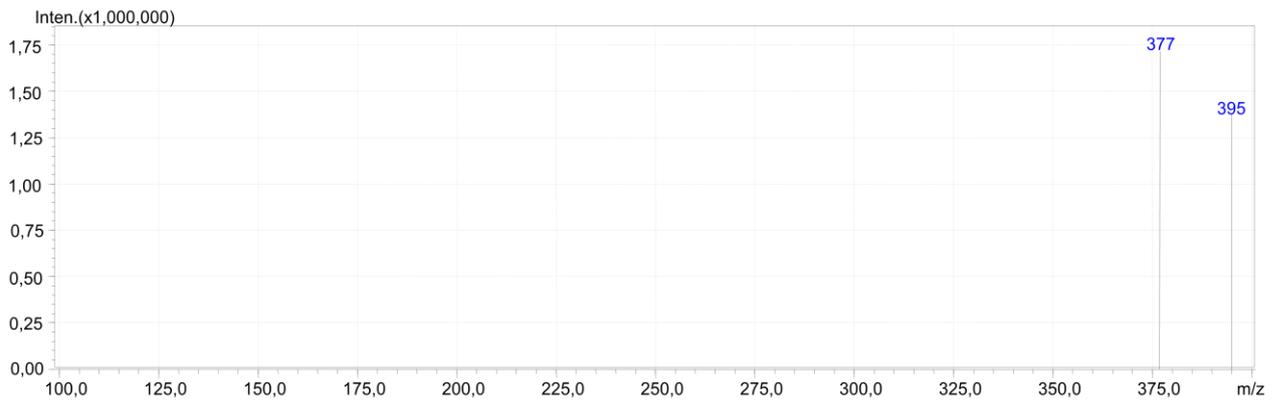
Анализ вторичных масс-спектров показал, что в режиме положительной ионизации наиболее интенсивными фрагментными ионами оказались ионы с  $m/z$

375 (377), при сканировании отрицательных ионов в спектре наблюдали интенсивные сигналы от фрагментов с массами 219 и 347 (349).

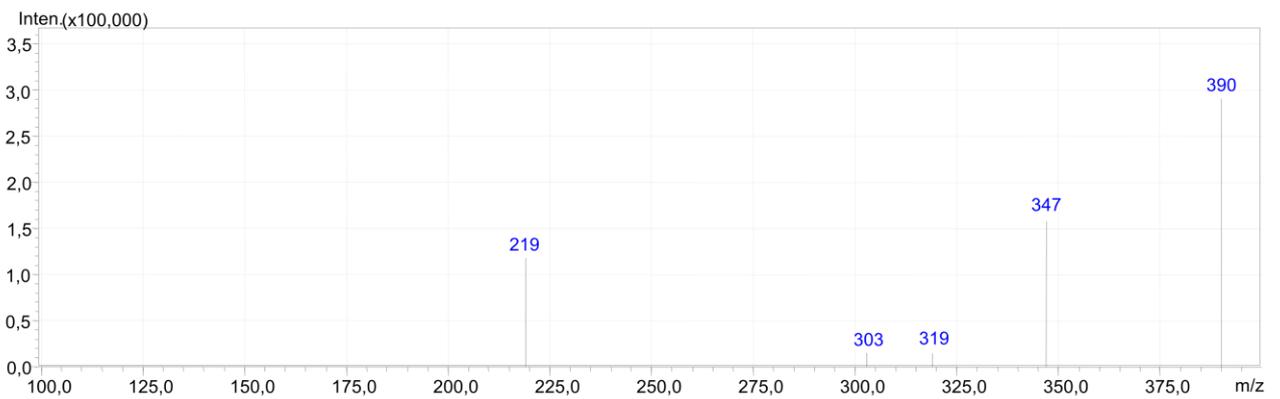
Энергия соударительной диссоциации (СЕ) величиной 20 eV обеспечила максимальное образование обозначенных осколочных фрагментов молекулярных ионов 2-АБФПК (рис. 5.12).



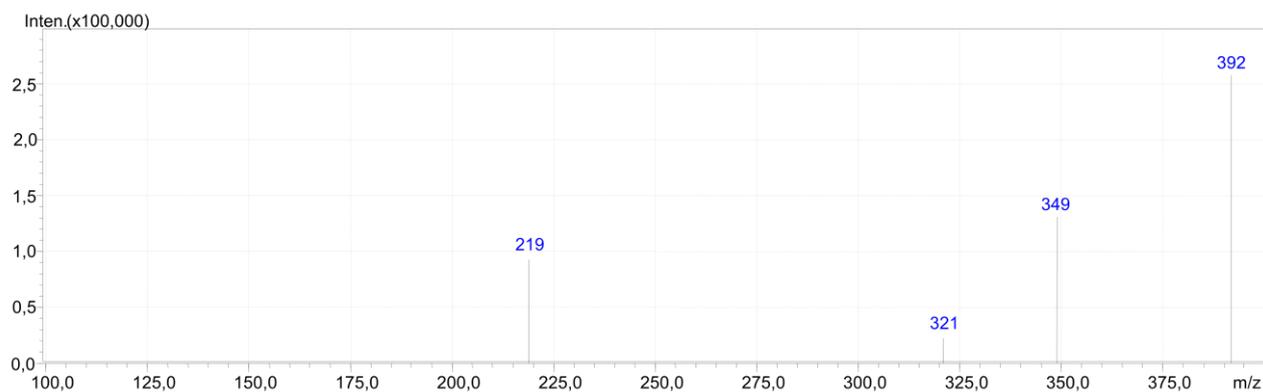
**а**



**б**



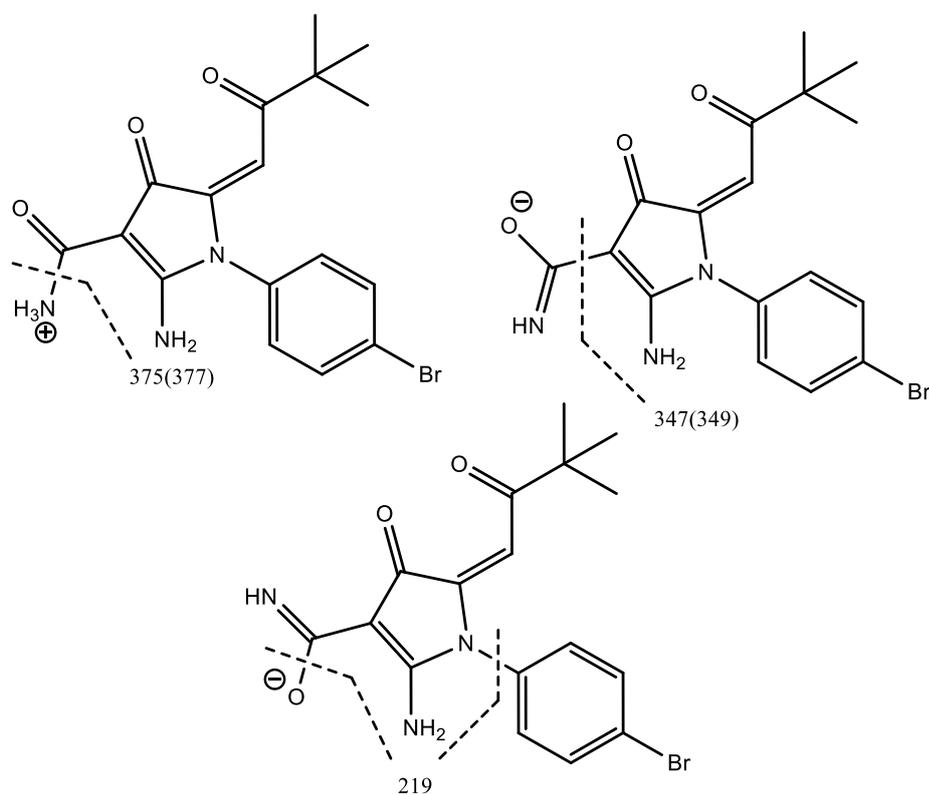
**в**



Г

**Рис. 5.12 – Вторичные масс-спектры 2-АБФПК:  
(precursor ions: +392 (а); +394 (б); –390 (в); –392 (г))**

Исходя из величин  $m/z$  полученных фрагментных ионов, нами были предложены следующие схемы фрагментации молекулярных ионов 2-АБФПК (рис. 5.13):



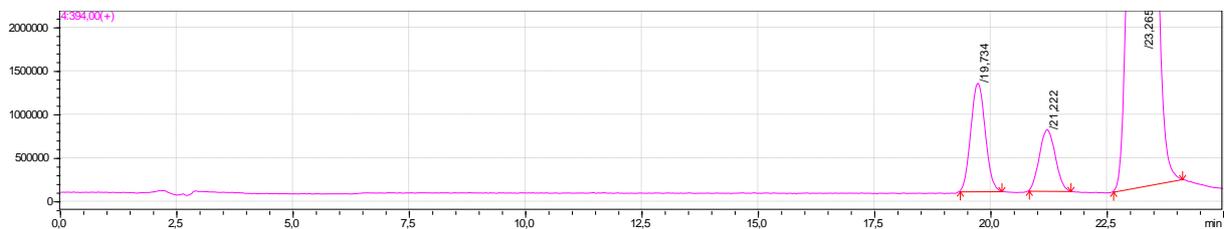
**Рис. 5.13 – Предполагаемые схемы фрагментации молекулярных ионов 2-АБФПК**

Фрагментный ион с  $m/z$  219 на масс-спектре представлен одним сигналом, что свидетельствует об отсутствии в его структуре 4-бромфенильного заместителя.

Следующим этапом работы стал анализ метанольного раствора «неочищенной» субстанции 2-АБФПК с концентрацией 20 мкг/мл. Для более эффективного разделения примесей и основного соединения концентрацию ацетонитрила снизили до 35%. Снимали хроматограммы раствора в режиме селективного ионного мониторинга, пропуская ионы с массой 392 и 394 в режиме положительной ионизации, с массой 390 и 392 – в режиме отрицательной ионизации. Наблюдала наличие примесей с относительными временами удерживания 0,85 и 0,91 (рис. 5.14).



а

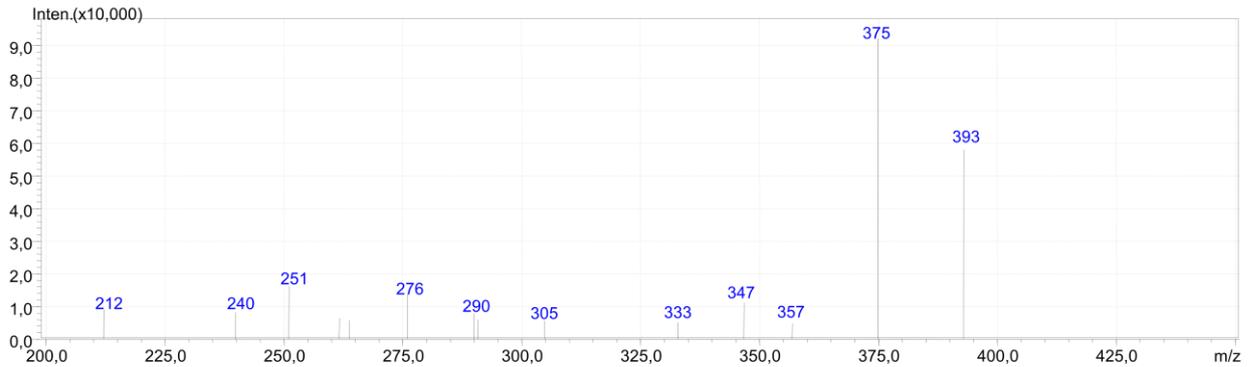
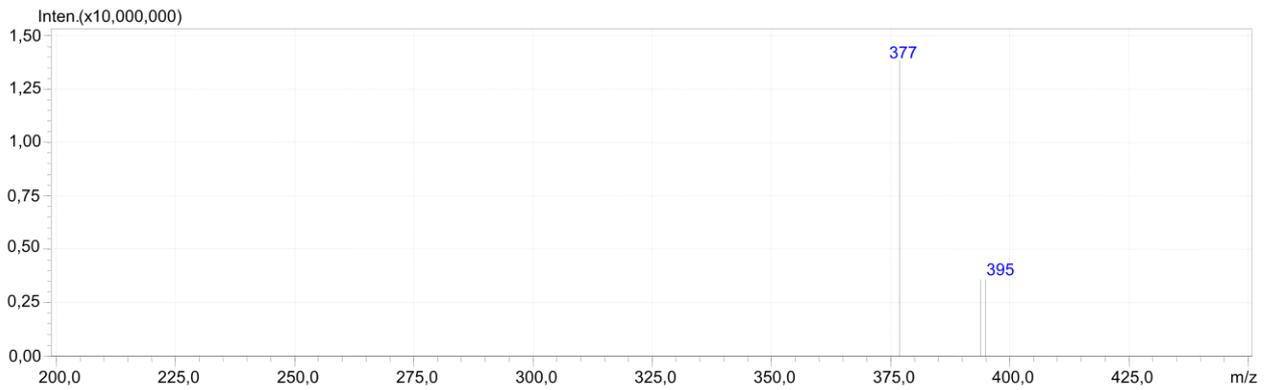
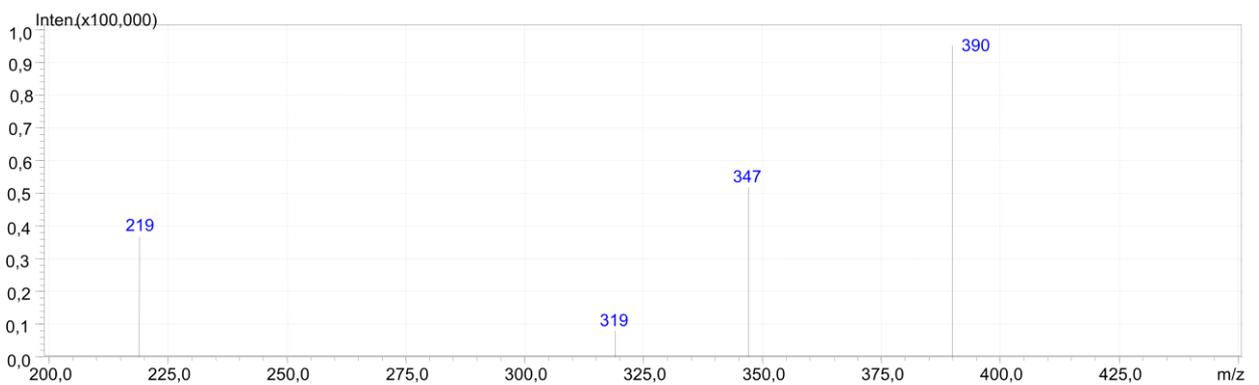


б

**Рис. 5.14 – Хроматограммы раствора 2-АБФПК в режиме SIM (а –  $m/z$  392; б –  $m/z$  394)**

Установлено, что в масс-спектрах примеси с RRT 0,85 присутствуют интенсивные ионы с такими же  $m/z$ , как и у 2-АБФПК как в режиме положительной, так и в режиме отрицательной ионизации. Наблюдается характерный дуплет сигналов, что подтверждает наличие 4-бромфенильного заместителя в структуре примеси.

Вторичные масс-спектры примеси RRT 0,85 также демонстрируют интенсивные сигналы от фрагментных ионов с теми же  $m/z$  как в режиме положительной, так и в режиме отрицательной ионизации (рис. 5.15):

**а****б****в**

**Рис. 5.15 – Вторичные масс-спектры примеси (RRT 0,85), полученные при СЕ 20 eV: (ионы: +392 (а), +394 (б), -390 (в))**

Таким образом, в масс-спектрах примеси 2-АБФПК с RRT 0,85 наблюдается те же молекулярные ионы и в режиме положительной, и в режиме отрицательной ионизации. Вторичные масс-спектры примеси подтверждают аналогичный 2-АБФПК характер фрагментации. Учитывая способность производных 2-АПКК к существованию в виде геометрических изомеров (Глава 1, раздел 1.3), можно предположить, что неидентифицированная примесь является Z – изомером 2-АБФПК.

## 5.2 Определение остаточных органических растворителей в субстанции 2-АБФПК методом ГЖХ

Схема синтеза и очистки субстанции 2-АБФПК предусматривает использование органических растворителей, относящихся к разным классам токсичности (таблица 5.7).

**Таблица 5.7**  
**Органические растворители, используемые при синтезе 2-АБФПК**

Растворитель	Класс токсичности	Предельное содержание, ppm
Бензол	1	2
Ацетонитрил	2	410
Этанол	3	5000
Диэтиловый эфир	3	5000
Триэтиламин	3	5000

Основным методом контроля фармацевтических субстанций на содержание остаточных органических растворителей (ООР) является газожидкостная хроматография. Разработку ГЖХ-методик проводили на хроматографе «Хроматэк-Кристалл 5000.2» с пламенно-ионизационным детектором, используя стандартные растворы бензола, ацетонитрила, этанола, диэтилового эфира и триэтиламина в диметилформамиде.

Учитывая очень низкий нормируемый предел содержания в субстанциях, для извлечения бензола из раствора был предложен вариант статической парофазной экстракции. Для остальных соединений использовался прямой ввод растворов в инжектор.

Исследования показали, что хорошее разделение пиков бензола, ацетонитрила, этанола и диэтилового эфира обеспечивается при хроматографировании на колонке HP-FFAP (НФ – полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталевой кислотой). Значения коэффициентов симметрии пиков указанных соединений не превышали 2,0. Однако пик триэтиламина на данной колонке имел крайне асимметричную форму. Удовлетворительную симметрию пика триэтиламина удалось достичь на колонке HP-5 (НФ – (5%-фенил)-метилполисилоксан).

Нами предложены три отдельные методики для определения ООР в субстанции 2-АБФПК.

### 5.2.1 Определение этанола, диэтилового эфира, ацетонитрила

*Условия анализа:*

<i>Колонка</i>	HP-FFAP (50 м × 0,32 мм × 0,5 мкм)
<i>Газ - носитель</i>	Азот
	деление потока 1/10
	давление газа-носителя 40 кПа
<i>Температура термостата колонок</i>	50°C в течение 2 минут, затем со скоростью 5°C/мин. до 120 °C, затем со скоростью 45 °C/мин. до 210 °C
<i>Температура инжектора</i>	180 °C
<i>Температура детектора</i>	230 °C
<i>Объем пробы</i>	1 мкл
<i>Способ ввода пробы</i>	прямой ввод
<i>Детектор</i>	ПИД, скорость подачи воздуха – 350 мл/мин, водорода – 35 мл/мин.
<i>Время хроматографирования</i>	29 мин.

*Приготовление испытуемого раствора:*

Около 0,5 г (точная навеска) субстанции 2-АБФПК помещают в мерную колбу вместимостью 5 мл, растворяют в 2 мл диметилформамида, доводят объём раствора до метки и перемешивают. Концентрация 2-АБФПК в растворе составила 100 мг/мл.

*Приготовление стандартного раствора:*

По 0,25 г диэтилового эфира и этанола (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл диметилформаида, доводят объём раствора до метки и перемешивают (исходный раствор А).

Около 0,205 г ацетонитрила (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл диметилформаида, доводят объём раствора до метки и перемешивают (исходный раствор Б<sub>1</sub>).

1,0 мл исходного раствора Б<sub>1</sub> помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объём раствора до метки диметилформаидом и перемешивают (исходный раствор Б<sub>2</sub>).

1,0 мл раствора А и 1,0 мл раствора Б<sub>2</sub> помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объём раствора диметилформаидом до метки и перемешивают. Концентрации диэтилового эфира и этанола в растворе составили 500 мкг/мл, ацетонитрила 41 мкг/мл.

Хроматографируют стандартный и испытуемый раствор в разработанных условиях.

Содержание диэтилового эфира и этанола в ppm (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 1 \times 5 \times P}{S_0 \times 50 \times 10 \times a \times 100} \times 10^6 = \frac{S \times a_0 \times P \times 100}{S_0 \times a}$$

где,

$S$  – площадь пика диэтилового эфира (этанола) на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика диэтилового эфира (этанола) на хроматограмме стандартного раствора;

$a$  – навеска субстанции, в граммах;

$a_0$  – навеска диэтилового эфира (этанола), используемая для приготовления стандартного раствора, в граммах;

$P$  – содержание диэтилового эфира (этанола) в стандартном образце, используемом для приготовления стандартного раствора в процентах.

Содержание ацетонитрила в ppm (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 1 \times 1 \times 5 \times P}{S_0 \times 50 \times 10 \times 10 \times a \times 100} \times 10^6 = \frac{S \times a_0 \times P \times 10}{S_0 \times a}$$

где,

$S$  – площадь пика ацетонитрила на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика ацетонитрила на хроматограмме стандартного раствора;

$a$  – навеска субстанции, в граммах;

$a_0$  – навеска ацетонитрила, используемая для приготовления стандартного раствора, в граммах;

$P$  – содержание ацетонитрила в стандартном образце, используемом для приготовления стандартного раствора в процентах.

Полученная в данных условиях хроматограмма стандартного раствора представлена на рис. 5.16. Пики изучаемых органических растворителей хорошо разделяются, коэффициент разрешения между ближайшими пиками составил более 3,5. На хроматограмме растворителя отсутствовали пики, совпадающие с пиками диэтилового эфира, этанола, ацетонитрила по времени удерживания.

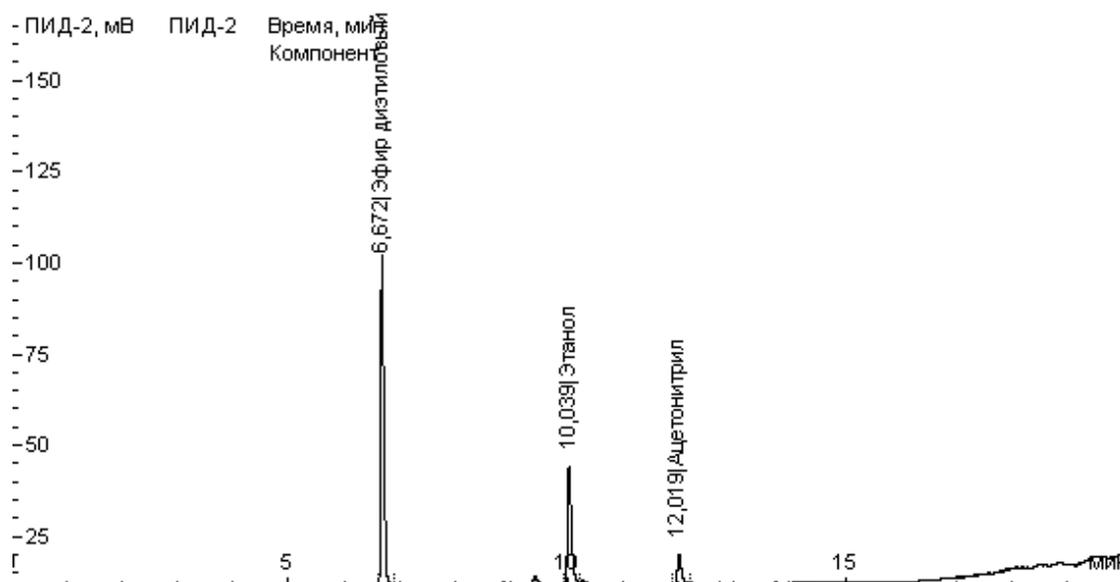


Рис. 5.16 – Хроматограмма стандартного раствора

Пригодность хроматографической системы оценивали путем пятикратного хроматографирования стандартного раствора.

Рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD) площадей пиков органических растворителей, фактор асимметрии ( $A_s$ ), эффективность хроматографической колонки (N). Результаты представлены в таблице 5.8.

Таблица 5.8

**Результаты оценки пригодности хроматографической системы при анализе диэтилового эфира, этанола, ацетонитрила**

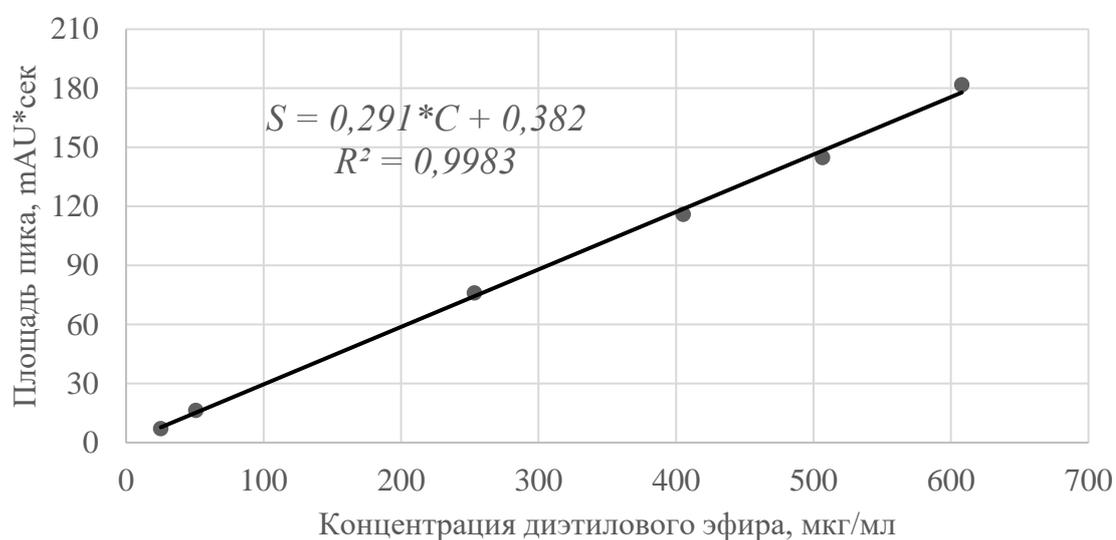
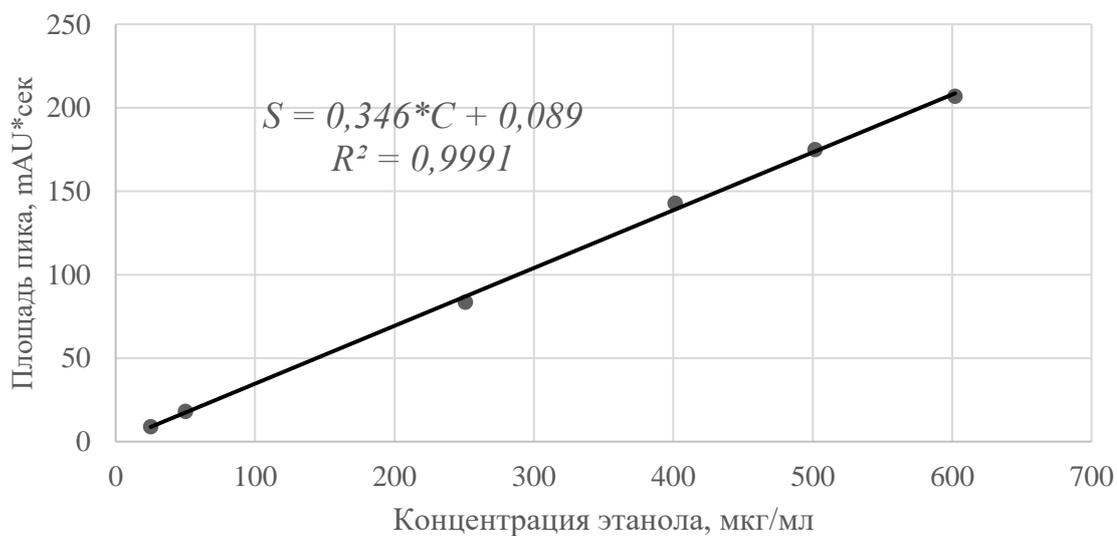
<b>Диэтиловый эфир</b>			
<b>№</b>	<b>Площадь пика, <math>mAu \cdot сек</math></b>	<b>N, ТТ</b>	<b><math>A_s</math></b>
1	149,8	70 791	1,903
2	152,8	68 926	1,994
3	152,4	69 317	2,015
4	146,3	69 510	1,965
5	145,5	70 276	1,983
	$X_{cp} = 149,36$ $SD = 3,37$ $RSD = 2,57\%$		
<b>Этанол</b>			
<b>№</b>	<b>Площадь пика, <math>mAu \cdot сек</math></b>	<b>N, ТТ</b>	<b><math>A_s</math></b>
1	152,6	97 216	1,911
2	158,0	97 246	1,763
3	152,1	99 223	1,898
4	149,1	97 357	1,759
5	156,9	94 348	1,782
	$X_{cp} = 153,74$ $SD = 3,66$ $RSD = 2,38\%$		
<b>Ацетонитрил</b>			
<b>№</b>	<b>Площадь пика, <math>mAu \cdot сек</math></b>	<b>N, ТТ</b>	<b><math>A_s</math></b>
1	9,2	137 238	1,907
2	10,8	135 746	1,977
3	10,4	136 791	1,917
4	9,5	135 537	1,940
5	9,9	139 835	2,049
	$X_{cp} = 9,96$ $SD = 0,65$ $RSD = 6,53\%$		

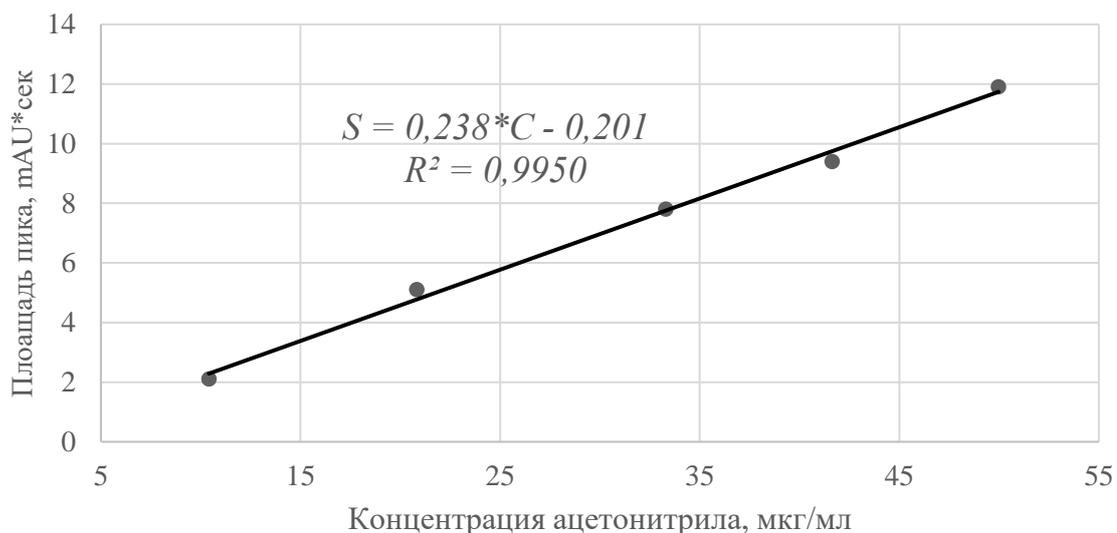
Линейность методики при определении диэтилового эфира и этанола исследовали в диапазоне от 25 мкг/мл до 6000 мкг/мл, ацетонитрила – от 10,0

мкг/мл до 49,2 мкг/мл. Для этого были приготовлены серии стандартных растворов:

- диэтилового эфира с концентрациями 25,33; 50,66; 253,30; 405,28; 506,60 и 607,92 мкг/мл;
- этанола с концентрациями 25,09; 50,18; 250,90; 401,44; 501,80 и 602,16 мкг/мл;
- ацетонитрила с концентрациями 10,41; 20,82; 33,31; 41,64 и 49,97 мкг/мл;

Растворы хроматографируют в порядке увеличения концентрации. Каждый раствор анализируют в трехкратной повторности. Калибровочные графики приведены на рис. 5.17. Коэффициенты корреляции составили более 0,99, что соответствует требованиям ГФ XV.

**а****б**

**В**

**Рис. 5.17 – Калибровочные графики количественного определения: а – диэтиловый эфир; б – этанол; в – ацетонитрил**

Для установления правильности анализировали приготовленные модельные растворы, содержащие диэтиловый эфир, этанол и ацетонитрил на 4 уровнях концентраций. Результаты анализа и их метрологическая оценка представлены в таблице 5.9.

Границы открываемости исследуемых органических растворителей находятся в пределах 90 – 110%. Рассчитанные критерии Стьюдента для каждого из соединений не превышают табличное значение, что свидетельствует о правильности методики.

Таблица 5.9

**Результаты количественного определения диэтилового эфира, этанола,  
ацетонитрила в модельных растворах**

№	Теоретическая концентрация, мкг/мл	S пика, mAU*сек	Найденная концентрация, мкг/мл	Открываемость R, %	Метрологические характеристики
<b>Диэтиловый эфир</b>					
1	24,71	6,4	22,50	91,06	<b><math>R_{cp} = 98,28\%</math></b> <b><math>SD = 4,23</math></b> <b><math>RSD = 4,30\%</math></b> <b><math>\Delta R_{cp} = 2,69</math></b> <b>Критерий</b> <b>Стьюдента:</b> <b><math>t_{расчет.} = 1,41 &lt;</math></b> <b><math>t_{табл.} = 2,20</math></b>
2	28,09	7,5	26,37	93,88	
3	24,91	6,7	23,56	94,58	
4	255,32	74,1	260,54	102,04	
5	247,70	67,3	236,63	95,53	
6	252,33	74,8	263,01	104,23	
7	508,14	141,8	498,58	98,12	
8	512,28	148,7	522,85	102,06	
9	498,82	146,3	514,41	103,13	
10	599,18	165,6	582,27	97,18	
11	603,05	174,2	612,51	101,57	
12	610,44	166,7	586,14	96,02	
Концентрация РСО диэтилового эфира: 500,80 мкг/мл; S <sub>0</sub> : 142,3					
<b>Этанол</b>					
1	26,22	9,0	26,38	100,61	<b><math>R_{cp} = 98,98\%</math></b> <b><math>SD = 2,39</math></b> <b><math>RSD = 2,41\%</math></b> <b><math>\Delta R_{cp} = 1,52</math></b> <b>Критерий</b> <b>Стьюдента:</b> <b><math>t_{расчет.} = 1,48 &lt;</math></b> <b><math>t_{табл.} = 2,20</math></b>
2	24,58	8,3	24,33	98,98	
3	25,06	8,2	24,04	95,93	
4	269,11	88,0	257,97	95,86	
5	255,88	87,0	255,04	99,67	
6	266,05	93,1	272,92	102,58	
7	493,57	170,4	499,53	101,21	
8	498,92	171,0	501,29	100,48	
9	487,51	162,4	476,08	97,66	
10	616,75	200,9	588,94	95,49	
11	613,49	212,0	621,48	101,30	
12	569,25	190,2	557,58	97,95	
Концентрация РСО этанола: 496,6 мкг/мл; S <sub>0</sub> : 169,4					
<b>Ацетонитрил</b>					
1	11,19	2,4	10,37	92,67	<b><math>R_{cp.} = 97,29\%</math></b> <b><math>SD = 4,42</math></b> <b><math>RSD = 4,54\%</math></b> <b><math>\Delta R_{cp} = 2,81</math></b> <b>Критерий</b> <b>Стьюдента:</b> <b><math>t_{расчет.} = 2,12 &lt;</math></b> <b><math>t_{табл.} = 2,20</math></b>
2	10,87	2,3	9,94	91,44	
3	15,12	3,5	15,12	100,00	
4	24,18	5,3	22,89	94,67	
5	26,85	6,5	28,08	104,58	
6	19,23	4,2	18,14	94,33	
7	34,39	8,3	35,85	104,25	
8	44,11	10,4	44,92	101,84	
9	38,87	8,5	36,72	94,47	
10	50,92	11,5	49,68	97,56	
11	47,34	10,6	45,79	96,73	
12	53,66	11,8	50,97	94,99	
Концентрация РСО ацетонитрила: 41,9 мкг/мл; S <sub>0</sub> : 9,7					

Для изучения прецизионности методики была проанализирована субстанция серии 0321, которая по результатам предварительного исследования содержала все три растворителя. Анализ проводился двумя аналитиками в разные дни в шестикратной повторности. Полученные результаты представлены в таблице 5.10.

Относительное стандартное отклонение результатов каждого из аналитиков не превышает допустимых для методик определения примесей 10%. Рассчитанный критерий Фишера не превышает табличного значения, что свидетельствует об удовлетворительной внутрилабораторной прецизионности.

Таблица 5.10

**Результаты оценки прецизионности методики количественного определения диэтилового эфира, этанола, ацетонитрила**

Аналитик 1			Аналитик 2		
Диэтиловый эфир					
Навеска, г	S пика, $mAU \cdot сек$	Рассчитанное содержание, ppm	Навеска, г	S пика, $mAU \cdot сек$	Рассчитанное содержание, ppm
0,5010	54	1 847	0,4815	59	2 057
0,4951	48	1 662	0,5005	55	1 845
0,4906	51	1 782	0,5016	52	1 740
0,5064	56	1 895	0,4888	55	1 889
0,4897	48	1 680	0,4822	50	1 741
0,4904	51	1 782	0,4791	54	1 892
$a_0: 0,2588 \text{ г}$ $S_0: 151$		$X_{cp} = 1 774,67$ $SD = 91,08$ $RSD = 5,13\%$ $S^2 = 8 295,57$	$a_0: 0,2669 \text{ г}$ $S_0: 159$		$X_{cp} = 1 860,67$ $SD = 117,86$ $RSD = 6,33\%$ $S^2 = 13 890,97$
<b>Критерий Фишера: <math>F_{расчет.} = 1,67 &lt; F_{табл.} = 5,05</math></b>					
Этанол					
Навеска, г	S пика, $mAU \cdot сек$	Рассчитанное содержание, ppm	Навеска, г	S пика, $mAU \cdot сек$	Рассчитанное содержание, ppm
0,5010	19	555	0,4815	25	748
0,4951	22	650	0,5005	28	806
0,4906	18	537	0,5016	25	718
0,5064	22	635	0,4888	23	678
0,4897	20	597	0,4822	21	628
0,4904	23	686	0,4791	24	722
$a_0: 0,2516 \text{ г}$ $S_0: 172$		$X_{cp} = 610,00$ $SD = 57,49$ $RSD = 9,42\%$ $S^2 = 3 305,10$	$a_0: 0,2537 \text{ г}$ $S_0: 176$		$X_{cp} = 716,67$ $SD = 60,58$ $RSD = 8,45\%$ $S^2 = 3 669,94$
<b>Критерий Фишера: <math>F_{расчет.} = 1,11 &lt; F_{табл.} = 5,05</math></b>					

Ацетонитрил					
Навеска, г	S пика, mAU*сек	Рассчитанное содержание, ppm	Навеска, г	S пика, mAU*сек	Рассчитанное содержание, ppm
0,5010	2,1	92,63	0,4815	1,7	81,74
0,4951	1,9	84,81	0,5005	1,9	87,88
0,4906	2,0	90,09	0,5016	1,7	78,46
0,5064	1,9	82,91	0,4888	1,9	89,99
0,4897	1,8	81,23	0,4822	1,6	76,82
0,4904	1,9	85,62	0,4791	1,6	77,31
aо: 0,2011 г So: 9,1		X <sub>ср</sub> = 86,22 SD = 4,34 RSD = 5,03% S <sup>2</sup> = 18,84	aо: 0,2153 г So: 9,3		X <sub>ср</sub> = 82,03 SD = 5,65 RSD = 6,89% S <sup>2</sup> = 31,92
<b>Критерий Фишера: F<sub>расчет.</sub> = 1,69 &lt; F<sub>табл.</sub> = 5,05</b>					

### 5.2.2 Определение триэтиламина

Условия анализа:

Колонка	НР-5 (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм)
Газ - носитель	Азот
	деление потока 1/15
	давление газа-носителя 60 кПа
Температура термостата колонок	70°C в течение 4 минут, затем со скоростью 25 °C/мин. до 150 °C
Температура инжектора	230 °C
Температура детектора	250 °C
Объем пробы	1 мкл
Способ ввода пробы	прямой ввод
Детектор	ПИД, скорость подачи воздуха – 400 мл/мин, водорода – 40 мл/мин.
Время хроматографирования	10 мин.

*Приготовление испытуемого раствора:*

Около 0,5 г (точная навеска) субстанции 2-АБФПК помещают в мерную колбу вместимостью 5 мл, растворяют в 2 мл диметилформамида, доводят объём раствора до метки и перемешивают. Концентрация 2-АБФПК в растворе составила 100 мг/мл.

*Приготовление стандартного раствора:*

Около 0,25 г триэтиламина (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл диметилформамида, доводят объём раствора до метки и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объём раствора диметилформамидом до метки и перемешивают. Концентрация триэтиламина в растворе составила 500 мкг/мл.

Хроматографируют стандартный и испытуемый раствор в разработанных условиях.

Содержание триэтиламина в ppm (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 1 \times 5 \times P}{S_0 \times 50 \times 10 \times a \times 100} \times 10^6 = \frac{S \times a_0 \times P \times 100}{S_0 \times a}$$

где,

$S$  – площадь пика триэтиламина на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика триэтиламина на хроматограмме стандартного раствора;

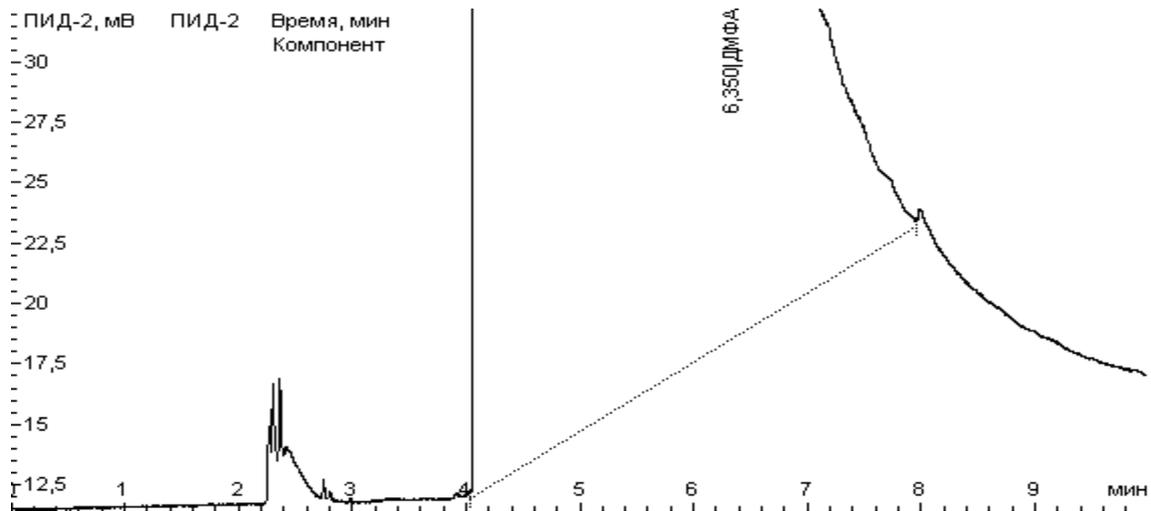
$a$  – навеска субстанции, в граммах;

$a_0$  – навеска триэтиламина, используемая для приготовления стандартного раствора, в граммах;

$P$  – содержание триэтиламина в стандартном образце, используемом для приготовления стандартного раствора в процентах.

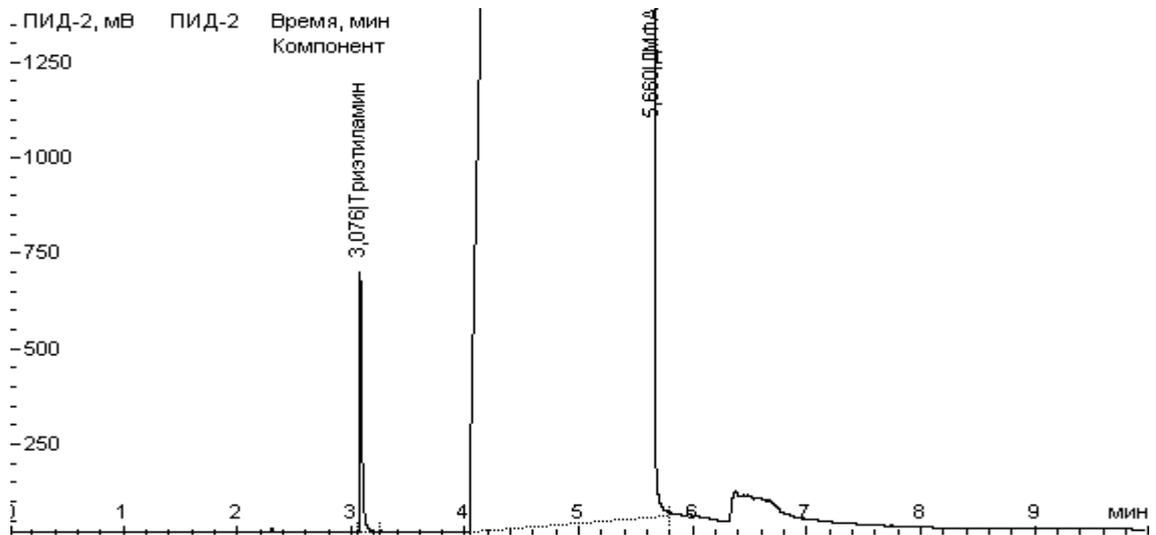
Специфичность методики устанавливали путем хроматографирования растворителя, стандартного раствора триэтиламина и испытуемого раствора субстанции.

На хроматограмме растворителя отсутствовали пики, совпадающие с пиком триэтиламина по времени удерживания (рис. 5.18):

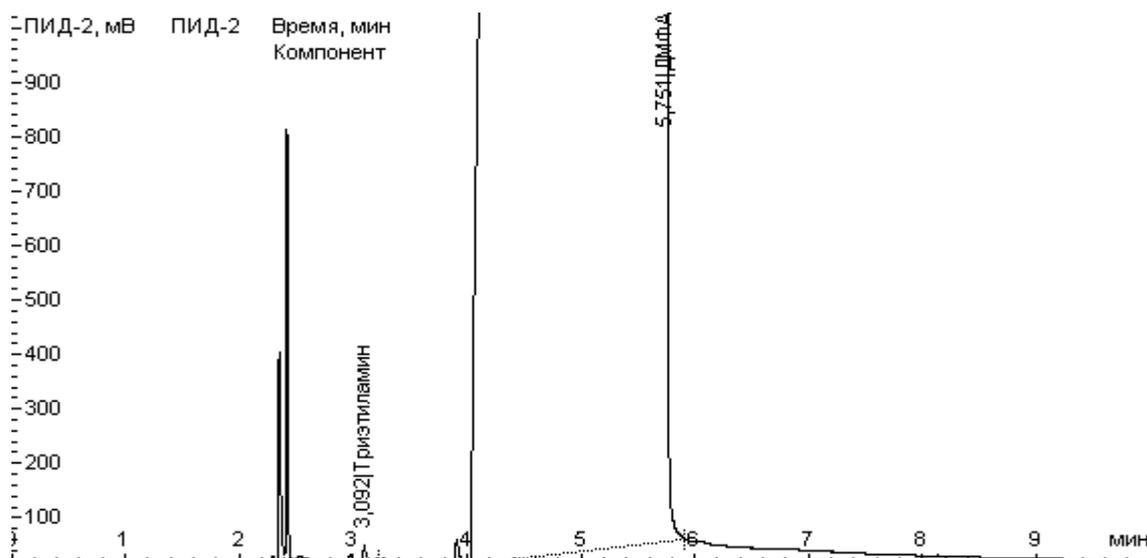


**Рис. 5.18 – Хроматограмма растворителя**

Времена удерживания триэтиламина на хроматограммах стандартного (рис. 5.19) и испытуемого растворов совпадают. Разрешение между пиком триэтиламина и ближайшим пиком на хроматограмме испытуемого раствора более 2,7 (рис. 5.20).



**Рис. 5.19 – Хроматограмма стандартного раствора триэтиламина  
(концентрация 500 мкг/мл)**



**Рис. 5.20 – Хромотограмма испытуемого раствора субстанции (серия 0122)**

Пригодность хроматографической системы оценивали путем пятикратного хроматографирования стандартного раствора триэтиламина.

Рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика триэтиламина, фактор асимметрии ( $A_s$ ), эффективность хроматографической колонки (N). Результаты представлены в таблице 5.11.

**Таблица 5.11**

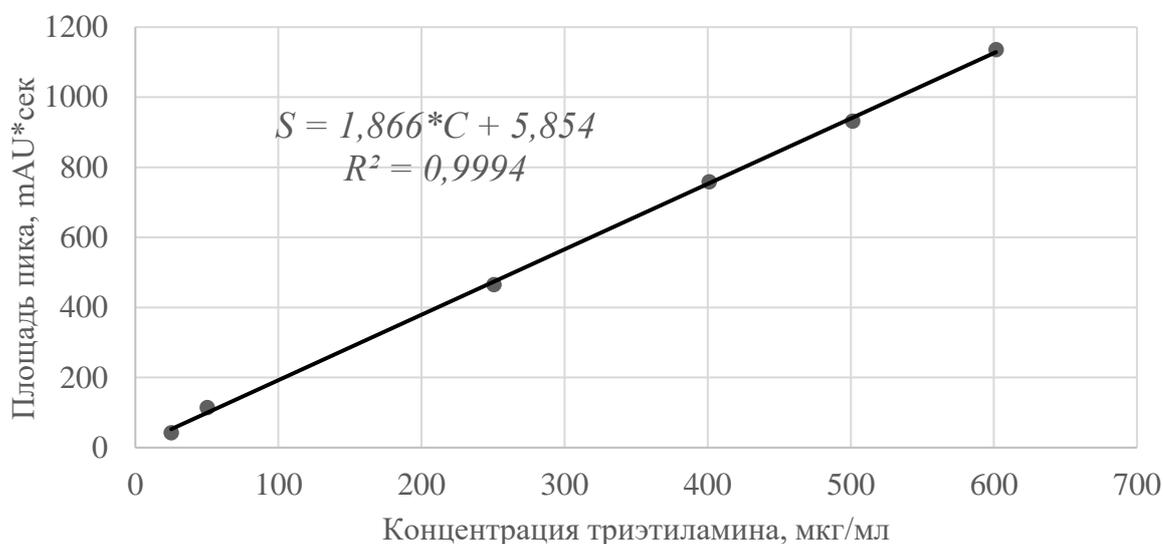
**Результаты оценки пригодности хроматографической системы при анализе триэтиламина**

№	Площадь пика, $mAU \cdot сек$	N, ТТ	$A_s$
1	945	110 910	2,145
2	968	110 230	2,125
3	950	126 899	2,296
4	936	110 458	2,304
5	917	108 987	2,158
	$X_{cp.} = 943,20$ $SD = 18,73$ $RSD = 1,99\%$		

Линейность методики определяли в диапазоне от 25 мкг/мл до 6000 мкг/мл.

Для этого были приготовлены серия стандартных растворов триэтиламина с концентрациями 25,1; 50,1; 250,5; 400,9; 501,1 и 601,3 мкг/мл. Растворы

хроматографировали в порядке увеличения концентрации. Каждый раствор анализировали в трехкратной повторности. Калибровочный график представлен на рисунке 5.21.



**Рис. 5.21 – Калибровочный график количественного определения триэтиламина**

Коэффициент корреляции составил более 0,99, что соответствует требованиям ГФ XV.

Правильность методики устанавливали путем анализа приготовленных испытуемых модельных растворов субстанции с известным добавленным количеством триэтиламина. Для приготовления модельных растворов использовали субстанцию 2-АБФПК серии 0321, триэтиламин в которой не детектировался при использовании разработанной методики.

Концентрации триэтиламина в модельных растворах составили на уровне 25; 250; 500; 600 мкг/мл, что соответствует 5, 50, 100 и 120% от нормируемого содержания триэтиламина в испытуемом растворе.

Результаты анализа и их метрологическая оценка представлены в таблице 5.12.

Таблица 5.12

**Результаты количественного определения триэтиламина  
в модельных растворах**

<b>№</b>	<b>Теоретическая концентрация, мкг/мл</b>	<b>S пика, mAU*сек</b>	<b>Найденная концентрация, мкг/мл</b>	<b>Открываемость R, %</b>
1	24,66	45	23,89	96,88
2	24,82	47	24,95	100,52
3	25,69	49	26,02	101,28
4	250,85	474	251,66	100,32
5	250,04	455	241,57	96,61
6	252,66	465	246,88	97,71
7	501,63	955	507,03	101,08
8	503,07	923	490,04	97,41
9	500,68	932	494,82	98,83
10	601,97	1 133	601,53	99,93
11	598,33	1 121	595,16	99,47
12	603,69	1 142	606,31	100,43
Концентрация стандартного раствора ТЭА: 502,78 мкг/мл <b>S<sub>0</sub>: 947</b>				<b>R<sub>ср</sub> = 99,21%</b> <b>SD = 1,67</b> <b>RSD = 1,68%</b> <b>ΔR<sub>ср</sub> = 1,06</b> <b>Критерий</b> <b>Стьюдента:</b> <b>t<sub>расчет.</sub> = 1,64 &lt;</b> <b>t<sub>табл.</sub> = 2,20</b>

Границы открываемости триэтиламина находятся в пределах 90 – 110%. Расчетный критерий Стьюдента (1,64) не превышает табличное значение. Следовательно, разработанная методика валидна по показателю «Правильность».

Прецизионность методики определения триэтиламина

Для изучения прецизионности методики была проанализирована субстанция серии 0722 двумя аналитиками в разные дни. Каждый аналитик проводил анализ в шестикратной повторности. Полученные результаты представлены в таблице 5.13.

**Результаты оценки прецизионности методики количественного  
определения триэтиламина**

Аналитик 1			Аналитик 2		
Навеска, г	S пика, mAU*сек	Рассчитанное содержание, ppm	Навеска, г	S пика, mAU*сек	Рассчитанное содержание, ppm
0,5010	218	1 180	0,4815	232	1 277
0,4951	198	1 084	0,5005	244	1 292
0,4906	209	1 154	0,5016	222	1 173
0,5064	201	1 076	0,4888	225	1 220
0,4897	206	1 140	0,4822	236	1 297
0,4904	215	1 188	0,4791	227	1 256
<b>a<sub>0</sub>: 0,2523 г *</b> <b>S<sub>0</sub>: 931</b>		<b>X<sub>ср</sub> = 1 137,00</b> <b>SD = 47,49</b> <b>RSD = 4,18%</b> <b>S<sup>2</sup> = 2255,30</b>	<b>a<sub>0</sub>: 0,2611* г</b> <b>S<sub>0</sub>: 985</b>		<b>X<sub>ср</sub> = 1 252,50</b> <b>SD = 48,02</b> <b>RSD = 3,83%</b> <b>S<sup>2</sup> = 2305,92</b>
<b>Критерий Фишера: F<sub>расчет.</sub> = 1,02 &lt; F<sub>табл.</sub> = 5,05</b>					

\* с учетом содержания в стандартном образце (99,5%)

Относительное стандартное отклонение результатов каждого из аналитиков не превышает допустимых для методик определения примесей 10%. Рассчитанный критерий Фишера не превышает табличного значения, что свидетельствует об удовлетворительной внутрилабораторной прецизионности.

### 5.2.3 Определение бензола

Для определения бензола в субстанции 2-АБФПК предложены следующие условия:

Колонка	НР-FFAP (50 м × 0,32 мм × 0,5 мкм)
Газ - носитель	Азот деление потока 1/15 давление газа-носителя 45 кПа
Температура термостата колонок	55°C в течение 1 минуты, затем со скоростью 10 °C/мин. повышение до 150 °C, затем со скоростью 25 °C/мин. повышение до 210 °C
Температура инжектора	210 °C
Температура детектора	240 °C
Объем пробы	1 мл
Способ ввода пробы	паро-фазный анализ
Детектор	ПВД, скорость подачи воздуха – 420 мл/мин, водорода – 42 мл/мин.

<i>Время</i>	30 мин.
<i>хроматографирования</i>	
<i>Температура</i>	80 °С
<i>термостатирования</i>	
<i>Температура крана</i>	80 °С
<i>Время термостатирования</i>	15 минут

*Приготовление испытуемого раствора:*

Около 0,5 г (точная навеска) субстанции 2-АБФПК помещают в мерную колбу вместимостью 5 мл, растворяли в 2 мл диметилформамида, доводили объём раствора до метки и перемешивали. Концентрация 2-АБФПК в растворе составила 100 мг/мл.

*Приготовление стандартного раствора:*

Около 0,040 г бензола (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 25 мл диметилформамида, доводят объём раствора до метки и перемешивают (исходный раствор А).

0,5 мл исходного раствор А помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора до метки диметилформамидом и перемешивают (исходный раствор Б).

0,5 мл раствора Б помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объём раствора диметилформамидом до метки и перемешивают. Концентрации бензола в растворе составила 0,2 мкг/мл.

2,0 мл стандартного (испытуемого раствора) помещают в пенициллиновый флакон, термостатируют 15 минут, 1 мл парогазовой фазы вводят в инжектор хроматографа.

Хроматографируют стандартный и испытуемый раствор в разработанных условиях.

Содержание бензола в ppm (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 0,5 \times 0,5 \times 5 \times P}{S_0 \times 50 \times 100 \times 10 \times a \times 100} \times 10^6 = \frac{S \times a_0 \times P}{S_0 \times a \times 4}$$

где,

$S$  – площадь пика бензола на хроматограмме испытуемого раствора;

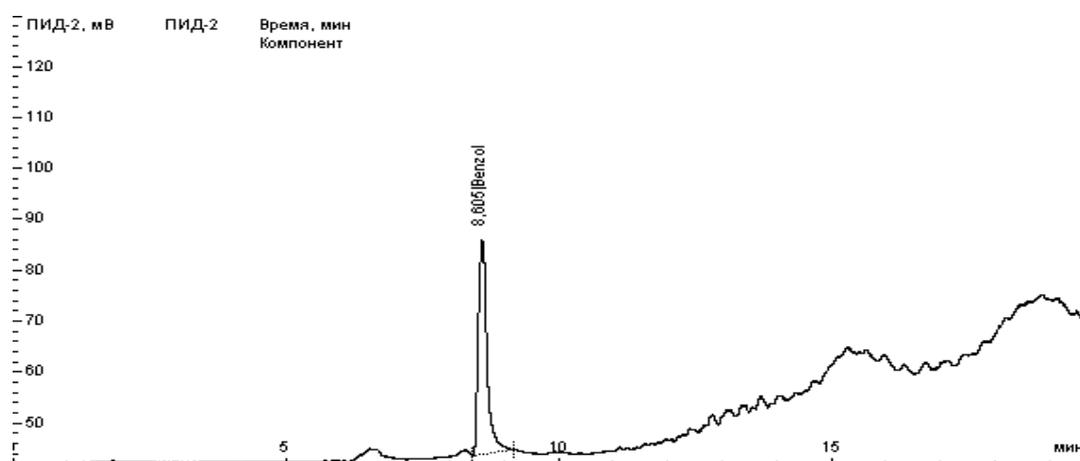
$S_0$  – площадь пика бензола на хроматограмме стандартного раствора;

$a$  – навеска субстанции, в граммах;

$a_0$  – навеска бензола, используемая для приготовления стандартного раствора, в граммах;

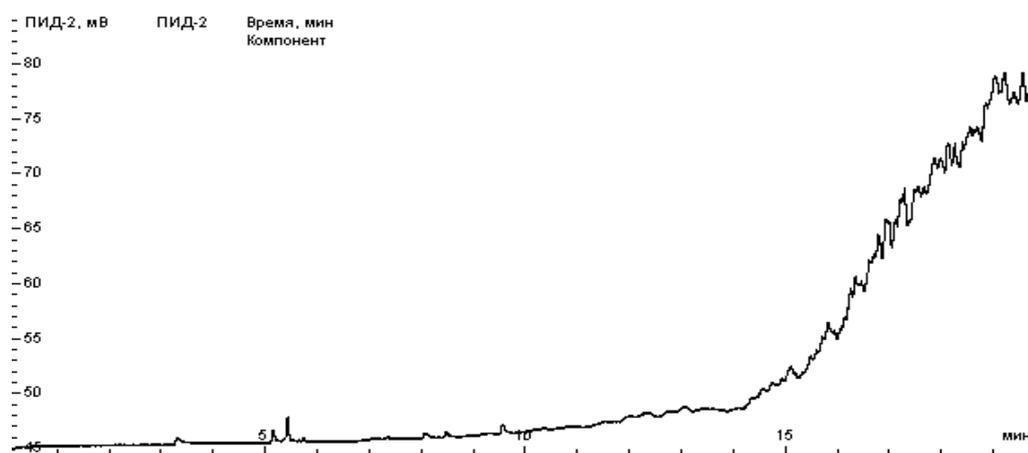
$P$  – содержание бензола в стандартном образце, используемом для приготовления стандартного раствора в процентах.

Хроматограмма стандартного раствора бензола представлена на рис. 5.22.



**Рис. 5.22 – Хроматограмма стандартного раствора бензола (концентрация 0,2 мкг/мл)**

Для определения специфичности хроматографирования растворитель. На хроматограмме растворителя отсутствовали пики, совпадающие с пиком бензола по времени удерживания (рис. 5.23).



**Рис. 5.23 – Хроматограмма растворителя**

Пригодность хроматографической системы оценивали путем пятикратного хроматографирования стандартного раствора бензола.

Рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика бензола, фактор асимметрии ( $A_s$ ), эффективность хроматографической колонки (N). Результаты представлены в таблице 5.14.

Таблица 5.14

**Результаты оценки пригодности хроматографической системы при анализе бензола**

№	S пика бензола, $mAU \cdot сек$	N, ТТ	$A_s$
1	486,2	13 564	1,694
2	469,1	13 267	1,987
3	472,2	13 254	1,720
4	449,2	12 994	1,876
5	461,9	13 702	1,626
	$X_{ср.} = 467,72$ $SD = 13,60$ $RSD = 2,91\%$		

Линейность методики определяли в диапазоне от 0,05 мкг/мл до 0,24 мкг/мл.

Для этого были приготовлены серия стандартных растворов бензола с концентрациями 0,051; 0,102; 0,163; 0,204 и 0,245 мкг/мл. Растворы хроматографировали в порядке увеличения концентрации. Каждый раствор анализировали в трехкратной повторности. Калибровочный график представлен на рисунке 5.24.

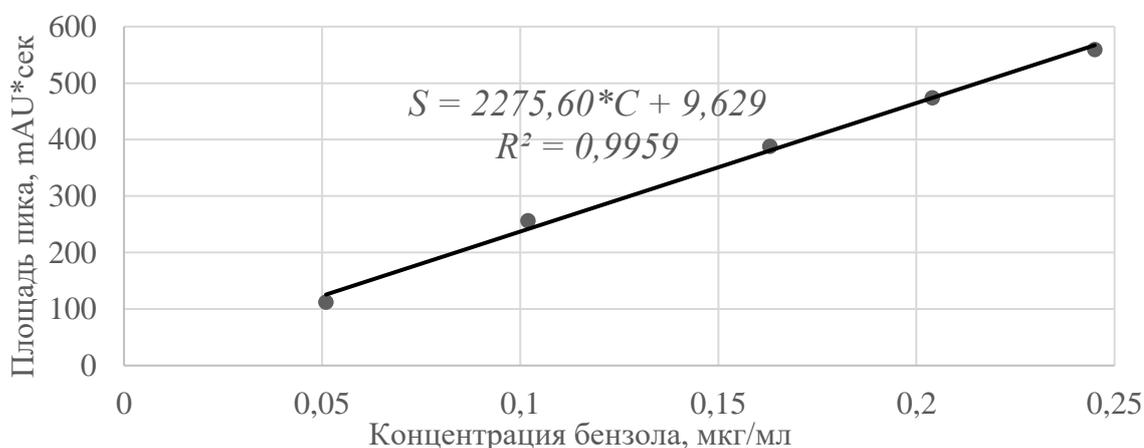


Рис. 5.24 – Калибровочный график количественного определения бензола

Коэффициент корреляции составил более 0,99, что соответствует требованиям ГФ XV.

Правильность методики устанавливали путем анализа приготовленных модельных растворов бензола. Концентрации бензола в модельных растворах составили на уровне 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 мкг/мл, что соответствует 25, 50, 100 и 120 % от нормируемого содержания триэтиламина в испытуемом растворе.

Результаты анализа и их метрологическая оценка представлены в таблице 5.15.

Таблица 5.15

**Результаты количественного определения бензола  
в модельных растворах**

№	Теоретическая концентрация, мкг/мл	S пика, $mAU \cdot сек$	Найденная концентрация, мкг/мл	Открываемость R, %
1	0,054	121	0,052	96,30
2	0,048	119	0,051	106,25
3	0,052	112	0,048	92,31
4	0,105	249	0,107	101,90
5	0,111	272	0,117	105,41
6	0,097	209	0,090	92,78
7	0,189	430	0,185	97,88
8	0,204	479	0,206	100,98
9	0,215	516	0,222	103,26
10	0,244	527	0,227	93,03
11	0,257	616	0,265	103,11
12	0,241	525	0,226	93,78
Концентрация стандартного раствора бензола: 0,204 мкг/мл $S_0$ : 474				$R_{cp} = 98,92\%$ $SD = 5,19$ $RSD = 5,25\%$ $\Delta R_{cp} = 3,30$ <b>Критерий Стьюдента:</b> $t_{расч.} = 1,70 <$ $t_{табл.} = 2,20$

Границы открываемости триэтиламина находятся в пределах 90 – 110%. Расчетный критерий Стьюдента (0,54) не превышает табличное значение. Следовательно, разработанная методика валидна по показателю «Правильность».

Прецизионность методики определения бензола

Для изучения прецизионности методики была проанализирована субстанция серии 0722 двумя аналитиками в разные дни. Каждый аналитик проводил анализ в шестикратной повторности. Полученные результаты представлены в таблице 5.16.

Таблица 5.16

**Результаты оценки прецизионности методики количественного определения бензола**

Аналитик 1			Аналитик 2		
Навеска, г	S пика, $mAU \cdot сек$	Рассчитанное содержание, ppm	Навеска, г	S пика, $mAU \cdot сек$	Рассчитанное содержание, ppm
0,5010	135	0,57	0,4815	122	0,55
0,4951	165	0,70	0,5005	136	0,59
0,4906	144	0,62	0,5016	160	0,69
0,5064	141	0,59	0,4888	129	0,57
0,4897	133	0,57	0,4822	149	0,67
0,4904	148	0,64	0,4791	125	0,57
$a_0: 0,0411$ г $S_0: 486$		$X_{cp} = 0,62$ $SD = 0,05$ $RSD = 8,06\%$ $S^2 = 0,0025$	$a_0: 0,0495$ г $S_0: 568$		$X_{cp} = 0,61$ $SD = 0,06$ $RSD = 9,84\%$ $S^2 = 0,0036$
<b>Критерий Фишера: <math>F_{расчет.} = 1,44 &lt; F_{табл.} = 5,05</math></b>					

Относительное стандартное отклонение результатов каждого из аналитиков не превышает допустимых для методик определения примесей 10%. Рассчитанный критерий Фишера не превышает табличного значения, что свидетельствует об удовлетворительной внутрилабораторной прецизионности.

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Определены оптимальные условия разделения родственных примесей в субстанции 2-АБФПК методом ВЭЖХ-УФ. При изократическом элюировании в подвижной фазе состава фосфатный буфер (рН 6,8) – ацетонитрил (65:35) детектируются идентифицированная примесь (4-броманилин) и неидентифицированные примеси с RRT 0,85 и 0,91. Для оценки содержания идентифицированной примеси предложен расчет по стандартному раствору 4-броманилина, для неидентифицированных примесей – расчет с использованием в качестве раствора сравнения разведение основного соединения.
2. Проведена валидация ВЭЖХ-методик определения родственных примесей в субстанции 2-АБФПК. Специфичность разработанных условий подтверждена путем стресс-испытаний раствора соединения. Доказано, что используемая хроматографическая система полностью разделяет пик исследуемого вещества, 4-броманилина и пики неидентифицированных примесей. Установлено, что разработанные методики характеризуются высокой чувствительностью (ПКО для 4-БА составил 0,20 мкг/мл для 2-АБФПК – 0,25 мкг/мл), линейны в диапазоне от 0,0125 до 0,4% от содержания 2-АБФПК в испытуемом растворе – для неидентифицированных примесей, и от 0,01 до 0,12 % – для 4-броманилина. Результаты оценки правильности и прецизионности методик удовлетворяют требованиям ГФ РФ.
3. С помощью метода ВЭЖХ-МС/МС получены масс-спектры 2-АБФПК в режиме положительной и отрицательной ионизации электроспреем. Анализ спектров показал наличие интенсивных ионов со значениями  $m/z$  392 и 394 (положительная ионизация), 390 и 392 (отрицательная ионизация), которые соответствуют протонированным и депротонированным молекулам соединения. По данным изучения вторичных спектров предложены схемы фрагментации молекулярных ионов 2-АБФПК.
4. Установлено, что масс-спектр неидентифицированной примеси (RRT 0,85) содержит те же молекулярные ионы, что и 2-АБФПК как в режиме положительной, так и отрицательной ионизации. Учитывая сходный характер

фрагментации молекулярных ионов, предполагается, что неидентифицированная примесь является Z – изомером 2-АБФПК.

5. По результатам определения примесей в 4 сериях субстанции 2-АБФПК установлены следующие нормы содержания: 4-БА не более 0,1%, неидентифицированная примесь (RRT 0,85) – не более 0,3%, единичная неидентифицированная примесь – не более 0,1%, сумма примесей – не более 0,5%.

6. Разработаны условия определения 5 органических растворителей, используемых в синтезе субстанции 2-АБФПК, методом ГЖХ. Оптимальное разделение диэтилового эфира, этанола, ацетонитрила и бензола обеспечила колонка HP-FFAP, при анализе триэтиламина – колонка HP-5. Для приготовления стандартных и испытуемых растворов в качестве растворителя предложен диметилформамид. Для достижения необходимого уровня чувствительности в методику определения бензола включена пробоподготовка на основе парофазного анализа.

7. В процессе валидации установлено, что методики определения остаточных растворителей методом ГЖХ обладают необходимой чувствительностью, специфичностью, линейностью, правильностью и прецизионностью. Анализ трех серий субстанций 2-АБФПК показал, что уровень ООС не превышает нормируемых пределов содержания: бензол – не более 2 ppm; ацетонитрил – не более 410 ppm; этанол, диэтиловый эфир, триэтиламин – не более 5000 ppm.

## ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ 2-АБФПК В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

### 6.1 Определение 2-АБФПК в плазме крови

На этапе разработки методики определения 2-АБФПК в извлечениях из биологических жидкостей нами был апробирован элюент состава фосфатный буфер (рН 6,8): ацетонитрил в соотношении 50:50, ранее предложенный для количественной оценки соединения в субстанции (см. Главу 5).

Разделение проводили на хроматографической колонке С18 «Luna 5 $\mu$  С18(2) 100А (250 $\times$ 4,6 мм). Температура термостата колонки 40 $^{\circ}$ С. Детектирование осуществляли при длине волны 258 нм.

Модельные смеси готовили путем добавления 100 мкл водно-метанольного раствора 2-АБФПК к 900 мкл плазмы крови.

Для получения извлечения из плазмы использовали простейший способ пробоподготовки – осаждение белков плазмы крови органическим растворителем. В качестве осаждающих реагентов использовали совместимые с вариантом обращенно-фазной ВЭЖХ метанол и ацетонитрил.

Пробоподготовка модельных смесей плазмы крови осуществлялась по следующей *методике*:

в пробирку типа Эппендорф помещают 200 мкл пробы и 300 мкл органического растворителя. Содержимое пробирки перемешивают на лабораторном шейкере в течение 5 минут при 1500 об/мин. Далее центрифугируют в течение 10 минут при 10 000 об/мин. Супернатант переносят в хроматографическую виалу и анализируют методом ВЭЖХ-УФ. 50 мкл извлечения вводят в инжектор хроматографа.

Для оценки эффективности экстракции 2-АБФПК из плазмы крови площади хроматографических пиков в извлечениях сравнивали со стандартными растворами соединения известной концентрации.

В качестве модельных смесей использовали растворы плазмы крови с концентрацией 2-АБФПК на уровне 1 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл. В качестве стандартных растворов использовали водные растворы 2-АБФПК в аналогичных

концентрациях. Пробоподготовка модельных растворов и стандартных растворов проводилась одинаково.

Результаты эксперимента представлены в таблицах 6.1 – 6.4.

Таблица 6.1

**Степень экстракции ацетонитрилом 2-АБФПК из модельных смесей плазмы крови (концентрация 10 мкг/мл)**

<b>S пика 2-АБФПК в модельной смеси*, mAU*сек</b>	<b>Найденная концентрация, мкг/мл</b>	<b>Степень извлечения, %</b>	<b>Метрологические характеристики (n = 6)</b>
745 815	9,624	96,24	$X_{cp} = 98,86\%$ $SD = 1,65$ $RSD = 1,67\%$
762 942	9,845	98,45	
773 481	9,981	99,81	
758 524	9,788	97,88	
777 511	10,033	100,33	
778 518	10,046	100,46	
<i>Площадь пика 2-АБФПК в стандартном растворе*: 774 954</i>			

\*среднее значение трех параллельных измерений

Таблица 6.2

**Степень экстракции метанолом 2-АБФПК из модельных смесей плазмы крови (концентрация 10 мкг/мл)**

<b>S пика 2-АБФПК в модельной смеси*, mAU*сек</b>	<b>Найденная концентрация, мкг/мл</b>	<b>Степень извлечения, %</b>	<b>Метрологические характеристики (n = 6)</b>
571 294	7,379	73,79	$X_{cp} = 72,09\%$ $SD = 0,89$ $RSD = 1,23\%$
556 493	7,187	71,87	
553 238	7,145	71,45	
552 928	7,141	71,41	
555 873	7,179	71,79	
559 437	7,225	72,25	
<i>Площадь пика 2-АБФПК в стандартном растворе*: 774 261</i>			

\*среднее значение трех параллельных измерений

По данным анализа модельных смесей плазмы с концентрацией 2-АБФПК 10 мкг/мл установлено, что пробоподготовка с использованием ацетонитрила более эффективна, чем осаждение белков метанолом. Поэтому следующие испытания на концентрациях 1 и 5 мкг/мл проводили с применением ацетонитрила.

Таблица 6.3

**Степень экстракции ацетонитрилом 2-АБФПК из модельных смесей плазмы крови (концентрация 5 мкг/мл)**

<b>S пика 2-АБФПК в модельной смеси*, mAU*сек</b>	<b>Найденная концентрация, мкг/мл</b>	<b>Степень извлечения, %</b>	<b>Метрологические характеристики (n = 6)</b>
376 966	4,912	98,24	$X_{cp} = 99,22\%$ $SD = 0,85$ $RSD = 0,86\%$
380 957	4,964	99,28	
384 065	5,005	100,09	
379 038	4,939	98,78	
385 024	5,017	100,34	
378 194	4,928	98,56	
<i>Площадь пика 2-АБФПК в стандартном растворе*: 383 720</i>			

\*среднее значение трех параллельных измерений

Таблица 6.4

**Степень экстракции ацетонитрилом 2-АБФПК из модельных смесей плазмы крови (концентрация 1 мкг/мл)**

<b>S пика 2-АБФПК в модельной смеси*, mAU*сек</b>	<b>Найденная концентрация, мкг/мл</b>	<b>Степень извлечения, %</b>	<b>Метрологические характеристики (n = 6)</b>
76 885	0,9931	99,31	$X_{cp} = 95,72\%$ $SD = 2,89$ $RSD = 3,02\%$
71 660	0,9256	92,56	
75 399	0,9739	97,39	
71 234	0,9201	92,01	
74 145	0,9577	95,77	
75 314	0,9728	97,28	
<i>Площадь пика 2-АБФПК в стандартном растворе*: 77 420</i>			

\*среднее значение трех параллельных измерений

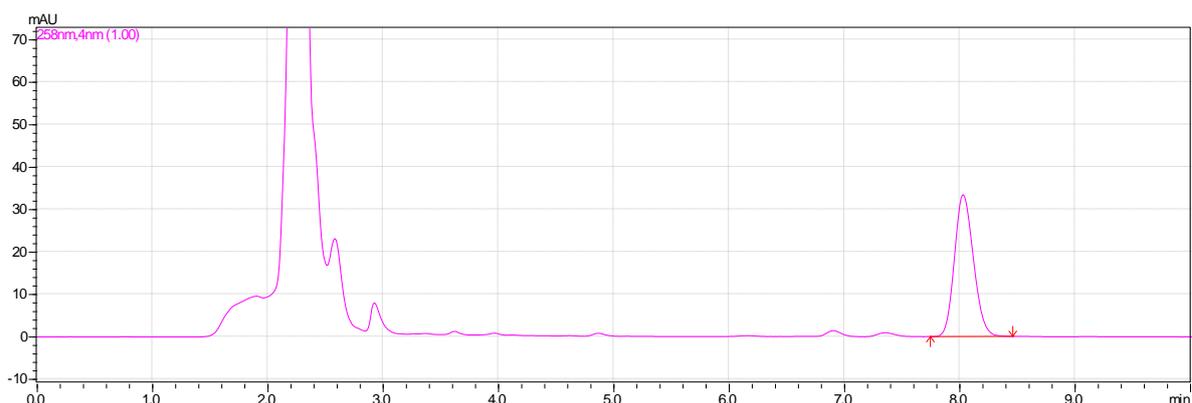
Полученные данные позволяют судить об эффективности предложенных условий пробоподготовки. Процент извлечения 2-АБФПК из модельных смесей плазмы крови при осаждении ацетонитрилом составил более 95% на всех уровнях концентраций исследуемого соединения.

Валидация биоаналитической методики проводилась согласно «Руководству по экспертизе лекарственных средств» (том 1, Глава 7, Приложение III «Валидация методики») [101].

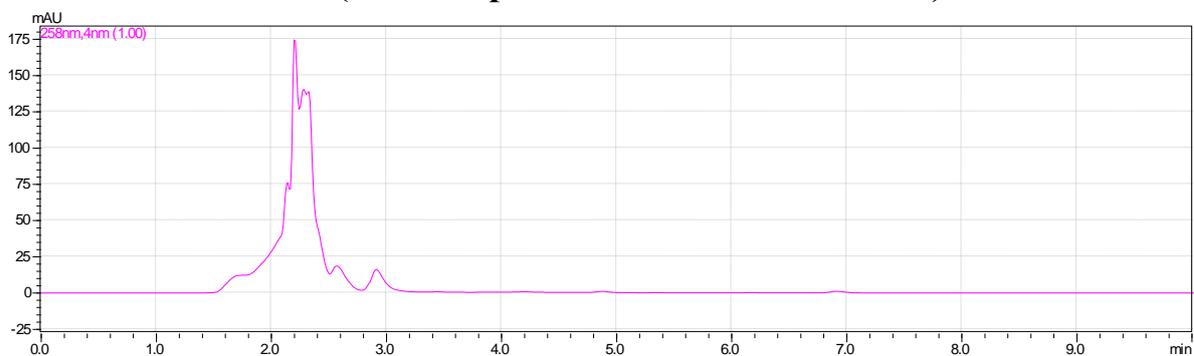
## Селективность

Для определения селективности в разработанных условиях анализировали извлечения из модельной смеси плазмы крови (концентрация 2-АБФПК 5 мкг/мл), «холостые» пробы плазмы человека из 6 различных источников, а также «холостые» пробы плазмы лабораторных животных (крысы, кролика). Пробоподготовку проводили с использованием разработанных условий.

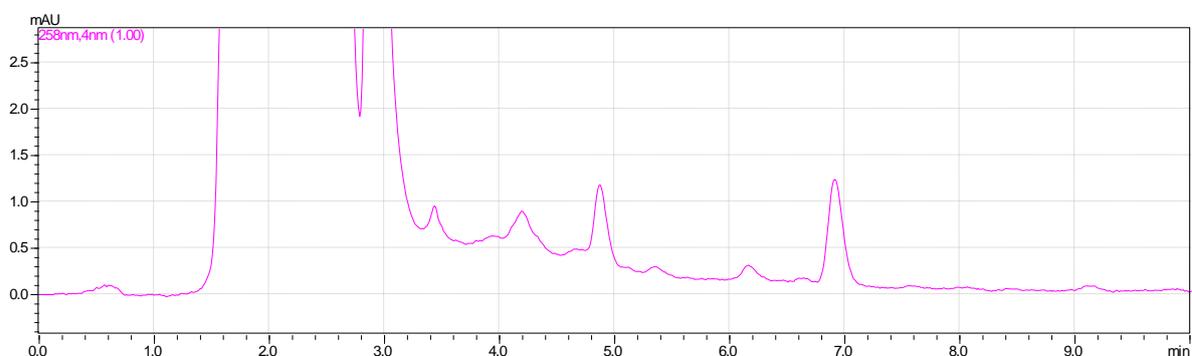
Примеры хроматограмм представлены на рис. 6.1 – 6.2.



**Рис. 6.1 – Хроматограмма извлечения из модельной смеси плазмы крови (концентрация 2-АБФПК 5 мкг/мл)**



**а**



**б**

**Рис. 6.2 – Хроматограмма извлечения из холостой пробы плазмы крови (б – увеличенный формат)**

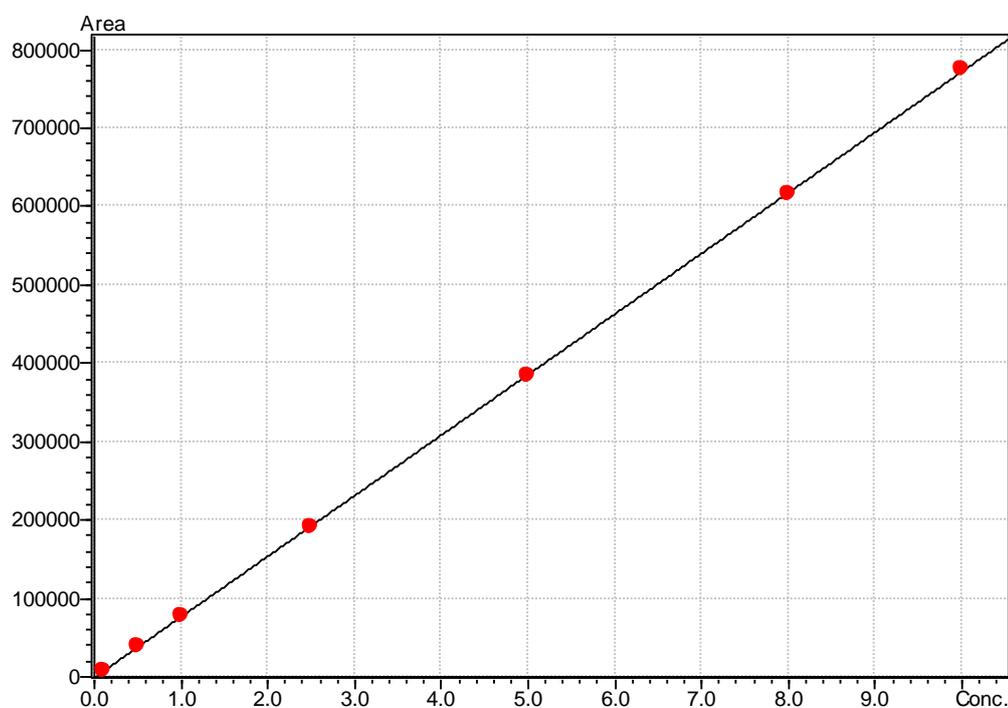
На хроматограмме извлечения из модельной смеси плазмы крови время удерживания 2-АБФПК составило 8,08 мин. В ходе анализа «холостых» проб было выявлено, что пики эндогенных соединений плазмы выходят на участке хроматограммы до 7-х минут. На времени удерживания 2-АБФПК мешающие хроматографические пики отсутствуют, что подтверждает селективность выбранных условий.

### ***Линейность***

Для определения критерия линейности методики были приготовлены 7 модельных смесей плазмы крови с содержанием 2-АБФПК в диапазоне от 0,1 мкг/мл до 10 мкг/мл.

Пробоподготовка модельных смесей проводилась в соответствии с разработанным методом. Извлечение переносили в хроматографическую вialу, 50 мкл вводили в инжектор хроматографа.

Каждое извлечение анализировали трижды. Для каждой концентрации измеряли площадь хроматографического пика и строили калибровочный график (рис. 6.3).



**Рис. 6.3 – Калибровочный график количественного определения 2-АБФПК в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ**

Уравнение калибровочного графика имеет вид:  $S = 77274,71 \times C - 650,44$ , где:  $S$  – площадь хроматографического пика;  $C$  – концентрация 2-АБФПК в модельной смеси, мкг/мл. Коэффициент корреляции  $R^2$  составил 0,9999, что подтверждает линейность отклика детектора от концентрации соединения.

Согласно требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам, необходимо произвести обратный перерасчет концентраций, согласно полученной калибровочной зависимости (таблица 6.5).

Экспериментально рассчитанные концентрации должны находиться в пределах  $\pm 15\%$  от номинальных значений концентраций ( $\pm 20\%$  – для нижнего предела количественного определения).

Таблица 6.5

#### Обратный перерасчет концентраций

Теоретическая концентрация 2-АБФПК в модельной смеси, мкг/мл	Рассчитанная концентрация 2-АБФПК в модельной смеси, мкг/мл	Отклонения от теоретической концентрации, %
0,10	0,114	14,00
0,50	0,510	2,00
1,00	1,009	0,90
2,50	2,482	-0,72
5,00	4,974	-0,52
8,00	7,974	-0,32
10,00	10,037	0,37

Полученные результаты соответствуют предъявляемым критериям.

#### **Правильность и прецизионность**

Для определения критериев правильности и прецизионности методики готовили по 6 модельных образцов на 4 уровнях концентраций 2-АБФПК: 0,10 мкг/мл (LLOQ); 0,30 мкг/мл (QCL); 4,09 мкг/мл (QCM); 8,18 мкг/мл (QCN). Проводили анализ внутри одного аналитического цикла.

Правильность и прецизионность метода оценивали по результатам параллельных анализов образцов контроля качества в составе одного аналитического цикла. Подготовку образцов для анализа осуществляли в

соответствии с разработанной методикой пробоподготовки. Расчет концентраций образцов контроля качества проводился по калибровочной кривой.

Прецизионность и правильность методики оценивали по величинам относительного стандартного отклонения (RSD) и относительной погрешности ( $\epsilon$ ), соответственно (таблица 6.6).

Таблица 6.6

**Правильность и прецизионность методики количественного определения 2-АБФПК в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ**

Концентрация 2-АБФПК в модельной смеси, мкг/мл	S пика 2-АБФПК, mAU*сек	Рассчитанная концентрация, мкг/мл	$\bar{x}$	SD	RSD, %	$\epsilon$ , %
0,10	5 597	0,081	0,099	0,012	12,12	-1,00
	6 489	0,092				
	7 245	0,102				
	7 956	0,111				
	7 999	0,112				
	6 581	0,094				
0,30	20 514	0,274	0,298	0,019	6,38	-0,67
	21 359	0,285				
	23 515	0,313				
	24 377	0,324				
	21 559	0,287				
	22 832	0,304				
4,09	268 566	3,484	3,935	0,367	9,33	-3,79
	296 967	3,851				
	317 521	4,117				
	274 048	3,555				
	324 476	4,207				
	338 786	4,393				
8,18	680 999	8,821	8,561	0,646	7,55	4,66
	711322	9,214				
	588 656	7,626				
	612 511	7,935				
	704 568	9,126				
	667 303	8,644				

Относительное стандартное отклонение и относительная погрешность результатов анализа образцов контроля качества не превышает 15% для всех

концентраций, что свидетельствует о приемлемой правильности и прецизионности разработанной методики.

### ***Нижний предел количественного определения***

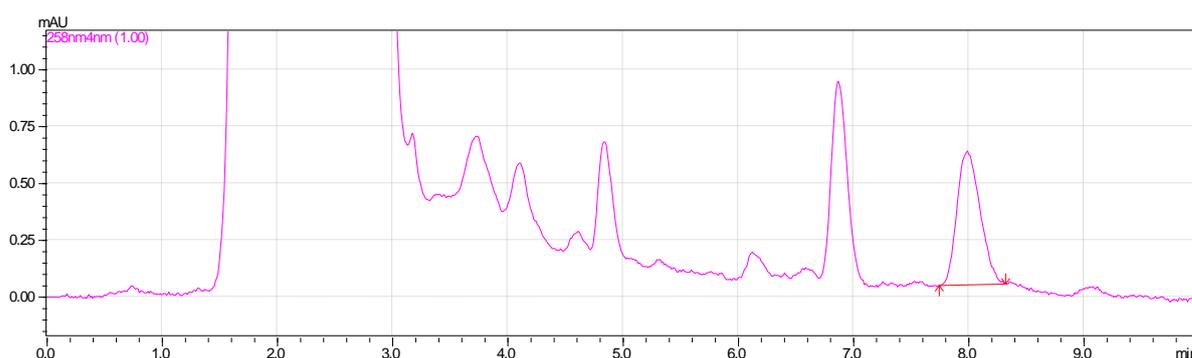
В нашем исследовании нижний предел количественного определения составил 0,1 мкг/мл. Данная концентрация поддается надежному количественному определению с приемлемой правильностью и прецизионностью.

Отношение сигнала аналита с НПКО превосходит величину сигнала холостого образца не менее чем в 5 раз, что соответствует критериям приемлемости для биоаналитических методик (таблица 6.7). Пример хроматограммы извлечения из модельной смеси с концентрацией 2-АБФПК на уровне НПКО представлен на рисунке 6.4.

**Таблица 6.7**

### **Отношение сигнала для образцов НПКО**

<i>Порядковый номер НПКО</i>	<i>Сигнал</i>
1	11,81
2	11,65
3	12,22
4	11,45
5	12,09



**Рис. 6.4 – Хроматограмма извлечения из модельной смеси плазмы крови (концентрация 2-АБФПК на уровне НПКО: 0,1 мкг/мл)**

### ***Влияние эффекта переноса***

Изучение данного параметра позволяет минимизировать эффект переноса 2-АБФПК от пробы с высокой концентрацией на следующую пробу.

Для оценки эффекта переноса анализировали извлечения из модельных смесей с концентрацией 2-АБФПК на уровне верхнего предела количественного определения (10 мкг/мл), затем вводили экстракты «холостых» модельных образцов.

Эксперимент показал, что на «холостых» хроматограммах не детектируется пик 2-АБФПК, что свидетельствует об отсутствии переноса пробы.

## 6.2 Определение 2-АБФПК в моче

В качестве варианта пробоподготовки при определении 2-АБФПК в моче использовали простое разбавление биологической жидкости ацетонитрилом. Ацетонитрил является составной частью используемого элюента и совместим с вариантом обращенно-фазной ВЭЖХ. Анализ извлечений проводили в хроматографических условиях, разработанных для плазмы крови.

Пробоподготовка модельных смесей мочи осуществлялась по следующей методике:

в пробирку типа Эппендорф помещали 500 мкл пробы и 500 мкл ацетонитрила. Содержимое пробирки перемешивали на лабораторном шейкере в течение 5 минут при 1500 об/мин. Далее центрифугировали в течение 5 минут при 10 000 об/мин. Супернатант переносили в хроматографическую виалу и анализировали методом ВЭЖХ-УФ.

Для оценки эффективности экстракции 2-АБФПК из мочи площади хроматографических пиков в извлечениях сравнивали со стандартными растворами соединения известной концентрации.

В качестве модельных смесей использовали растворы мочи с концентрацией 2-АБФПК на уровне 1 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл. В качестве стандартных растворов использовали водные растворы 2-АБФПК в аналогичных концентрациях.

Пробоподготовка модельных растворов и стандартных растворов проводилась одинаково.

Результаты эксперимента представлены в таблицах 6.8 – 6.10.

**Таблица 6.8**

**Степень экстракции 2-АБФПК из модельных смесей мочи**  
(концентрация 10,80 мкг/мл)

<b>S пика 2-АБФПК в модельной смеси*, mAU*сек</b>	<b>Найденная концентрация, мкг/мл</b>	<b>Степень извлечения, %</b>	<b>Метрологические характеристики (n = 6)</b>
494 517	10,682	98,91	$X_{cp} = 98,93\%$ $SD = 0,86$ $RSD = 0,87\%$
490 721	10,600	98,15	
495 582	10,705	99,12	
500 443	10,810	100,09	
488 823	10,559	97,77	
497 619	10,749	99,53	
<b>Площадь пика 2-АБФПК в стандартном растворе*: 499 980</b>			

\*среднее значение трех параллельных измерений

**Таблица 6.9**

**Степень экстракции 2-АБФПК из модельных смесей мочи**  
(концентрация 5,40 мкг/мл)

<b>S пика 2-АБФПК в модельной смеси*, mAU*сек</b>	<b>Найденная концентрация, мкг/мл</b>	<b>Степень извлечения, %</b>	<b>Метрологические характеристики (n = 6)</b>
247 643	5,349	99,06	$X_{cp} = 99,70\%$ $SD = 1,30$ $RSD = 1,30\%$
250 606	5,413	100,24	
245 050	5,293	98,02	
246 948	5,334	98,78	
253 847	5,483	101,54	
251 393	5,430	100,56	
<b>Площадь пика 2-АБФПК в стандартном растворе*: 250 004</b>			

\*среднее значение трех параллельных измерений

**Таблица 6.10**

**Степень экстракции 2-АБФПК из модельных смесей мочи**  
(концентрация 1,08 мкг/мл)

<b>S пика 2-АБФПК в модельной смеси*, mAU*сек</b>	<b>Найденная концентрация, мкг/мл</b>	<b>Степень извлечения, %</b>	<b>Метрологические характеристики (n = 6)</b>
48 024	1,078	99,81	$X_{cp} = 95,48\%$ $SD = 3,82$ $RSD = 4,00\%$
44 014	0,988	91,48	
46 376	1,041	96,39	
43 925	0,986	91,30	
45 306	1,017	94,17	
47 979	1,077	99,72	
<b>Площадь пика 2-АБФПК в стандартном растворе*: 48 113</b>			

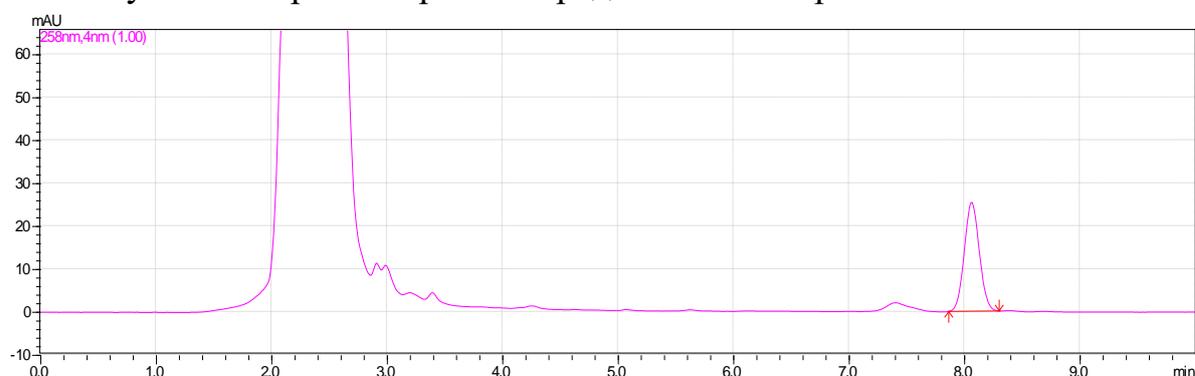
\*среднее значение трех параллельных измерений

Проведенный эксперимент показал высокую эффективность предложенных условий пробоподготовки, процент извлечения 2-АБФПК из модельных смесей мочи составил более 95% на всех уровнях концентраций исследуемого соединения.

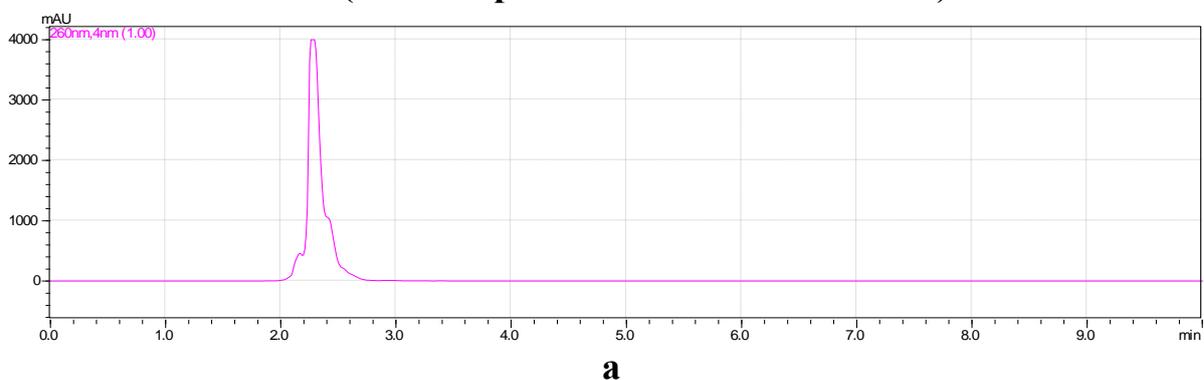
### **Селективность**

Для определения селективности в разработанных условиях анализировали извлечения из модельной смеси мочи (концентрация 2-АБФПК 5 мкг/мл), «холостые» пробы мочи лабораторных животных (крысы, кролика) и человека.

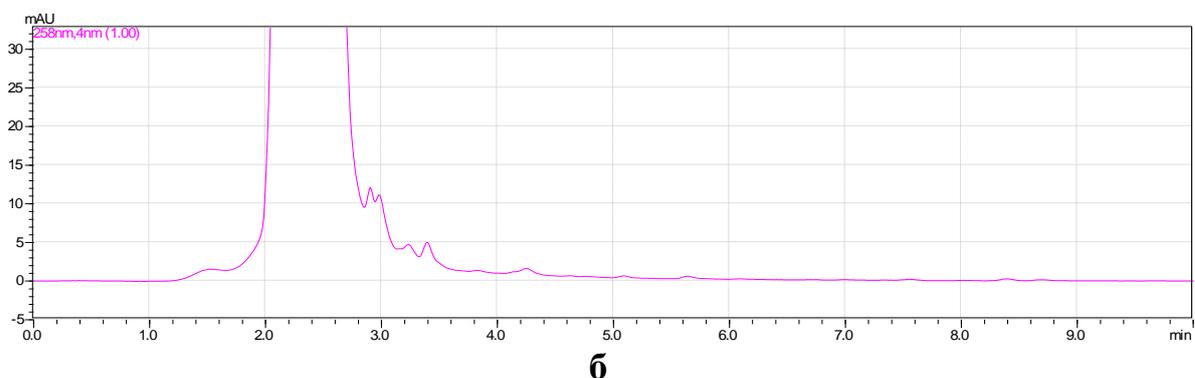
Полученные хроматограммы представлены на рис. 6.5 – 6.6.



**Рис. 6.5 – Хроматограмма извлечения из модельной смеси мочи (концентрация 2-АБФПК 5 мкг/мл)**



**а**



**б**

**Рис. 6.6 – Хроматограмма извлечения из холостой пробы мочи (б – увеличенный формат)**

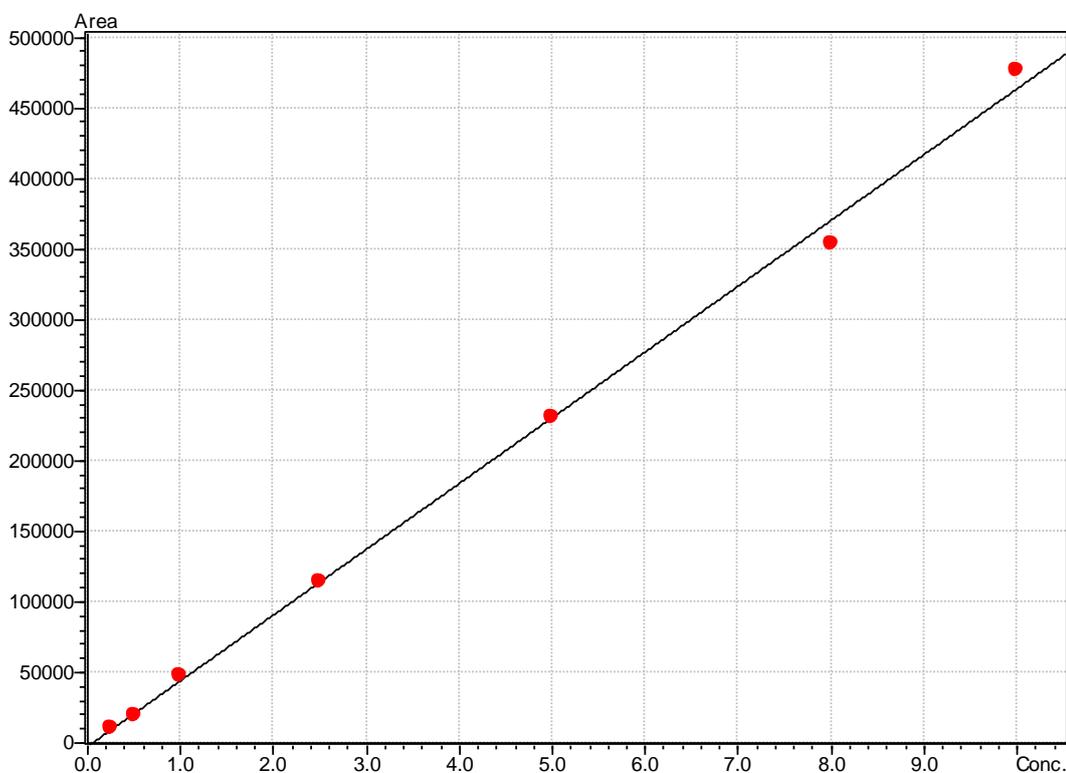
Установлено, что в извлечениях «холостых» проб мочи из разных источников отсутствуют пики эндогенных соединений, близкие к времени удерживания 2-АБФПК. Следовательно, методика обладает специфичностью в отношении определяемого соединения.

### *Линейность*

Для определения линейности методики были приготовлены и проанализированы 7 модельных смесей мочи с содержанием 2-АБФПК в диапазоне от 0,25 мкг/мл до 10 мкг/мл.

Пробоподготовка модельных смесей проводилась в соответствии с разработанной методикой. Извлечение переносили в хроматографическую вialу, 25 мкл вводили в инжектор хроматографа.

Каждое извлечение анализировали трижды. Для каждой концентрации измеряли площадь хроматографического пика и строили калибровочный график (рис. 6.7).



**Рис. 6.7 – Калибровочный график количественного определения 2-АБФПК в моче методом ВЭЖХ-УФ**

Уравнение калибровочного графика имеет вид:  $S = 46603,03 \times C - 2374,59$  где:  $S$  – площадь хроматографического пика;  $C$  – концентрация 2-АБФПК в модельной смеси, мкг/мл. Коэффициент корреляции  $R^2$  составил 0,9976, что подтверждает линейность отклика детектора от концентрации соединения.

Результаты обратного перерасчета концентраций по полученной калибровочной зависимости показали соответствие предъявляемым критериям (таблица 6.11).

Таблица 6.11

### Обратный перерасчет концентраций

Теоретическая концентрация 2-АБФПК в модельной смеси, мкг/мл	Рассчитанная концентрация 2-АБФПК в модельной смеси, мкг/мл	Отклонения от теоретической концентрации, %
0,25	0,281	12,40
0,50	0,470	-6,00
1,00	1,076	7,60
2,50	2,506	0,24
5,00	4,996	-0,08
8,00	7,638	-4,53
10,00	10,284	2,84

### Правильность и прецизионность

Для определения критериев правильности и прецизионности методики готовили и анализировали в разработанных условиях 6 модельных образцов мочи на 4 уровнях концентраций 2-АБФПК: 0,25 мкг/мл (LLOQ); 0,75 мкг/мл (QCL); 3,5 мкг/мл (QCM); 8,75 мкг/мл (QCH). Расчет концентраций образцов контроля качества проводили по калибровочному графику.

Значения величин относительного стандартного отклонения и относительной погрешности результатов анализа образцов контроля качества, характеризующие правильность и прецизионность методики, представлены в таблице 6.12. Полученные результаты удовлетворяют требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам. Относительное стандартное отклонение и относительная погрешность не превышает 15% для всех концентраций, включая НПКО.

**Правильность и прецизионность методики количественного определения 2-АБФПК в моче методом ВЭЖХ-УФ**

Концентрация 2-АБФПК в модельной смеси, мкг/мл	S пика 2-АБФПК, mAU*сек	Рассчитанная концентрация, мкг/мл	$\bar{x}$	SD	RSD, %	$\epsilon$ , %
0,25	10 794	0,283	0,269	0,014	5,20	7,60
	9 966	0,265				
	10 288	0,272				
	10 874	0,284				
	9 076	0,246				
	9 942	0,264				
0,75	28 017	0,652	0,735	0,073	9,93	-2,00
	30 714	0,710				
	36 972	0,844				
	33 442	0,769				
	28 723	0,667				
	33 510	0,770				
3,50	173 571	3,775	3,516	0,208	5,92	0,46
	169 047	3,678				
	146 968	3,205				
	154 746	3,371				
	160 170	3,488				
	164 504	3,581				
8,75	411 062	8,871	8,654	0,169	1,95	-1,10
	408 354	8,813				
	395 323	8,534				
	389 984	8,419				
	400 858	8,652				
	399 910	8,632				

***Нижний предел количественного определения***

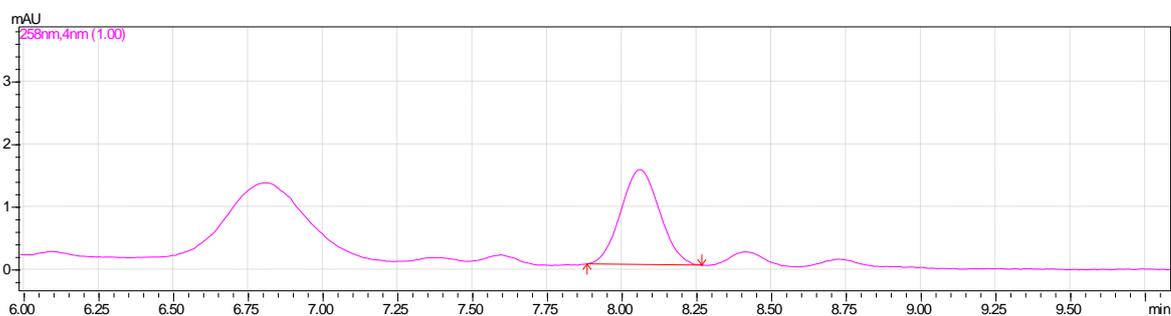
НПКО для методики определения 2-АБФПК в моче составил 0,25 мкг/мл. По результатам анализа образцов контроля качества данная концентрация определяется с приемлемой правильностью и прецизионностью.

Отношение сигнала аналита с НПКО превосходит величину сигнала холостого образца более чем в 5 раз, что соответствует действующим требованиям (таблица 6.13).

## Отношение сигнала для образцов с НПКО

<i>Порядковый номер НПКО</i>	<i>Сигнал</i>
1	8,93
2	8,77
3	9,19
4	8,67
5	8,89

Пример хроматограммы извлечения с концентрацией 2-АБФПК на уровне НПКО представлен на рисунке 6.8:



**Рис. 6.8 – Хроматограмма извлечения из модельной смеси мочи (концентрация 2-АБФПК на уровне НПКО: 0,25 мкг/мл)**

## ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 6

1. Разработаны условия ВЭЖХ для количественного определения 2-АБФПК в плазме крови. Путем анализа «холостых» образцов плазмы, полученных из разных источников (человека, лабораторных животных), подтверждена специфичность предлагаемых условий.
2. Разработан экспрессный и эффективный способ пробоподготовки плазмы крови для определения 2-АБФПК, основанный на осаждении белков плазмы ацетонитрилом. Данный способ обеспечивает извлечение более 95% соединения из модельных смесей плазмы.
3. Установлено, что линейность методики соблюдается в диапазоне концентраций 2-АБФПК от 0,1 мкг/мл до 10 мкг/мл. Результаты оценки правильности и прецизионности методики удовлетворяют критериям приемлемости.
4. Для анализа 2-АБФПК в моче предложена пробоподготовка на основе разбавления биожидкости ацетонитрилом в соотношении 1:1. Степень извлечения изучаемого соединения составила 95,48 – 99,70% в зависимости от концентрации в модельном растворе.
5. В результате валидации доказано, что разработанная методика количественного определения 2-АБФПК в моче специфична, обладает высокой чувствительностью (НПКО – 0,1 мкг/мл), линейностью. Правильность и прецизионность методики не превышает 15 %, рекомендуемых для биоаналитических методик.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. По результатам изучения физико-химических свойств биологически активного соединения 2-АБФПК определены и нормированы показатели доброкачественности субстанции. Субстанция представляет собой желтый мелкокристаллический порошок с температурой плавления в интервале от 215 до 217°C, легко растворимый в диметилсульфоксиде, растворимый в метаноле, практически не растворимый в воде. Содержание неспецифичных примесей соответствует фармакопейным требованиям: сульфатной золы – не более 0,1%, тяжелых металлов – не более 0,001%, потеря в массе при высушивании не превышает 0,5%. Микробиологическая чистота субстанции соответствует категории 2.2.

2. Изучены спектральные характеристики 2-АБФПК в УФ- и ИК- областях. Установлено, что характер УФ-спектра соединения зависит от рН среды и природы растворителя: максимумы поглощения «нейтральных» и «кислых» растворов соединения находятся при 223 нм и 250 нм, в «щелочных» растворах – при 216 нм и 336 нм. В метанольном растворе наблюдается батохромный сдвиг полос поглощения и увеличение интенсивности поглощения во втором максимуме. Наличие собственного поглощения 2-АБФПК позволяет использовать метод УФ-спектрофотометрии в качественном и количественном анализе соединения, а также как способ детектирования в ВЭЖХ. В ИК-спектре соединения обнаруживаются характеристические полосы поглощения  $\text{NH}_2$ -группы ( $3416 - 3370 \text{ см}^{-1}$ ), N-H незамещенной амидной группы ( $3290 - 3305 \text{ см}^{-1}$ ), карбонилон и C=C связей ( $1659 - 1618 \text{ см}^{-1}$ ). ИК-спектрометрия рекомендована для подтверждения подлинности субстанции.

3. Установлено, что 2-АБФПК элюируется в виде симметричного пика с приемлемым удерживанием [ $2 < k < 9$ ] на ВЭЖХ-колонке с обращенно-фазным сорбентом при содержании ацетонитрила в подвижной фазе от 35% до 50%. Подтверждена линейность отклика спектрофотометрического детектора в широком диапазоне концентраций 2-АБФПК (1-500 мкг/мл).

4. Методами УФ-спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии определены показатель ионизации и коэффициент липофильности

2-АБФПК. Полученные данные позволяют характеризовать 2-АБФПК как умеренно липофильное соединение с наличием слабокислотных свойств.

5. Для количественного определения 2-АБФПК в субстанции разработаны методики на основе УФ-спектрофотометрии, обращенно-фазной ВЭЖХ, а также методика аргентометрического титрования по ковалентно связанному атому брома. Разработанные методики специфичны, линейны (коэффициент корреляции  $R^2$  более 0,999), позволяют получать воспроизводимые результаты. Открываемость 2-АБФПК с учетом доверительных интервалов составила  $99,84 \pm 0,78\%$  (аргентометрия);  $99,62 \pm 0,65\%$  (УФ-спектрофотометрия);  $99,86 \pm 0,72\%$  (ВЭЖХ-УФ). Методы УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ рекомендованы и для установления подлинности субстанции.

6. Выбраны оптимальные условия разделения родственных примесей в субстанции 2-АБФПК методом ВЭЖХ-УФ в подвижной фазе состава фосфатный буфер (рН 6,8) – ацетонитрил (65:35). Для оценки содержания идентифицированной примеси (4-броманилина) предложен расчет по стандартному раствору 4-броманилина, для неидентифицированных примесей – расчет с использованием в качестве раствора сравнения разведение основного соединения. Методики характеризуются высокой чувствительностью, линейны в диапазоне от 0,0125 до 0,4% от содержания 2-АБФПК в испытуемом растворе – для неидентифицированных примесей, и от 0,01 до 0,12 % – для 4-броманилина. Результаты оценки правильности и прецизионности методик удовлетворяют требованиям ГФ РФ.

7. Разработаны и валидированы высокочувствительные и специфичные методики определения остаточных органических растворителей (диэтилового эфира, этанола, ацетонитрила, триэтиламина и бензола) в субстанции 2-АБФПК методом ГЖХ-ПВД на капиллярных колонках различной полярности (НР-5, НР-FFAP). Анализ трех серий субстанций 2-АБФПК показал, что уровень ООР не превышает нормируемых пределов содержания: бензола – не более 2 ppm; ацетонитрила – не более 410 ppm; этанола, диэтилового эфира, триэтиламина – не более 5000 ppm.

8. С использованием комплекса разработанных аналитических методик проведено исследование лабораторных образцов субстанции 2-АБФПК, установлены нормы по показателям «Родственные примеси», «Остаточные органические растворители», «Количественное определение».

9. Для целей исследования фармакокинетики 2-АБФПК разработаны и валидированы методики определения 2-АБФПК в плазме крови и моче методом ВЭЖХ-УФ. Установлено, что предложенные варианты пробоподготовки биообъектов (преципитация белков плазмы крови, разведение мочи ацетонитрилом) обеспечивают извлечение более 95% соединения из модельных смесей. Специфичность хроматографических условий подтверждена на образцах биожидкостей, полученных от лабораторных животных разного вида и человека. Нижний предел количественного определения 2-АБФПК в биологических жидкостях составил 0,1 мкг/мл (для плазмы крови), 0,25 мкг/мл (для мочи).

### **Практические рекомендации**

Разработанный в результате проведенных исследований комплекс аналитических методик, показателей и норм качества может быть использован для контроля технологического процесса и качества фармацевтической субстанции 2-АБФПК, а также потенциальных лекарственных препаратов на ее основе.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Предложенные специфичные и высокочувствительные биоаналитические методики могут быть использованы для изучения фармакокинетики 2-АБФПК при проведении доклинических и клинических исследований.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Информационный бюллетень ВОЗ. Рак. – Текст : электронный // who.int/ru : [сайт]. – 2022. – URL : <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (дата обращения (15.11.2022)).
2. Балакин, К. В. Российская фармацевтическая отрасль в горизонте 2030. Аналитический обзор. Биофармацевтический кластер «Северный» / К. В. Балакин, А. А. Айгинин, А. А. Иващенко. – 2021. – 62 с.
3. Палагина, А. А. Анализ российского рынка противоопухолевых цитостатических препаратов / А. А. Палагина ; под общей редакцией Е. П. Ткачевой // Инновационные направления исследований в сфере социально гуманитарных наук : сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 29 марта 2023 г. – Белгород : Агентство перспективных научных исследований (АПНИ), 2023. – С. 21–29.
4. Постановление Правительства Российской Федерации от 29.12.2021 № 2544 «О внесении изменений в государственную программу Российской Федерации "Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» // ips.pravo.gov : [сайт]. – 2022. – URL : <http://ips.pravo.gov.ru:8080/default.aspx?pn=0001202112310036> (дата обращения 20.05.2022).
5. Новые российские биоаналоги и дженерики против рака заняли 60% всего рынка клинических исследований в России // Научно – производственный журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» : [сайт]. – 2024. – URL : [https://www.pharmjournal.ru/jour/announcement/view/1442?locale=ru\\_RU](https://www.pharmjournal.ru/jour/announcement/view/1442?locale=ru_RU) (дата обращения 02.02.2024).
6. Регистр лекарственных средств России. Противоопухолевые средства // rlsnet.ru : [сайт]. – 2021. – URL: <https://www.rlsnet.ru/pharm-groups/protivoopuxolevye-sredstva-73> (дата обращения 03.02.2021).
7. Kazemi, M. Research on Biological and Bioactive Molecules Containing Pyrrole Scaffolds / M. Kazemi, N. Karezani // Biological and Molecular Chemistry. – 2023. – Vol. 1 (1). – pp. 15–26.

8. Nakano, H. Total synthesis of pyrrolnitrin, a new antibiotic / H. Nakano [et al.] // Tetrahedron Letters. – 1966. – Vol. 7. – pp. 737–740.
9. Wilkerson, W. W. Antiinflammatory 4,5-diarylpyrroles. 2. Activity as a function of cyclooxygenase-2 inhibition / W. W. Wilkerson, R. A. Copeland, M. Covington, J. M. Trzaskos // Journal of Medicinal Chemistry. – 1995. – Vol. 38 (20). – pp. 3895–3901.
10. Lee, H. A novel class of highly potent, selective, and non-peptidic inhibitor of Ras farnesyltransferase (FTase) / H. Lee [et al.] // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2001. – Vol. 11. – pp. 3069–3072.
11. Wurz, R. P. Doubly Activated Cyclopropanes as Synthetic Precursors for the Preparation of 4-Nitro- and 4-Cyano-dihydropyrroles and Pyrroles / R. P. Wurz, A. B. Charette // Organic Letters. – 2005. – Vol. 7 (12). – pp. 2313–2316.
12. Wang, K. Design of a Versatile Multicomponent Reaction Leading to 2-amino-5-ketoaryl pyrroles / K. Wang, A. Domling // Chemical Biology and Drug Design. – 2010. – Vol. 75. – pp. 277–283.
13. Патент № 2470918 Российская Федерация. Новые производные индола, обладающие ингибирующей активностью в отношении ИКК киназы : № 2009131031/04 : заявл.15.01.2008 : опубл. 27.02.2011 / Еномото Хирочи // Бюллетень № 36. – 136 с.
14. Safiya R. Shaikh. Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Some Pyrrole Derivatives as Potential Antimicrobial Agents / Safiya R. Shaikh [et al.] // International Journal of Scientific Research in Science and Technology. – 2021. – Vol. 8, № 3. – pp. 757–770.
15. McGeary, R. P. Structure-activity relationship study and optimisation of 2-aminopyrrole-1-benzyl-4,5-diphenyl-1H-pyrrole-3-carbonitrile as a Broad Spectrum Metallo- $\beta$ -lactamase Inhibitor / R.P. McGeary // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2017. – Vol. 137. – pp. 351–364.
16. Шипиловских, С. А. Синтез и химические превращения замещенных 3-(тиофен-2-ил)имино-3H-фуран-2-онов : диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук / Шипиловских С. А. ; Федеральное государственное

бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет». – Пермь, 2016. – 173 с.

17. Guo, H. Development of novel molecules to study lipoxygenase activity in its cellular context. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen / H. Guo. – 2020. – 194 p.

18. Tanaka, M. A novel pyrrole derivative, NS-8, suppresses the rat micturition reflex by inhibiting afferent pelvic nerve activity / M. Tanaka [et al.] // BJU International. – 2003. – Vol. 92. – pp. 1031–1036.

19. Wallace, M. B. Structure-based Design and Synthesis of Pyrrole Derivatives as MEK Inhibitors / M. B. Wallace [et al.] // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2010. – Vol. 20. – pp. 4156–4158.

20. Maria T. Cocco Synthesis and In Vitro Antitumoral Activity of New N-Phenyl-3-pyrrolicarbothioamides / Maria T. Cocco, C. Congiu, V. Onnis. // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2003. – Vol. 11. – pp. 495–503.

21. Kawashima, K. Pyrrole derivative having ureido group and aminocarbonyl group as substituents / K. Kawashima [et al.] // United States Patent No. US 7,977,371 B2 Date of Patent Jul. 12. – 2011.

22. Wang, D. Treatment or prevention of cardiovascular and respiratory disorders with novel substituted cyclic-amp specific phosphodiesterase inhibitors / D. Wang [et al.] // United States Patent No. US 2007/0117861 A1 Date of Patent May 24. – 2007.

23. Игидов, Н. М. Химия иминофуранов VIII.\* Рециклизация 5-арил-3-арилимино-3*H*-фуран-2-онов под действием производных цианоуксусной кислоты / Н. М. Игидов [и др.] // Журнал органической химии. – 2013. – Т. 49, № 2. – С. 252–261.

24. Цечёев, А. Т. Исследование реакционной способности производных 2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоновых кислот / А. Т. Цечёев, Н. М. Игидов, М. В. Дмитриев ; ответственный за выпуск П. А. Топанов ; Пермский государственный

национальный исследовательский университет // Современные аспекты химии: материалы V молодежной школы-конференции. – Пермь, 2018. – С. 189–190.

25. Игидов, Н. М. Химия иминофуранов. XIII. Рециклизация 4-ариламино-2-трет-бутил-5-оксо-2,5-дигидрофуран-2-илацетатов под действием цианоуксусного эфира / Н. М. Игидов, А. В. Захматов, А. Е. Рубцов // Журнал органической химии. – 2016. – Т. 52, № 7. – С. 981–984.

26. Shipilovskikh, S. A. E/Z isomerization of ethyl 2-amino-1-(3-(ethoxycarbonyl)-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophen-2-yl)-4-oxo-5-(2-oxo-2-phenylethylidene)-4,5-dihydro-1*H*-pyrrole-3-carboxylate / S. A. Shipilovskikh, I. A. Gorbunova, A. E. Rubtsov // AIP Conference Proceedings. – 2020. – Vol. 2280, №1. – pp.1–4.

27. Бойчук, С. В. Нарушения регуляции клеточного цикла и репарации повреждений ДНК в опухолевых клетках под действием замещенного этилового эфира 2-амино-1*H*-пиррол-3-карбоновой кислоты / С. В. Бойчук, А. Р. Галембикова, С. С. Зыкова, Р. Р. Хуснутдинов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 116.

28. Зыкова, С. С. Синтез и биологическая активность 2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-*N*-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксамидов / С. С. Зыкова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52, № 3. – С. 10–16.

29. Патент № 2605091 Российская Федерация. 2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-*N*-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксамиды, проявляющие противоопухолевую и антирадикальную активность, способ их получения и фармацевтическая композиция на их основе : № 2015117807/04 : заявл. 12.05.2015 : опубл. 20.12.2016 // Бюллетень № 34. – 2 с.

30. Галембикова, А. Р. Влияние пивалоил-замещённых пиррол-содержащих гетероциклических соединений на механизмы репарации повреждений днк клеток саркомы Юинга / А. Р. Галембикова [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2018. – Т. 99, № 2. – С. 245–248.

31. Boichuk, S. 2-APCAS, the novel microtubule targeting agents active against distinct cancer cell lines / S. Boichuk [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – 22 p.

32. Зыкова, С. С. Синтез и фармакологические свойства этил-2-амино-1-бензоиламино-4-оксо-5-(2-оксо-2-арилэтилиден)-пирролидин-3-карбоксилатов / С. С. Зыкова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49, № 10. – С. 15–18.
33. Boichuk, S. Ethyl-2-amino-pyrrole-3-carboxylates are novel potent anticancer agents that affect tubulin polymerization, induce G2/M cell-cycle arrest, and effectively inhibit soft tissue cancer cell growth in vitro / S. Boichuk [et al.] // Anti-Cancer Drugs. – 2016. – Vol. 27, № 7. – pp. 620–634.
34. Зыкова, С. С. Синтез и цитостатическая активность (*E*)-этил-2-амино-5-(3,3-диметил-4-оксобутилиден)-4-оксо-1-(2-фениламинобензамидо)-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксилата / С. С. Зыкова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, № 10. – С. 15–18.
35. Boichuk, S. The Design, Synthesis, and Biological Activities of Pyrrole-Based Carboxamides: The Novel Tubulin Inhibitors Targeting the Colchicine-Binding Site / S. Boichuk [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26, № 5780. – pp. 1–27.
36. Патент № 2765545 Российская Федерация. 2-амино-1-бензамидо-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксамид, вызывающий нарушения фаз клеточного цикла и проявляющий цитотоксическую активность в отношении сарком мягких тканей и гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) : № 2020133367 : заявл. 12.10.2020 : опубл. 01.02.2022 // Бюллетень № 4. – 10 с.
37. Boichuk, S. Computational-based discovery of the anti-cancer activities of pyrrole-based compounds targeting the colchicine-binding site of tubulin / S. Boichuk [et al.] // Molecules. – 2022. – Vol. 27 (9). – pp. 1–19.
38. Патент № 2753480 Российская Федерация. 2-Амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксамид, проявляющий цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток человека : № 2020130076 : заявл. 14.09.2020 : опубл. 17.08.2021 // Бюллетень № 23. – 9 с.

39. ОФС.1.1.0006 «Фармацевтические субстанции» / Государственная Фармакопея РФ XV изд. // [pharmacopoeia.regmed.ru](https://pharmacopoeia.regmed.ru) : [сайт]. – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/farmatsevticheskie-substantsii/> (дата обращения 01.10.2023).
40. Impurities in New Drug Substances, Q3A(R2) // International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. – 2006. – Step 4. – 11 p.
41. ОФС.1.1.0023 «Родственные примеси в фармацевтических субстанциях и лекарственных препаратах» / Государственная Фармакопея РФ XV изд. // [pharmacopoeia.regmed.ru](https://pharmacopoeia.regmed.ru) : [сайт]. – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/rodstvennyye-primesi-v-farmatsevticheskikh-substantsiyakh-i-lekarstvennykh-preparatakh/> (дата обращения 14.12.2023).
42. ICH guideline Q3C (R8) on impurities: guideline for residual solvents // International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. – 2021. – Step 5. – 44 p.
43. ОФС.1.1.0008 «Остаточные органические растворители» / Государственная Фармакопея РФ XV изд. // [pharmacopoeia.regmed.ru](https://pharmacopoeia.regmed.ru) : [сайт]. – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/ostatochnye-organicheskie-rastvoriteli/> (дата обращения 14.03.2024).
44. Волокитина, Д. С. Разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения субстанции нового биологически активного соединения производного хиназолин-4(3H)-она / Д. С. Волокитина [и др.] // Вестник ВолГМУ. – 2017. – № 2 (62). – С. 35–38.
45. ОФС.1.2.1.1.0003 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» / Государственная Фармакопея РФ XV изд. // [pharmacopoeia.regmed.ru](https://pharmacopoeia.regmed.ru) : [сайт]. – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-1-metody-spektralnogo-analiza/spektrofotometriya-v-ultrafioletovoy-i-vidimoy-oblastyakh/> (дата обращения 01.02.2024).

46. Доронин, С. Ю. Фотометрический анализ парацетамола на содержание примеси п-аминофенола / С. Ю. Доронин, Н. Н. Гусакова, Р. К. Чернова // Фармация. – 2001. – № 3. – С. 35–37.
47. Арзамасцев, А. П. Ультрафиолетовые и инфракрасные спектры лекарственных веществ: монография / А. П. Арзамасцев, Д. С. Яскина. – Москва: Медицина, 1975. – 151 с.
48. Ковалева, Е. Л. Актуальные вопросы оценки качества препаратов в лекарственной форме «таблетки» / Е. Л. Ковалева [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2015. – № 3. – С. 53–59.
49. Dhake, A. S. Simultaneous determination of mefenamic acid and paracetamol from combined dosage forms by spectrophotometry / A. S. Dhake [et al.] // Indian Journal of Pharmaceutial Sciences. – 2001. – Vol. 63, № 1. – pp. 55–57.
50. Мартиросова, Г. А. Использование УФ спектрофотометрического метода для определения триметазидина дигидрохлорида в таблетках // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. — Пятигорск : Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – 2005. – № 60. – С. 253–255.
51. Дорофеев, В. Л. Использование метода УФ-спектрофотометрии для количественного определения лекарственных средств группы фторхинолонов / В. Л. Дорофеев, И. В. Титов, А. П. Арзамасцев // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2004. – № 2. – С.205–209.
52. Ghulam, M. Development of a UV-spectrophotometric method for the simultaneous determination of aspirin and paracetamol in tablets / M. Ghulam [et al.] // Scientific research and essays. – 2011. – Vol. 6 (2). – pp. 417–421.
53. Илиев, К. И. Количественное определение новокаина гидрохлорида и натрия диклофенака в мази «Новодиклозоль» / К. И. Илиев, А. И. Сичко, Т. А. Кобелева // Материалы к Конференции «Фармация и общественное здоровье». – Екатеринбург. – 2014. – С. 406–413.

54. Власова, И. В. Спектрофотометрические методы в анализе лекарственных препаратов (обзор) / И. В. Власова, А. В. Шилова, Ю. С. Фокина // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2011. – Т. 77, № 1. – С. 21–28.
55. Pavalache, G. Determination of loratadine in pharmaceuticals by a spectrophotometric method / G. Pavalache, N. Matei, A. Popescu // Ovidius University Annals of Chemistry. – 2015. – Vol. 26, № 1. – pp. 27–31.
56. ФС.2.1.0129 «Меркаптопурин моногидрат» / Государственная Фармакопея РФ XV изд. // [pharmacopoeia.regmed.ru](https://pharmacopoeia.regmed.ru) : [сайт]. – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-1/merkaptopurin-monogidrat/> (дата обращения 12.01.2024).
57. Патент № 2704262 Российская Федерация. Производные 2-аминохроменов проявляющие противоопухолевую активность. Фармацевтические композиции : № 2018146830 : заявл. 27.12.2018 : опубл. 25.10.2019 // Бюллетень № 30. – 20 с.
58. Патент № 2680967 Российская Федерация. Твердая лекарственная форма индол-3-карбинола : № 2017112352 : заявл. 11.04.2017 : опубл. 01.03.2019 // Бюллетень № 7. – 13 с.
59. ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» / Государственная Фармакопея РФ XV изд. // [pharmacopoeia.regmed.ru](https://pharmacopoeia.regmed.ru) : [сайт]. – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/vysokoeffektivnaya-zhidkostnaya-khromatografiya/> (дата обращения 20.09.2023).
60. The Japanese Pharmacopoeia. – Japan, 2021. – 18th Edition – 2806 p.
61. European Pharmacopoeia. – France, 2023. – 11th Edition. – 6085 p.
62. The United States Pharmacopoeia 43. – National Formulary 38. – 2020.
63. Гончикова Ю.А. Разработка методики количественного определения антиретровирусных лекарственных средств методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Медицинский Альманах. – 2018. – №2(53). – С.98–100.

64. Сабирзянов, Д. Р. Определение посторонних примесей в субстанции анилокаина методом ВЭЖХ / Д. Р. Сабирзянов [и др.] // Фармация и фармакология. – 2017. – № 3. – С. 254–265.
65. Пипкина, Т. В. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии при оценке лекарственных средств / Т. В. Пипкина, М. П. Клименок // Ветеринарная медицина в XXI веке: роль биотехнологий и цифровых технологий. – 2021. – С. 98–101.
66. Шпрах, З. С. Анализ и стандартизация противоопухолевых лекарственных средств производных хлорэтиламина / З. С. Шпрах // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – № 4. – С. 13–18.
67. Иванов, А. В. Определение индивидуальности оксоплатины (IV) методом ВЭЖХ / А. В. Иванов, К. Д. Китиашвили, В. М. Иванов // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2008. – № 2. – С. 109 – 111.
68. Gilant, E. Validated HPLC method for determination of temozolomide in human plasma / E. Gilant [et al.] // Acta Poloniae Pharmaceutica. – 2012. – Vol. 6, № 69. – pp. 1347–1355.
69. Автина, Т. В. Разработка и валидация методики количественного определения иматиниба в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / Т. В. Автина, А. Л. Куликов, М. В. Покровский // Научные результаты биомедицинских исследований. – 2015. – Т. 5, № 3. – С. 104–111.
70. Escudero-Ortiz, V. Development and validation of a high-performance liquid chromatography ultraviolet method for lapatinib quantification in human plasma / V. Escudero-Ortiz, J. J. Perez-Ruixo, B. Valenzuela // Therapeutic Drug Monitoring. – 2013. – Vol. 35. – pp. 796–802.
71. Escudero-Ortiz, V. Development and validation of an HPLC-UV method for pazopanib quantification in human plasma and application to patients with cancer in routine clinical practice / V. Escudero-Ortiz, J. J. Perez-Ruixo, B. Valenzuela // Therapeutic Drug Monitoring. – Vol. 37. – pp. 172–179.

72. Sharma, T. Development of a validated liquid chromatographic method for quantification of sorafenib tosylate in the presence of stress-induced degradation products and in biological matrix employing analytical quality by design approach / T. Sharma [et al.] // *Biomedical Chromatography*. – 2018. – Vol. 32 (5). – pp. 1–35.
73. Widmer, N. Determination of imatinib (Gleevec) in human plasma by solid-phase extraction-liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection / N. Widmer [et al.] // *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. – 2004. – Vol. 803 (2). – pp. 285–292.
74. Zufia, L. Simple determination of capecitabine and its metabolites by liquid chromatography with ultraviolet detection in a single injection / L. Zufia, A. Aldaz, J. Garildez // *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. – 2004. – Vol. 809 (1). – pp. 51–58.
75. Kim, H. High-performance liquid chromatographic analysis and stability of anti-tumor agent temozolomide in human plasma / H. Kim [et al.] // *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. – 2001. – Vol. 24 (3). – pp. 461–468.
76. Van Gijn, R. High-performance liquid chromatographic analysis of the new four potential metabolites in micro-volumes of plasma / R. Van Gijn [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 1995. – Vol. 14 (1–2). – pp. 165–174.
77. Antunes, M. V. Sensitive HPLC-PDA determination of tamoxifen and its metabolites Ndesmethyltamoxifen, 4-hydroxytamoxifen and endoxifen in human plasma / M. V. Antunes [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2013. – Vol. 76. – pp. 13–20.
78. Sabourian, R. HPLC methods for quantifying anticancer drugs in human samples: A systematic review / R. Sabourian [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 2020. – Vol. 610. – pp. 1–21.
79. Posocco, B. A new high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of paclitaxel and 6 $\alpha$ -hydroxy-paclitaxel in human plasma: development, validation and application in a clinical

- pharmacokinetic study / B. Posocco [et al.] // PloS One. – 2018. – Vol. 13 (2). – pp. 1–17.
80. Nijenhuis, C. M. Validation of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assays quantifying omacetaxine mepesuccinate and its 4'-des-methyl and cephalotaxine metabolites in human plasma and urine / C. M. Nijenhuis [et al.] // Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. – 2015. – Vol. 1002. – pp. 152–159.
81. Gao, S. Rapid and sensitive liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the analysis of paclitaxel, docetaxel, vinblastine, and vinorelbine in human plasma / S. Gao [et al.] // Therapeutic Drug Monitoring. – 2014. – Vol. 36 (3). – pp. 394–400.
82. Herbrink, M. Development and validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry analytical method for the therapeutic drug monitoring of eight novel anticancer drugs / M. Herbrink [et al.] // Biomedical Chromatography. – 2018. – Vol. 32 (4). – pp. 1–9.
83. Bauer, K. S. A high-performance liquid chromatography method using ultraviolet and fluorescence detection for the quantitation of UCN-01, 7-hydroxystaurosporine, from human plasma and saliva / K. S. Bauer [et al.] // Biomedical Chromatography. – 2000. – Vol. 14 (5). – pp. 338–343.
84. Родионов, Г. Г. Опыт определения концентрации противоопухолевых препаратов как способ обеспечения безопасности фармакотерапии / Г. Г. Родионов [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2018. – Т. 16, № 1. – С. 64–70.
85. ОФС.1.2.1.2.0004 «Газовая хроматография» / Государственная Фармакопея РФ XV изд. // [pharmacopoeia.regmed.ru](http://pharmacopoeia.regmed.ru) – [сайт]. – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/gazovaya-khromatografiya/> (дата обращения 14.03.2024).

86. Grodowska K., Parczewski A. Analytical methods for residual solvents determination in pharmaceutical products / K. Grodowska, A. Parczewski // *Acta Poloniae Pharmaceutica* – 2010. – Vol. 67, №1. – pp. 13–26.
87. Боровский, Б.В., Определение остаточных органических растворителей в субстанции 2-бензоиламино-*N*-[4-(4,6-диметилпиримидин-2-илсульфамоил)-фенил]-бензамида методом ГЖХ / Б. В. Боровский [и др.] // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2021. – Т. 24, № 4. – С. 15–23.
88. Wittmann, G. Determination of acetic acid in aqueous samples, by water-phase derivatisation, solid-phase microextraction and gas chromatography / G. Wittmann, H. V. Van Langenhove, J. Dewulf // *Journal of Chromatography A*. – 2000. – Vol. 874, №2. – pp. 225-234.
89. Keerthi, K. Head space gas chromatography analysis of residual solvents in temozolomide by using ZB-624 Column / K. Keerthi, Valli R.V Kumari, Tulja Rani G. // *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)*. – 2015. Vol. 3, №6. – pp. 92–100.
90. Третьякова, М.С. Стандартизация фармсубстанции литиевой соли гамма-лактон 2,3-дегидро-1-гулоновой кислоты как радиосенсибилизирующего агента / М. С. Третьякова // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2023. – Т. 12 (3). – С. 125–133.
91. Носырев, П. Валидация аналитических методик: теория и практика (часть I. Теория) / П. Носырев [и др.] // *Ремедиум*. – 2003. – № 11. – С. 62–64.
92. Носырев, П. Валидация аналитических методик: теория и практика (часть II. Практика) / П. Носырев [и др.] // *Ремедиум*. – 2003. – № 12. – С. 65–67.
93. ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» / Государственная Фармакопея РФ XV изд. // [pharmacopoeia.regmed.ru](https://pharmacopoeia.regmed.ru) : [сайт]. – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/validatsiya-analiticheskikh-metodik/> (дата обращения 18.11.2023).

94. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 №113 «Об утверждении Руководства по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств». – 2018. – 10 с.
95. The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. – ICH Harmonised Tripartite Guideline. – 2003. – pp. 11 – 21.
96. International Conference on Harmonisation (ICH) Harmonised Tripartite Guideline Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology // International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. – 2005. – Step 4. – 13 p.
97. Эпштейн, Н. А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) / Н. А. Эпштейн // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 40–56.
98. Жаворонко, И. Ю. Оценка пригодности ВЭЖХ методики для анализа таблеток «Амоксициллин» / И. Ю. Жаворонко, Л. Е. Кудрикова // Scientist. – 2018. – Т. 1, № 1. – С. 10–14.
99. ОФС.1.2.1.2.0001 «Хроматография» / Государственная Фармакопея РФ XV изд. // [pharmacopoeia.regmed.ru](https://pharmacopoeia.regmed.ru) : [сайт]. – 2023. – URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/khromatografiya> / (дата обращения 14.11.2023).
100. Эпштейн, Н. А. Валидация методик «родственные примеси» для неидентифицированных примесей (обзор) / Н. А. Эпштейн, В. Л. Севастьянова, А. И. Королева // Химико-фармацевтический журнал. – 2020. – Т. 54, № 9. – С. 48–56.
101. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1 / А. Н. Миронов [и др.]. – Москва : Гриф и К, 2013. – 328 с.
102. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». – 2016. – 57 с.

103. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis // Committee for Medicinal Products for Human Use. – 2022. – Step 5. – 45 p.
104. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry : U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). – 2018. – 41 p.
105. Todeschini, R. Handbook of Molecular Descriptors / R. Todeschini, K. Consonni // Wiley-VCH, Weinheim. – 2000. – pp. 267–268.
106. Tsopelas, F. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery / F. Tsopelas, C. Giaginis, A. Tsantili-Kakoulidou // Expert Opinion on Drug Discovery. – 2017. – Vol. 12 (9). – pp. 885–896.
107. Lipinski, C. A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2001. – Vol. 46 (1–3). – pp. 3–26.
108. Теслев А. А. Разработка составов и технологий препаратов на основе 4-(3-оксо-3-этоксипропанамидо)бензойной кислоты, обладающих антиоксидантным и антиишемическим действием.: диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Теслев А. А.; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации». – СПб., 2016. – 325 с.
109. И.Е. Шохин, Г.В. Раменская. Методики прогнозирования кишечной проницаемости лекарственных веществ с применением компьютерного моделирования // Biomedicin. 2011. No 2. С. 35–40
110. Hansch, C. Exploring QSAR: Fundamentals and Application in Chemistry and Biology / C. Hansch, A. Leo, D. H. Hoekman // American Chemical Society. – Washington DC. – 1995. – 580 p. – ISBN 0-8412-2993-7.
111. Sandra Babić Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients / Sandra Babić [et al.] // Trends in Analytical Chemistry. – 2007. – Vol. 26, № 11. – pp. 1043–1061.

112. Косицына, А. С. Спектрофотометрическое определение рKa ранее неизвестного 3-метоксиметил-4-нитрозо-5-(п-хлорфенил)-1Н-пиразола / А. С. Косицына, Д. И. Персидская, А. В. Любяшкин // Лесной и химический комплексы – проблемы и решения: сборник материалов по итогам Всероссийской научно-практической конференции (7 декабря 2017 г.). – С. 442–444.
113. Singh, S. Spectrophotometric determination of pKa of nimesulide / S. Singh [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 1999. – Vol. 176. – pp. 261–264.
114. Dubey, S. K. Spectrophotometric Determination of pKa and Log P of Risperidone / S. K. Dubey [et al.] // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2017. – Vol. 7 (11). – pp. 155–158.
115. Jetse Reijenga Development of Methods for the Determination of pKa Values / Jetse Reijenga [et al.] // Analytical Chemistry Insights. – 2013. – Vol. 8. – pp. 53–71.
116. Pandey, M. M. Determination of pKa of felodipine using UV–Visible spectroscopy / M. M. Pandey [et al.] // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2013. – Vol. 115. – pp. 887–890.
117. Blanco, S. E. Determination of the overlapping pKa values of resorcinol using UV-visible spectroscopy and DFT methods / S. E. Blanco [et al.] // Spectrochimica Acta Part A. – 2005. – Vol. 61. – pp. 93–102.
118. Albert, A. Ionisation Constants of Acids and Bases: a laboratory manual / A. Albert, E. P. Serjeant. – London: Methuen&CoLtd. – 1962. – 180 p.
119. Test Guideline No. 107 Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method // OECD Guidelines for the testing of chemicals. – 1995. – 4 p.
120. Mtewa, A. G. Fundamental Methods in Drug Permeability, pKa, LogP and LogDx Determination / A. G. Mtewa [et al.] // Journal of Drug Research and Development. – 2018. – Vol. 4(2). – pp. 1–6.
121. Podunavac-Kuzmanović, S. O. The effect of lipophilicity on the antibacterial activity of some 1-benzylbenzimidazole derivatives / S. O. Podunavac-Kuzmanović, D. D. Cvetković, D. J. Barna // Journal of the Serbian Chemical Society. – 2008. – Vol. 73 (10). – pp. 967–978.

122. Test Guideline No. 117 Partition Coefficient (n-octanol/water): High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method // OECD Guidelines for the testing of chemicals. – 2022. – 12 p.
123. Griffin, S. Determination of octanol–water partition coefficient for terpenoids using reversed-phase high-performance liquid chromatography / S. Griffin, S. Grant Wyllie, J. Markham // *Journal of Chromatography A*. – 1999. – Vol. 864. – pp. 221–228.
124. Hydrophobicity Parameters Determined by Reversed-Phase Liquid Chromatography. XV: Optimal Conditions for Prediction of logP(oct) by Using RP-HPLC Procedures / Chisako Yamagami, Kaname Kawase, Kyoko Iwaki // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. – 2022. – Vol. 50 (12). – pp. 1578–1583.
125. Lambert, W. Modelling oil-water partitioning and membrane permeation using reversed-phase chromatography / W. Lambert // *Journal of Chromatography A*. – 1993. – Vol. 656. – pp. 469–485.
126. Berthod, A. Determination of liquid–liquid partition coefficients by separation methods / A. Berthod, S. Carda-Broch // *Journal of Chromatography A*. – 2004. – Vol. 1037. – pp. 3–14.
127. Mannhold, R. Comparative Evaluation of the Predictive Power of Calculation Procedures for Molecular Lipophilicity / Raimund Mannhol [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1995. – Vol. 84, № 84 (12). – pp. 1410–1419.
128. Martel, S. Large, chemically diverse dataset of log P measurements for benchmarking studies / S. Martel [et al.] // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – Vol. 48. – pp. 21–29.
129. Braumann, T. Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: theory, experimental techniques, and application in studies on quantitative structure-activity relationships / T. Braumann // *Journal of Chromatography A*. – 1986. – Vol. 373. – pp. 191–225.
130. Рудаков О.Б. Растворитель как средство управления процессом в жидкостной хроматографии : [Монография] / О. Б. Рудаков. - Воронеж : ВГУ, 2003 (Тип. РИЦ ВГУ). - 299 с.

131. ФС.2.1.0073.18 «Бромкамфора» / Государственная Фармакопея РФ XIV изд. Т. 3. // femb.ru : [сайт]. – 2018. – URL: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol3/237/> (дата обращения 14.02.2023).
132. National Library of Medicine : [сайт]. – США. – Обновляется в течение суток. – URL : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения 13.03.2021).

## ПРИЛОЖЕНИЕ



«Утверждаю

Директор по качеству

АО «Медисорб»

А.Е. Феодилова

19.02.2024 г.



## АКТ АПРОБАЦИИ

## методик контроля качества субстанции 2-АБФПК

(2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксамид)  
согласно проекту НД

1. **Наименование разработки:** проект НД на субстанцию 2-АБФПК
2. **Место разработки:** ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической химии.
3. **Разработчики методик:** аспирант Цечёв А.Т., доцент Карпенко Ю.Н.
4. **Результаты апробации методик:** Апробация методик проведена в химико-аналитической лаборатории АО «Медисорб» (г. Пермь) на двух сериях субстанции 2-АБФПК. Результаты, полученные при испытаниях по показателям «Подлинность», «Количественное определение», «Родственные примеси», «Остаточные органические растворители», соответствует требованиям НД. Разработанные методики обеспечивают точные и воспроизводимые результаты и могут быть использованы для контроля качества субстанции в рамках процесса фармацевтической разработки и последующего производства ЛП.

Начальник химико-аналитической лаборатории  
АО «Медисорб»

С.Н. Турпанова

Начальник Отдела контроля качества  
АО «Медисорб»

И.А. Назарова

614101, г. Пермь, ул. Причальная, д. 1Б, к. 1



### АКТ АПРОБАЦИИ

**Наименование разработки:** методика количественного определения биологически активного соединения 2-АБФПК в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием.

**Место разработки:** ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра токсикологической химии.

**Авторы:** аспирант Цечёев А.Т., доцент Карпенко Ю.Н.

**Место апробации:** ООО «Парма Клиникал», г. Пермь, лаборатория физико-химических методов анализа.

**Результаты апробации:** Апробация методики проведена на модельных образцах плазмы крови с содержанием 2-АБФПК на 4 уровнях концентраций (0,1; 0,3; 4,5 и 9 мкг/мл) с использованием жидкостного хроматографа «Agilent 1260 Infinity II LC» с диодноматричным детектором.

Установлено, что методика обладает высокой специфичностью и позволяет достичь заявленного уровня чувствительности (100 нг/мл). Результаты оценки правильности и прецизионности соответствуют требованиям, предъявляемым к биоаналитическим методикам.

**Заключение:** разработанная авторами методика может быть использована при изучении фармакокинетики биологически активного соединения 2-АБФПК.

Химик-аналитик лаборатории  
физико-химических методов анализа  
ООО «Парма Клиникал»

Филимонова А.В.

Начальник лаборатории  
физико-химических методов анализа  
ООО «Парма Клиникал»

Внутских А.Д.

614101, г. Пермь, ул. Причальная, д. 1Б, к. 3

**УТВЕРЖДАЮ**  
Ректор ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России,  
доцент В.Т. Лужанин  
« 15 » \_\_\_\_\_ 2024 г.



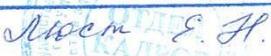
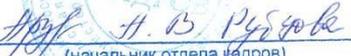
### Акт внедрения научных достижений в учебный процесс

Материалы диссертационной работы Цечёва Артура Тимуровича, аспиранта кафедры токсикологической химии, посвященной разработке аналитических методик для стандартизации субстанции биологически активного соединения 2-АБФПК (2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксамид) и изучения его фармакокинетики внедрены в учебный процесс кафедры токсикологической химии Пермской государственной фармацевтической академии и Регионального испытательного центра «Фарматест».

Разработанные на основе обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии методики оценки качества субстанции 2-АБФПК по показателям «Подлинность», «Количественное определение», «Родственные примеси», а также методики определения 2-АБФПК в плазме крови и моче, используются при проведении практического занятия «Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе лекарственных средств, доклинических фармакокинетических исследованиях новых биологически активных соединений, синтезированных в Пермской фармацевтической академии, и определении биоэквивалентности» цикла «Стандартизация, подтверждение соответствия и контроль качества лекарственных средств» для преподавателей кафедр фармацевтических вузов и училищ химического, технологического профиля, фармакогнозии и ботаники, проводимого на базе Регионального испытательного центра «Фарматест» и кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России.

Заведующий лабораторией физико-химических методов  
Регионального испытательного центра «Фарматест»  
ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, доцент кафедры  
токсикологической химии, к. фарм.н., доцент

 Е.Н. Люст

Подпись 
заверяю:  (начальник отдела кадров)

614990, г. Пермь, ул. Полевая, 2

«УТВЕРЖДАЮ»  
 Первый проректор –  
 проректор по научной работе  
 ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава  
 России, к.фарм.н., доцент  
 Н.В. Демидорова  
 « 10 » \_\_\_\_\_ 2024 г.



**Акт  
 внедрения результатов диссертационной работы  
 в научную деятельность академии**

Материалы диссертационной работы Цечёева Артура Тимуровича, аспиранта кафедры токсикологической химии, по разработке методик для оценки качества биологически активного соединения 2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид (2-АБФПК), обладающего цитотоксической активностью, внедрены в научную деятельность Пермской государственной фармацевтической академии.

Разработанные и валидированные автором аналитические методики на основе современных физико-химических методов позволят стандартизовать субстанцию нового активного соединения и провести дальнейшие испытания его эффективности и безопасности. Предложенные условия высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрической и масс-спектрометрической детекцией будут использованы для изучения фармакокинетических свойств 2-АБФПК.

**Заключение.** Активная фармацевтическая субстанция 2-АБФПК, включена в перспективный план работы ПГФА по внедрению новых лекарственных средств в медицинскую практику в качестве противоопухолевого средства.

Руководитель Регионального испытательного  
 Центра «Фарматест», д.ф.н., профессор

Т.Л. Малкова

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Номер реестровой записи № \_\_\_\_\_  
Дата внесения в государственный реестр лекарственных средств  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

**НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ  
(ПРОЕКТ)**

---

торговое наименование фармацевтической субстанции

**2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-  
дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид**

---

международное непатентованное или химическое наименование

**субстанция-порошок**

---

физическое состояние субстанции

ПРОИЗВОДИТЕЛЬ

ФАСОВЩИК (ПЕРВИЧНАЯ УПАКОВКА)

УПАКОВЩИК (ВТОРИЧНАЯ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКАЯ) УПАКОВКА)

ВЫПУСКАЮЩИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

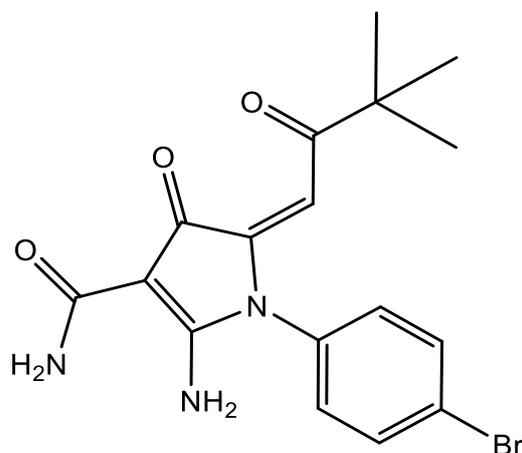
Спецификация  
2-АБФПК, субстанция-порошок

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Визуальный	Мелкокристаллический порошок жёлтого цвета
Растворимость	ГФ РФ, ОФС.1.2.1.0005	Растворим в метаноле, умеренно растворим в ацетонитриле, практически не растворим в н-гексане, практически не растворим в воде
Подлинность	ИК-спектрометрия  УФ- спектрофотометрия  ВЭЖХ	ИК-спектр субстанции 2-АБФПК в области от 4000 до 400 см <sup>-1</sup> по положению полос поглощения должен соответствовать ИК-спектру стандартного образца (СО) 2-АБФПК. УФ-спектр поглощения 0,001% раствора субстанции в области от 220 до 400 нм должен иметь максимум при (263 ± 2) нм, минимум при (213 ± 2) нм и плечо в интервале от (227 ± 2) нм до (244 ± 2) нм. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО 2-АБФПК (раздел «Количественное определение»)
Температура плавления	ГФ РФ, ОФС.1.2.1.0011	От 215 до 217 °С
Родственные примеси	ВЭЖХ	4-броманилин (4-БА) – не более 0,10%; неидентифицированная примесь с RRT 0,85 – не более 0,30%; единичная неидентифицированная примесь – не более 0,10%; сумма примесей – не более 0,50%
Сульфатная зола	ГФ РФ, ОФС.1.2.2.2.0014	Не более 0,10%
Тяжёлые металлы	ГФ РФ, ОФС.1.2.2.2.0012 (метод 1)	Не более 0,001%
Потеря в массе при высушивании	ГФ РФ, ОФС.1.2.1.0010	Не более 0,50%
Вода	ГФ РФ, ОФС.1.2.3.0002 Метод К. Фишера	Не более 0,50%

Остаточные органические растворители	ГХ	бензол не более 2 ppm; ацетонитрил – не более 410 ppm; этанол – не более 3000 ppm; диэтиловый эфир – не более 5000 ppm; триэтиламин – не более 5000 ppm.
Микробиологическая чистота	ГФ РФ, ОФС.1.2.4.0002.18	Категория 2.2
Количественное определение	Титриметрия  УФ- спектрофотометрия ВЭЖХ	От 98,0 до 102,0% $C_{17}H_{18}BrN_3O_3$ (2-АБФПК) в пересчёте на безводное и свободное от органических растворителей вещество
Упаковка	В соответствии с ГФ	
Маркировка	В соответствии с ГФ	
Хранение	При температуре не выше 25 °С и относительной влажности воздуха не выше 60 %	
Срок годности	2 года	

**Химическое наименование:**

2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-карбоксамид



**Эмпирическая формула:** C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**Молекулярная масса:** 392,25

Содержит не менее 98,0 % и не более 102,0 % C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> в пересчёте на безводное и свободное от органических растворителей вещество.

**Описание.** Мелкокристаллический порошок желтого цвета. Метод испытания – визуальный.

**Растворимость.** Растворим в метаноле, умеренно растворим в ацетонитриле, практически не растворим в воде, практически не растворим в н-гексане (ГФ РФ, ОФС.1.2.1.0005 «Растворимость»).

**Подлинность.**

1. *ИК-спектрометрия.* Инфракрасный спектр субстанции, снятый в вазелиновом масле в области от 4000 до 400 см<sup>-1</sup> по положению полос поглощения должен соответствовать спектру СО 2-АБФПК.

2. *УФ-спектрофотометрия.* УФ-спектр поглощения 0,001% раствора субстанции в метаноле в области от 220 до 400 нм должен иметь максимум при (263 ± 2) нм, минимум при (213 ± 2) нм и плечо в интервале от (227 ± 2) нм до (244 ± 2) нм.

3. *ВЭЖХ*. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания пика 2-АБФПК на хроматограмме раствора СО 2-АБФПК (раздел «Количественное определение»).

**Температура плавления.** От 215 до 217 °С (ГФ РФ, ОФС.1.2.1.0011 «Температура плавления»).

**Родственные примеси. Метод ВЭЖХ.**

*4-броманилин (4-БА)* – не более 0,10%;

*неидентифицированная примесь с RRT 0,85* – не более 0,30%;

*единичная неидентифицированная примесь* – не более 0,10%;

*сумма примесей* – не более 0,50%

*Буферный раствор рН 6,8.* См. раздел «Количественное определение».

*Испытуемый раствор.* Около 0,05 г 2-АБФПК (точная навеска) помещают в мерную колбу на 25 мл, растворяют в 10 мл метанола для градиентной ВЭЖХ (или аналогичного качества), доводят объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр из полиамида или полиэфира с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата.

*Раствор сравнения.* 0,5 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу на 50 мл, доводят объем раствора до метки метанолом для градиентной ВЭЖХ (или аналогичного качества), перемешивают.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 10 мл, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

*Раствор для определения чувствительности методики (при анализе неидентифицированных примесей).* 1 мл раствора сравнения помещают в мерную колбу на 10 мл, доводят объем раствора до метки метанолом для градиентной ВЭЖХ (или аналогичного качества), перемешивают.

*Стандартный раствор 4-броманилина.* Около 0,025 г (точная навеска) стандартного образца 4-броманилина (кат. №146280250, Acros Organics) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 5 мл метанола для градиентной ВЭЖХ (или аналогичного качества), доводят объем раствора тем же

растворителем до метки, перемешивают. 1,0 мл раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора метанолом для градиентной ВЭЖХ (или аналогичного качества) до метки, перемешивают.

1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

*Приготовление раствора для определения чувствительности (при анализе примеси 4-броманилина).* 1,0 мл стандартного раствора 4-броманилина помещают в мерную колбу на 10 мл, доводят объем раствора до метки метанолом для градиентной ВЭЖХ (или аналогичного качества), перемешивают.

*Растворы для проверки пригодности хроматографической системы (ППХС).* См. *раствор сравнения* и *стандартный раствор 4-броманилина*.

Растворы используют свежеприготовленными.

#### *Хроматографические условия*

<i>Колонка</i>	Luna C18(2) 100 А, 250×4,6 мм, 5 мкм (кат. №00G-4252-E0, Phenomenex) Допускается использование альтернативной колонки, удовлетворяющей требованиям пригодности хроматографической системы.
<i>Подвижная фаза</i>	фосфатный буфер с рН 6,8 – ацетонитрил для хроматографии (65:35)
<i>Скорость потока</i>	1,0 мл/мин
<i>Температура колонки</i>	+40 °С
<i>Детектор</i>	спектрофотометрический, 258 нм – при анализе единичной неидентифицированной примеси и примеси с RRT 0,85, 240 нм – при анализе идентифицированной примеси 4-броманилина
<i>Объем пробы</i>	10 мкл
<i>Время хроматографирования</i>	60 мин

Приведённые условия являются рекомендуемыми и при необходимости могут быть изменены в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.2.1.2.0001

«Хроматография», раздел «Корректировка условий хроматографирования».

При анализе неидентифицированных примесей последовательно хроматографируют метанол для градиентной ВЭЖХ, раствор для определения чувствительности методики, раствор сравнения (не менее 5 хроматограмм), испытуемый раствор (не менее 3 хроматограмм), раствор для ППХС (не менее 5 хроматограмм).

Время удерживания пика 2-АБФПК около 30 мин.

Содержание каждой неидентифицированной примеси ( $X$ , %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S * 0,1}{S_0}$$

где,

$S$  – площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика 2-АБФПК на хроматограмме раствора сравнения;

$0,1$  – концентрация 2-АБФПК в растворе сравнения (% от содержания 2-АБФПК в испытуемом растворе).

При анализе идентифицированной примеси 4-броманилина последовательно хроматографируют метанол, раствор для определения чувствительности методики, стандартный раствор 4-броманилина (не менее 5 хроматограмм), испытуемый раствор (не менее 3 хроматограмм), раствор для ППХС (не менее 5 хроматограмм).

Время удерживания пика 4-броманилина около 17 мин.

Содержание 4-БА ( $X$ , %) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S * a_0 * 25 * P * 100}{S_0 * a * 25 * 50 * 10 * 100} = \frac{S * a_0 * P}{S_0 * a * 500}$$

где,

$S$  – площадь пика 4-БА на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика 4-БА на хроматограмме стандартного раствора;

$a$  – навеска субстанции 2-АБФПК, г;

$a_0$  – навеска стандартного образца 4-БА, г;

$P$  – содержание 4-БА в стандартном образце, %.

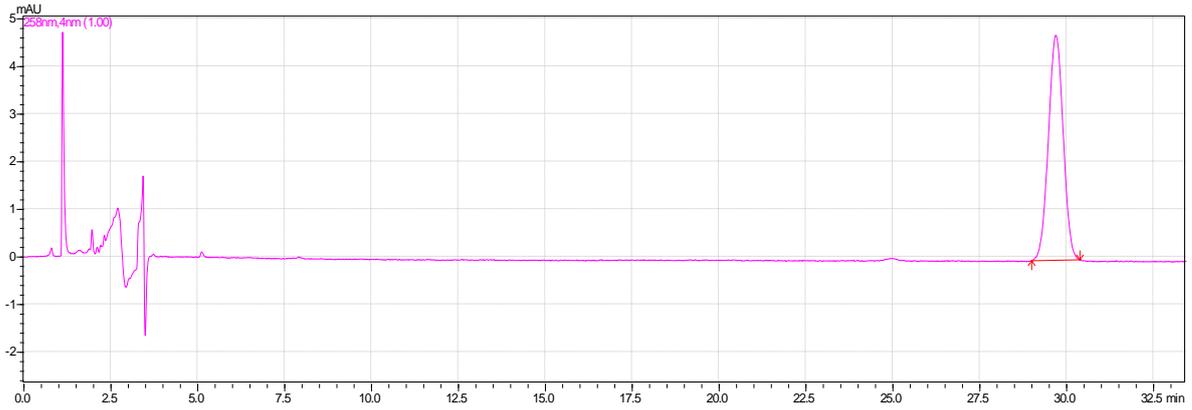


Рис. 1. Типичная хроматограмма раствора сравнения 2-АБФПК

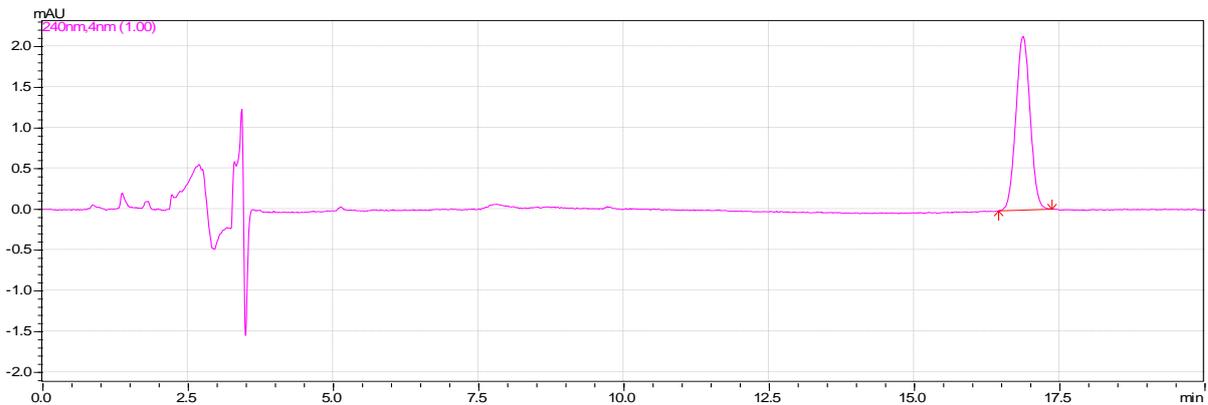


Рис. 2. Типичная хроматограмма стандартного раствора 4-БА

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам 2-АБФПК на хроматограмме раствора сравнения и 4-БА на хроматограмме стандартного раствора, не менее 2000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика 2-АБФПК на хроматограмме раствора сравнения и пика 4-БА на хроматограмме стандартного раствора не более 2,5;
- относительное стандартное отклонение площади пика 2-АБФПК для пяти повторных введений раствора сравнения и площади пика 4-БА для пяти повторных введений стандартного раствора не более 2,0 %;
- отношение сигнал/шум для пика 2-АБФПК на хроматограмме раствора для определения чувствительности (при анализе неидентифицированных примесей) и

для пика 4-БА на хроматограмме раствора для определения чувствительности (при анализе 4-БА) должно быть не менее 10.

Не учитывают пики, соответствующие пикам на хроматограмме метанола и пики, площадь которых составляет менее площади пика 2-АБФПК на хроматограмме раствора для определения чувствительности методики (менее 0,05 %).

**Сульфатная зола.** Не более 0,10%. Сульфатная зола из 1,0 г (точная навеска) субстанции не должна превышать 0,10 % (ГФ РФ, ОФС 1.2.2.2.0014 «Сульфатная зола»).

**Тяжёлые металлы.** Не более 0,001%. Определение проводят в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.2.2.2.0012 «Тяжёлые металлы», метод 1, в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 г субстанции, с использованием эталонного раствора 2.

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 0,50%. Около 1,0 г (точная навеска) субстанции сушат при температуре 100-105 °С до постоянной массы. Потеря в массе не должна превышать 0,50% (ГФ РФ, ОФС.1.2.1.0010 «Потеря в массе при высушивании»).

**Вода.** Не более 0,50%. Для определения используют 1,0 г (точная навеска) субстанции; метод К. Фишера (ГФ РФ, ОФС.1.2.3.0002 «Определение воды»).

**Остаточные органические растворители.** Содержание в субстанции бензола должно быть не более 2 ppm, ацетонитрила – не более 410 ppm, этанола – не более 3000 ppm, диэтилового эфира – не более 5000 ppm и триэтиламина – не более 5000 ppm.

Определение проводят методом ГХ.

*Используемые реактивы:*

- бензол;
- ацетонитрил;
- этанол;
- диэтиловый эфир;
- триэтиламин;

- *N,N*-диметилформаид.

Используемые реактивы должны быть квалификации для ВЭЖХ или ГХ.

*1. Определение этанола, диэтилового эфира, ацетонитрила*

*Испытуемый раствор.* Около 0,5 г (точная навеска) субстанции 2-АБФПК помещали в мерную колбу вместимостью 5 мл, растворяли в 2 мл диметилформаида, доводили объём раствора до метки и перемешивали.

*Стандартный раствор.* По 0,25 г диэтилового эфира и этанола (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл диметилформаида, доводили объём раствора до метки и перемешивали (исходный раствор А).

Около 0,205 г ацетонитрила (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл диметилформаида, доводили объём раствора до метки и перемешивали (исходный раствор Б<sub>1</sub>).

1,0 мл исходного раствор Б<sub>1</sub> помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объём раствора до метки диметилформаидом и перемешивали (исходный раствор Б<sub>2</sub>).

1,0 мл раствора А и 1,0 мл раствора Б<sub>2</sub> помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объём раствора диметилформаидом до метки и перемешивали. Все растворы используют свежеприготовленными.

*Хроматографические условия:*

<i>Колонка</i>	НР-FFAP (50 м × 0,32 мм × 0,5 мкм)
<i>Газ - носитель</i>	Азот
	деление потока 1/10
	давление газа-носителя 40 кПа
<i>Температура термостата колонок</i>	50°C в течение 2 минут, затем со скоростью 5 °С/мин. до 120 °С, затем со скоростью 45 °С/мин. до 210 °С
<i>Температура инжектора</i>	180 °С
<i>Температура детектора</i>	230 °С

Объем пробы	1 мкл
Способ ввода пробы	прямой ввод
Детектор	ПИД, скорость подачи воздуха – 350 мл/мин, водорода – 35 мл/мин.
Время хроматографирования	29 мин.

Приведённые условия являются рекомендуемыми и при необходимости могут быть изменены в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.2.1.2.0001 «Хроматография», раздел «корректировка условий хроматографирования».

Хроматографируют стандартный раствор, получая не менее 3 хроматограмм.

Порядок выхода растворителей в описанных выше хроматографических условиях: диэтиловый эфир, этанол, ацетонитрил.

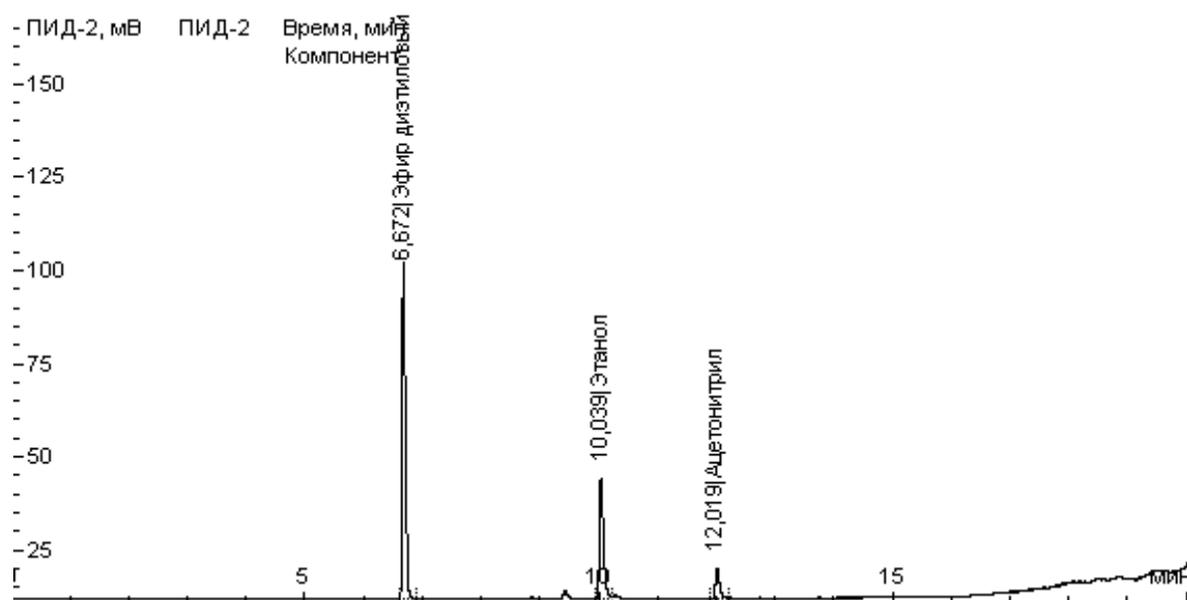


Рис. 3 Хроматограмма стандартного раствора для определения диэтилового эфира, этанола и ацетонитрила

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограмм стандартного раствора выполняются следующие условия:

– эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику каждого органического растворителя, не менее 10000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии пика каждого остаточного органического растворителя - не более 2,5;
- разрешение между пиками остаточных органических растворителей – не менее 1,5;
- относительное стандартное отклонение для площади пика каждого остаточного органического растворителя - не более 15,0 %.

Хроматографируют испытуемый раствор, получая не менее 2 хроматограмм.

Содержание диэтилового эфира и этанола в ppm (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 1 \times 5 \times P}{S_0 \times 50 \times 10 \times a \times 100} \times 10^6 = \frac{S \times a_0 \times P \times 100}{S_0 \times a}$$

где,

$S$  – площадь пика диэтилового эфира (этанола) на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика диэтилового эфира (этанола) на хроматограмме стандартного раствора;

$a$  – навеска субстанции, в граммах;

$a_0$  – навеска диэтилового эфира (этанола), используемая для приготовления стандартного раствора, в граммах;

$P$  – содержание диэтилового эфира (этанола) в стандартном образце, используемом для приготовления стандартного раствора в процентах.

Содержание ацетонитрила в ppm (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 1 \times 1 \times 5 \times P}{S_0 \times 50 \times 10 \times 10 \times a \times 100} \times 10^6 = \frac{S \times a_0 \times P \times 10}{S_0 \times a}$$

где,

$S$  – площадь пика ацетонитрила на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика ацетонитрила на хроматограмме стандартного раствора;

$a$  – навеска субстанции, в граммах;

$a_o$  – навеска ацетонитрила, используемая для приготовления стандартного раствора, в граммах;

$P$  – содержание ацетонитрила в стандартном образце, используемом для приготовления стандартного раствора в процентах.

## 2. Определение триэтиламина

*Испытуемый раствор.* Около 0,5 г (точная навеска) субстанции 2-АБФПК помещали в мерную колбу вместимостью 5 мл, растворяли в 2 мл диметилформамида, доводили объём раствора до метки и перемешивали.

*Стандартный раствор.* Около 0,25 г триэтиламина (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл диметилформамида, доводили объём раствора до метки и перемешивали.

1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объём раствора диметилформамидом до метки и перемешивали.

Все растворы используют свежеприготовленными.

### *Хроматографические условия:*

<i>Колонка</i>	НР-5 (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм)
<i>Газ - носитель</i>	Азот
	деление потока 1/15
	давление газа-носителя 60 кПа
<i>Температура термостата колонок</i>	70°C в течение 4 минут, затем со скоростью 25 °C/мин. до 150 °C
<i>Температура инжектора</i>	230 °C
<i>Температура детектора</i>	250 °C
<i>Объем пробы</i>	1 мкл
<i>Способ ввода пробы</i>	прямой ввод
<i>Детектор</i>	ПИД, скорость подачи воздуха – 400 мл/мин, водорода – 40 мл/мин.
<i>Время хроматографирования</i>	10 мин

Приведённые условия являются рекомендуемыми и при необходимости могут быть изменены в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», раздел «корректировка условий хроматографирования».

Хроматографируют стандартный раствор, получая не менее шести хроматограмм.

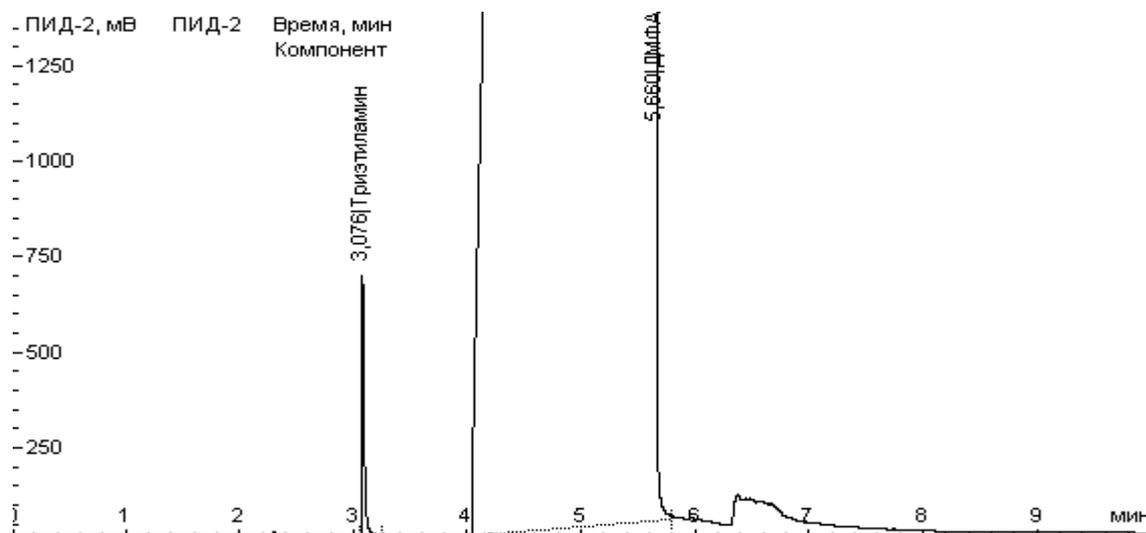


Рис. 4 Хроматограмма стандартного раствора триэтиламина

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограмм стандартного раствора выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику каждого органического растворителя, не менее 10000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика каждого остаточного органического растворителя - не более 2,5;
- разрешение между пиками остаточных органических растворителей – не менее 1,5;
- относительное стандартное отклонение для площади пика каждого остаточного органического растворителя - не более 15,0 %.

Хроматографируют испытуемый раствор, получая не менее 2 хроматограмм.

Содержание триэтиламина в ppm (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 1 \times 5 \times P}{S_0 \times 50 \times 10 \times a \times 100} \times 10^6 = \frac{S \times a_0 \times P \times 100}{S_0 \times a}$$

где,

$S$  – площадь пика триэтиламина на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика триэтиламина на хроматограмме стандартного раствора;

$a$  – навеска субстанции, в граммах;

$a_0$  – навеска триэтиламина, используемая для приготовления стандартного раствора, в граммах;

$P$  – содержание триэтиламина в стандартном образце, используемом для приготовления стандартного раствора в процентах.

### 3. Определение бензола

*Испытуемый раствор.* Около 0,5 г (точная навеска) субстанции 2-АБФПК помещали в мерную колбу вместимостью 5 мл, растворяли в 2 мл диметилформамида, доводили объём раствора до метки и перемешивали.

*Стандартный раствор.* Около 0,040 г бензола (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл диметилформамида, доводили объём раствора до метки и перемешивали (раствор А).

0,5 мл исходного раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объём раствора до метки диметилформамидом и перемешивали (раствор Б).

0,5 мл раствора Б помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объём раствора диметилформамидом до метки и перемешивали.

2 мл стандартного (испытуемого раствора) помещают в пенициллиновый флакон, термостатируют 15 минут, 1 мл парогазовой фазы вводят в инжектор хроматографа.

Все растворы используют свежеприготовленными.

*Хроматографические условия:*

<i>Колонка</i>	НР-FFAP (50 м × 0,32 мм × 0,5 мкм)
<i>Газ - носитель</i>	Азот
	деление потока 1/15
	давление газа-носителя 45 кПа
<i>Температура термостата колонок</i>	55°C в течение 1 минуты, затем со скоростью 10 °C/мин. повышение до 150 °C, затем со скоростью 25 °C/мин. повышение до 210 °C
<i>Температура инжектора</i>	210 °C
<i>Температура детектора</i>	240 °C
<i>Объем пробы</i>	1 мл
<i>Способ ввода пробы</i>	паро-фазный анализ
<i>Детектор</i>	ПИД, скорость подачи воздуха – 420 мл/мин, водорода – 42 мл/мин.
<i>Время хроматографирования</i>	30 мин
<i>Температура термостатирования</i>	80 °C
<i>Температура крана</i>	80 °C
<i>Время термостатирования</i>	15 минут

Приведённые условия являются рекомендуемыми и при необходимости могут быть изменены в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», раздел «корректировка условий хроматографирования».

Хроматографируют стандартный раствор, получая не менее шести хроматограмм.

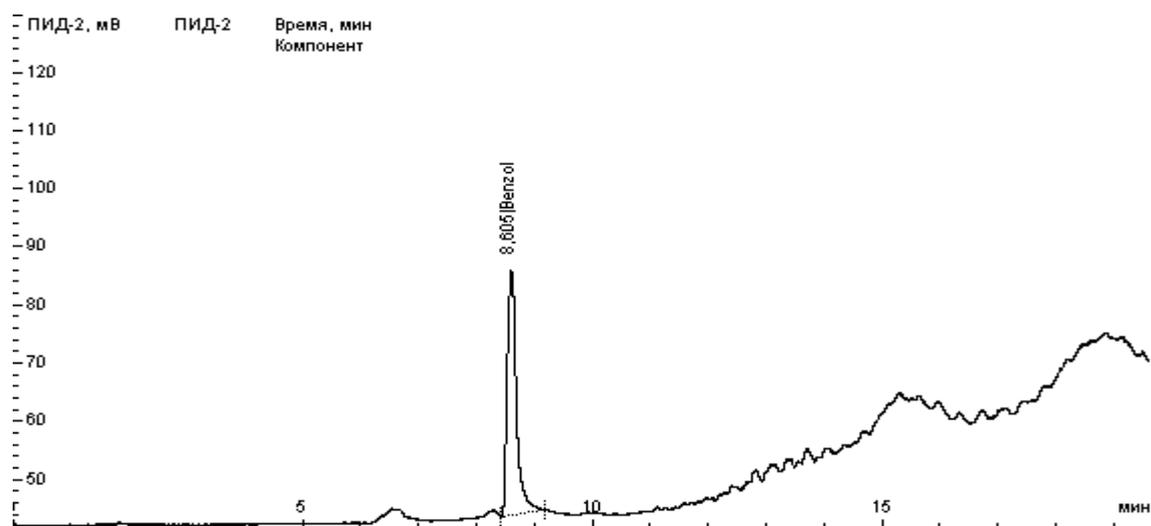


Рис. 5 Хроматограмма стандартного раствора бензола

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографическая система считается пригодной, если для хроматограмм стандартного раствора выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику каждого органического растворителя, не менее 10000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика каждого остаточного органического растворителя - не более 2,5;
- разрешение между пиками остаточных органических растворителей – не менее 1,5;
- относительное стандартное отклонение для площади пика каждого остаточного органического растворителя - не более 15,0 %.

Хроматографируют испытуемый раствор, получая не менее 2 хроматограмм.

Содержание бензола в ppm (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 0,5 \times 0,5 \times 5 \times P}{S_0 \times 50 \times 100 \times 10 \times a \times 100} \times 10^6 = \frac{S \times a_0 \times P}{S_0 \times a \times 4}$$

где,

S – площадь пика бензола на хроматограмме испытуемого раствора;

S<sub>0</sub> – площадь пика бензола на хроматограмме стандартного раствора;

$a$  – навеска субстанции, в граммах;

$a_0$  – навеска бензола, используемая для приготовления стандартного раствора, в граммах;

$P$  – содержание бензола в стандартном образце, используемом для приготовления стандартного раствора в процентах.

**Микробиологическая чистота.** Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота», категория 2.2.

### **Количественное определение.**

#### *1. Титриметрия*

250 мг 2-АБФПК (точная навеска) растворяют в 25 мл метанола, добавляют 10 мл 30% раствора калия гидроксида и 2 г порошка цинка, кипятят в течение 60 минут с обратным холодильником. После кипячения холодильник промывают 5 мл спирта 95% и продолжают кипячение в течение 5 минут.

Суспензию охлаждают до комнатной температуры и фильтруют в мерную колбу на 50 мл через фильтр «синяя лента». Фильтр промывают 10 мл воды очищенной. Доводят рН фильтрата до 7 уксусной кислотой разведённой 30%. Раствор в колбе доводят водой очищенной до метки и перемешивают.

10,0 мл раствора помещают в коническую колбу на 100 мл, добавляют 0,25 мл калия хромата 5% и титруют 0,01М раствором серебра нитрата до перехода окраски суспензии из желтой в красную.

1 мл 0,01М раствора серебра нитрата соответствует 3,92 мг безводного 2-АБФПК ( $C_{17}H_{18}BrN_3O_3$ ).

#### *2. УФ-спектрофотометрия*

*Испытуемый раствор.* около 0,05 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл метанола, доводят до метки тем же растворителем и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки метанолом.

*Раствор СО 2-АБФПК.* Около 0,05 г (точная навеска) СО 2-АБФПК помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл метанола, доводят до метки тем же растворителем и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят до метки метанолом.

Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного растворов при длине волны 263 нм в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют метанол.

Содержание  $C_{17}H_{18}BrN_3O_3$  (2-АБФПК) в субстанции в процентах ( $X$ ) в пересчете на свободное от воды вещество рассчитывают по следующей формуле:

$$X = \frac{A_x * a_0 * 50 * 100 * 100 * P * 100}{A_0 * a_x * 50 * 100 * 100 * (100 - W)} = \frac{A_x * a_0 * P * 100}{A_0 * a_x * (100 - W)}$$

где,

$A_x$  – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_0$  – оптическая плотность раствора СО;

$a_x$  – навеска субстанции, в граммах;

$a_0$  – навеска СО, в граммах;

$P$  – содержание 2-АБФПК в СО, %;

$W$  – содержание воды, %.

### 3. ВЭЖХ

*Буферный раствор рН 6,8.* 51,0 мл 27,2 г/л раствора калия дигидрофосфата смешивают с 49 мл 71,6 г/л раствора динатрия гидрофосфата. Если необходимо, доводят рН до 6,8 потенциометрически исходным раствором калия дигидрофосфата или динатрия гидрофосфата и фильтруют через мембранный фильтр из полиамида или полиэфира с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата.

*Испытуемый раствор.* Около 0,025 г (точная навеска) субстанции 2-АБФПК помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл метанола для градиентной ВЭЖХ, доводят тем же растворителем до метки. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 10 мл, доводят объем

раствора метанолом для градиентной ВЭЖХ, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр из полиамида или полиэфира с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата.

*Раствор СО 2-АБФПК.* Около 0,025 г (точная навеска) субстанции 2-АБФПК помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл метанола для градиентной ВЭЖХ, доводят тем же растворителем до метки. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 10 мл, доводят объем раствора метанолом для градиентной ВЭЖХ, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр из полиамида или полиэфира с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата.

Растворы используют свежеприготовленными.

*Хроматографические условия:*

<i>Колонка</i>	Luna C18(2) 100 А, 250×4,6 мм, 5 мкм, (кат. №00G-4252-E0, Phenomenex). Допускается использование альтернативной колонки, удовлетворяющей требованиям пригодности хроматографической системы.
<i>Подвижная фаза</i>	фосфатный буфер с рН 6,8 – ацетонитрил для хроматографии (50:50)
<i>Скорость потока</i>	1,0 мл/мин
<i>Температура колонки</i>	+40 °С
<i>Детектор</i>	спектрофотометрический, 258 нм
<i>Объем пробы</i>	10 мкл

Время удерживания пика 2-АБФПК около 8 мин.

Приведённые условия являются рекомендуемыми и при необходимости могут быть изменены в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», раздел «Корректировка условий хроматографирования».

Хроматографируют раствор СО 2-АБФПК, получая не менее пяти хроматограмм. Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику 2-АБФПК на хроматограмме раствора СО 2-АБФПК, не менее 2000 теоретических тарелок;

- фактор асимметрии пика 2-АБФПК на хроматограмме раствора СО 2-АБФПК не более 2,5;

- относительное стандартное отклонение площади пика 2-АБФПК, рассчитанное по пяти последовательным хроматограммам, на хроматограмме раствора СО 2-АБФПК, не более 2,0 %;

Хроматографируют испытуемый раствор, получая не менее трёх хроматограмм.

Содержание  $C_{17}H_{18}BrN_3O_3$  (2-АБФПК) в субстанции в процентах ( $X$ ) в пересчёте на безводное и не содержащее органических растворителей вещество вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_x * a_0 * 25 * 10 * P * 100}{S_0 * a_1 * 25 * 10 * (100 - W)} = \frac{S_x * a_0 * P * 100}{S_0 * a_1 * (100 - W)}$$

где  $S_x$  – площадь пика 2-АБФПК на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_0$  – площадь пика 2-АБФПК на хроматограмме раствора СО;

$a_1$  – навеска субстанции, в граммах

$a_0$  – навеска СО 2-АБФПК, в граммах;

$P$  – содержание 2-АБФПК в СО, в процентах;

$W$  – суммарное содержание воды и органических растворителей в субстанции, в процентах.

**Упаковка.** В соответствии с ГФ РФ.

**Маркировка.** В соответствии с ГФ РФ.

**Хранение.** При температуре не выше 25 °С и относительной влажности воздуха не выше 60 %.

**Срок годности.** 2 года

Примечания:

1. Реактивы, приведенные в настоящей нормативной документации, описаны в ГФ РФ XV издания, ОФС.1.3.0001 «Реактивы. Индикаторы».

2. Для проведения текущих анализов на предприятии допускается использование стандартных образцов серийных субстанций, аттестованных по фармакопейным стандартным образцам.

3. Фирма гарантирует безвозмездную поставку стандартных образцов, необходимых для контроля качества лекарственного препарата на территории РФ.