

TOSHKENT FARMATSEVTIKA INSTITUTI KENGASHINING
2024 yil 2 maydag'i 09-sonli majlis bayonidan

KO'CHIRMA

Qatnashdilar: Majlis raisi K.S.Rizayev
Kengash kotibi Z.V.Turdiyeva
Kengash a'zolari - 43 nafar

KUN TARTIBI:

5. Turli masalalar

5.4.21. Institut pedagog xodimlari tomonidan tayyorlangan o'quv adabiyotlarining (darslik, monografiya, o'quv qo'llanmalari, uslubiy ko'rsatmalar va boshq.) muhokamasi va ularni nashr etishga tavsiya qilish to'g'risida.

TINGLANDI:

Ushbu masala yuzasidan, Kengash kotibi Z.V.Turdiyeva so'zga chiqib, Toshkent farmatsevtika instituti Muammolar hay'atining 2024 19 apreldagi 4-sonli majlisida Farmatsevtik kimyo kafedrasи professori R.A.Xusainova tomonidan tayyorlangan "Идентификация β-лактамидов" nomli monografiya muhokama qilinganligi va chop etishga ruxsat olish uchun institut kengashiga taqdim etilganligini aytdi.

Taqrizchilar: М.Б. Мавлянова- доцент кафедры фармацевтической химии Фармацевтического института образования и исследования .

Д.А. Зулфикариева- профессор кафедры токсикологической химии Ташкентского фармацевтического института.

Monografiya belgilangan tartibda chop etishga tavsiya etish taklifini kiritdi. Taklif barcha majlis qatnashchilari tomonidan bir ovozdan ma'qullandi.

QAROR QILINDI:

Farmatsevtik kimyo kafedrasи professori R.A.Xusainova tomonidan tayyorlangan "Идентификация β- лактамидов"nomli monografiya belgilangan tartibda chop etishga tavsiya qilinsin.



Majlis raisi

K.S.Rizayev

Kengash kotibi

Z.V.Turdiyeva

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

Р.А. ХУСАИНОВА

ИДЕНТИФИКАЦИЯ β-ЛАКТАМИДОВ
(Монография)



Ташкент 2024

Приоритетным направлением государственной политики в области здравоохранения в настоящее время является обеспечение прав людей на охрану здоровья и получение гарантированного объема качественной медицинской и лекарственной помощи.

В перечень трех жизненно важных групп (цефалоспорины, пенициллины и хинолоны) антибактериальных препаратов, характеризующихся наивысшим приоритетом, были включены и цефалоспорины – высокоэффективные и относительно безопасные лекарственные препараты. Это в первую очередь объясняется тем, что лечение ими является наиболее действенной терапией при тяжелых заболеваниях, вызванных, например, сальмонеллезными инфекциями, особенно у детей.

В соответствии закона республики Узбекистан “О лекарственных средствах и фармацевтической деятельности”, принятого 4 января 2016 года фармакопейная статья - устанавливает требования к качеству определенного лекарственного средства, изделия медицинского назначения, лекарственного растительного сырья, вспомогательного вещества.

В современном фармакопейном анализе активно используются физические и физико-химические методы, в частности ИК- и УФ-спектрофотометрия и хроматография (ВЭЖХ, ГЖХ, ТСХ). Учитывая вышеизложенное, изучение унифицированного подхода к стандартизации и контролю качества лекарственных средств группы β-лактамидов на основе расширенного применения комплекса современных физико-химических методов и развития научных основ получения, оценки и применения стандартных образцов, в том числе субстанции, применяемых для производства лекарственных средств, гармонизованных с международными стандартами, определяет актуальность данной монографии.

Автор:

ХУСАИНОВА Р.А. – и/о профессор кафедры фармацевтической химии Ташкентского фармацевтического института, д.фарм.н., доцент

Рецензенты:

Зулфикариева Д.А. – Профессор кафедры токсикологической химии Ташкентского фармацевтического института, д.фарм.н.

Мавлянова М.Б. – Доцент кафедры фармацевтической химии Фармацевтического института образования и исследования, к.фарм.н.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ВФС - временная фармакопейная статья

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ - газо-жидкостная хроматография

ЕФ – Европейская фармакопея

USP – Фармакопея США

ВР – Британская фармакопея

ChP – Китайская фармакопея

ГФ XI - Государственная фармакопея СССР, одиннадцатое издание

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ИК - инфракрасный

МНН - международное непатентованное название

НД - нормативная документация

ОФС - общая фармакопейная статья

ПФ - подвижная фаза

РСО - рабочий стандартный образец

СОВС — стандартный образец вещества-свидетеля

ТСХ - тонкослойная хроматография

УФ - ультрафиолет

ФС - фармакопейная статья

EPCRS - European Pharmacopoeia chemical reference standard, химический стандартный образец Европейской фармакопеи

GMP - Good manufacturing practice, правила надлежащей производственной практики

ICH - International convention of harmonization, международная конвенция по гармонизации требований

RS - reference standard, стандартный образец

ВВЕДЕНИЕ

В течение последнего десятилетия вопросы стандартизации и контроля качества лекарственных средств продолжают оставаться актуальными как на международном, так и на национальном уровне [1]. Это обусловлено рядом причин:

- общим увеличением числа зарегистрированных лекарственных средств, которые выпускаются в различных лекарственных формах для разного способа введения, с разной скоростью и длительностью вы свобождения. Одно и то же лекарственное средство выпускается различными фармацевтическими фирмами под разными торговыми наименованиями;
- введением в медицинскую практику высокоактивных веществ, принадлежащих к новым классам природных и синтетических соединений;
- экономическими изменениями на фармацевтическом рынке за счет включения в сферу обращения на международном и региональном уровне, наряду с готовыми лекарственными средствами, лекарственных веществ (субстанций), а также вспомогательных веществ;
- вовлечением в сферу производства лекарственных средств организаций и предприятий различных форм собственности, не занимавшихся ранее фармацевтическим производством (коммерческие структуры, предприятия химической промышленности, военно-промышленного комплекса).

В ведущих странах мира национальная политика в области обеспечения высокого качества лекарственных средств базируется на системе GMP, которая регламентирует контроль исходного сырья и производственный процесс в целом. В России центр тяжести этой политики переносится на контроль качества готового продукта [39, 40]. Совокупность фармакопейных показателей в сочетании с объективными методами контроля является в настоящее время единственным средством, гарантирующим возможность медицинского применения лекарственных средств. В связи с этим проблема повышения эффективности контроля качества лекарственных средств путем

разработки национальных стандартов качества, не уступающих международному уровню, является актуальной [2, 4].

Это в первую очередь относится к лекарственным веществам, нормативная документация на которые не соответствует современным требованиям: не предусмотрено нормирование посторонних примесей, остаточных органических растворителей и других показателей, которые позволяют дать сравнительную оценку качества субстанций, производимых различными фирмами [49, 54].

ГЛАВА I.

1.1. Фармакологические аспекты.

Антибиотики представляют собой обширную группу лекарственных средств различного химического строения и механизмов действия, которые применяются для лечения различных инфекционных заболеваний дыхательных путей (пневмония, бронхопневмония, ангина), мочевыводящих путей, печени, желудочно-кишечного тракта, и сопровождающихся воспалительным процессом.

Воспаление - это возникшая в ходе эволюции реакция живых тканей на патогенное раздражение, состоящая из сложных поэтапных изменений микроциркуляторного русла, системы крови и соединительной ткани, которые направлены на изоляцию и устранение повреждающего агента, и восстановление поврежденных тканей [36]. Фармакологическая регуляция воспалительного процесса относится к числу наиболее сложных проблем современной фармакологии. Это связано с тем, что сам феномен воспаления весьма неоднороден как по этиологии, так и по участвующим в его развитии механизмам патогенеза, особенностям течения, местным и общим проявлениям [62, 63, 70]. Поэтому лекарственные средства, применяемые для терапии инфекционных заболеваний, существенно различаются по механизмам воздействия на определенные формы воспалительных реакций и особенностям химического строения. По этим признакам бета-лактамные антибиотики подразделяются на несколько групп: пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы [37, 63, 77].

1.2. Пеницилловые лекарственные средства: история открытия и механизмы действия.

В 1928 году Александр Флеминг проводил рядовой эксперимент в ходе многолетнего исследования, посвященного изучению борьбы человеческого организма с бактериальными инфекциями. Вырастив колонии культуры *Staphylococcus*, он обнаружил, что некоторые из чашек для культивирования заражены обычновенной плесенью *Penicillium* — веществом, из-за которого

хлеб при долгом лежании становится зеленым. Вокруг каждого пятна плесени Флеминг заметил область, в которой бактерий не было. Из этого он сделал вывод, что плесень вырабатывает вещество, убивающее бактерии. В последствии он выделил молекулу, ныне известную как «пенициллин». Это и был первый современный антибиотик [115, 132].

Принцип работы антибиотика состоит в торможении или подавлении химической реакции, необходимой для существования бактерии. Пенициллин блокирует молекулы, участвующие в строительстве новых клеточных оболочек бактерий — похоже на то, как наклеенная на ключ жевательная резинка не дает открыть замок. Пенициллин не оказывает влияния на человека или животных, потому что наружные оболочки наших клеток коренным образом отличаются от клеток бактерий [135].

В течение 1930-х годов предпринимались безуспешные попытки улучшить качество пенициллина и других антибиотиков, научившись получать их в достаточно чистом виде. Первые антибиотики напоминали большинство современных противораковых препаратов — было неясно, убьет ли лекарство возбудителя болезни до того, как оно убьет пациента. И только в 1938 году двум ученым Оксфордского университета, Говарду Флори (Howard Florey, 1898–1968) и Эрнесту Чейну (Ernst Chain, 1906–79), удалось выделить чистую форму пенициллина. В связи с большими потребностями в медикаментах во время Второй мировой войны массовое производство этого лекарства началось уже в 1943 году. В 1945 году Флемингу, Флори и Чейну за их работу была присуждена Нобелевская премия [84].

Первым антибиотиком, который был открыт случайно, является именно легендарный пенициллин. Бензилпенициллин (пенициллин G (PCN G) или просто пенициллин (PCN)) — N-фенилацетамид 6-аминопенициллановой кислоты. Антибиотик, получаемый из плесневого гриба пенициллиума. Необходимо отметить тот момент, что его действие основывается на процессе подавления того синтеза, который существует в оболочках внешнего типа, а также он относится еще и к клеткам бактериальной категории — бензилпенициллин препятствуют размножению клеток прокариот, в том числе

и цианобактерий, а также препятствуют делению хлоропластов. Примерно в 1929 году хорошо известный в то время британский бактериолог Александр Флеминг проводил серию экспериментов по изучению плесневых грибов. Он установил, что определенный вид плесневых грибов выделяет специфическое антибактериальное вещество, позже названное пенициллином. Именно его опыты были посвящены подробному изучению влияния бактериальных инфекций на организм человека [91]. Ампициллин широко применяется в лечении бактериальных инфекций с 1961 года. До внедрения ампициллина британской компанией Beecham, терапия пенициллином была эффективной только против грамположительных микроорганизмов, таких как стафилококки и стрептококки. Ампициллин (первоначально под маркой Пенбритин) также продемонстрировал активность против грамотрицательных организмов, таких как гемофильная палочка, кишечная палочка и протей [92].

Пенициллины обладают преимущественно бактерицидным эффектом. Они препятствуют синтезу пептидогликана, являющегося основным компонентом клеточной стенки бактерий, а именно подавляют транспептидазную реакцию синтеза компонентов клеточной стенки (например D-аланина). Блокирование синтеза пептидогликана приводит к гибели бактерии. Для преодоления широко распространенной среди микроорганизмов приобретенной устойчивости, связанной с продукцией особых ферментов — β -лактамаз, разрушающих β -лактамы, — были разработаны так называемые защищённые пенициллины, включающие соединения, способные необратимо подавлять активность β -лактамаз (ингибиторы β -лактамаз) — клавулановую кислоту, сульбактам и тазобактам [96, 110].

Также возможен другой путь образования устойчивости — изменение характерных частей пенициллиносвязывающих белков. Поскольку пептидогликан и пенициллиносвязывающие белки отсутствуют у млекопитающих, пенициллины практически не имеют серьёзных побочных эффектов. Однако у некоторых больных могут развиться аллергические реакции на пенициллин, которые проявляются в виде кожных высыпаний, отека горла и повышения температуры, анафилактического шока [121, 133].

1.3. Классификация пенициллинов.

В настоящее время все пенициллины подразделяются на 4 группы или поколения:

К первой группе относят:

- пенициллины естественного происхождения (синтезированы грибами) бензилпенициллин и феноксиметилпенициллин. Обладают узким спектром действия на гноеродные кокки и некоторые грамположительные бактерии, так как их β -лактам не защищён от действия пенициллина (ферментов, которые синтезируются некоторыми микроорганизмами (*Staphylococcus*));

- полусинтетические пенициллины, обладающие устойчивостью к пенициллиназам, поэтому они применяются для борьбы с более широким спектром микроорганизмов (кокки, стафилококки, грамположительные и некоторые грамотрицательные бактерии). Сюда относятся: метициллин, оксациллин, нафциллин;

- аминопенициллины с расширенным спектром действия амоксициллин, ампициллин;

2—3 группы включают карбоксипенициллины (тикарциллин, карбенициллин);

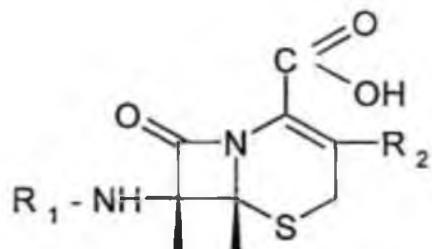
4 группа включает пенициллины с широким антибактериальным спектром:

уреидопенициллины (мезлоциллин, азлоциллин);

амидинопенициллины (мециллам) [66].

1.4. Номенклатура цефалоспоринов.

Общую формулу цефалоспоринов можно представить следующим образом:



Цефалоспорины - полусинтетические соединения. Все синтезированные производные цефалопоринов условно разделяют на 4 поколения. С каждым поколением увеличивается их устойчивость, активность и спектр действия. В основном их используют для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями (например, инфекции почек, циститы), или грамположительными бактериями, если пенициллины оказались неэффективными. Большинство цефалоспоринов плохо всасываются из ЖКТ, некоторые принимают внутрь (цефалексин) [20, с.320; 21, с.608; 22, с.366; 23, с.384].

Таблица 1

Классификация цефалоспоринов

I поколение	II поколение	III поколение	IV поколение
Парентеральные			
Цефазолин	Цефуроксим	Цефотаксим Цефтриаксон Цефтазидим Цефоперазон Цефоперазон-сульбактам	Цефепим
Пероральные			
Цефалексин	Цефуроксим аксетил	Цефиксим	
Цефадроксил	Цефаклор	Цефтибутен	

Таблица 2

Данные о регистрации цефалоспориновых антибиотиков в РУз (01.03.2019 г.)

Международное название	Торговое название	Лекарственные формы
Цефазолин	Цефазолин натриевая соль Золин Кефзол Оризолин Тотацеф Цефаприм Анцеф Цефоприд Золфин	Лиофилизированный порошок для приготовления раствора для инъекций
Цефалексин	Кефлекс Оспексин Сепексин Цепорекс Споридекс Улекс Фелексин Цефалексина натриевая соль стерильная	таблетки капсулы порошок для приготовления инъекционного раствора
Цефадроксил	Биодроксил Дурацеф Ибидроксил Лайдроксил Цедрокс Цефрадур	гранулы для приготовления оральной супензии/ капсулы/ порошок для приготовления супензии для приема внутрь (флаконы 40 мл), 125мг/5мл/ супензия оральная 250мг/5мл
Цефуроксим	Цефурабол Зиннат Кетоцеф Кефурокс Аксетин	лиофилизированный порошок для приготовления инъекционного раствора
Цефаклор	Верцеф Тарацеф Цефттор Цеклор	
Цефотаксим	Цеффаст	Порошок для

	Клафоран Лифоран Кефотекс Талцеф Цетакс Цефантрал	приготовления раствора для инъекций
Цефтриаксон	Витаксон Роцефин Тороцеф Цефаксон Форцеф Цефограм Цефатрин Триаксон	лиофилизированный порошок для приготовления инъекционного раствора
Цефтазидим	Кефадим Мироцеф Фортум Фортазим Цефтидин	лиофилизированный порошок для приготовления инъекционного
Цефоперазон	Дардум Медоцеф Цефобид Цефализон	Порошок для приготовления раствора для инъекций
Цефиксим	Цефспан Супракс	капсулы
Цефалотин	Кефлин Цефалотин	лиофилизированный порошок для приготовления инъекционного раствора
Цефамандол	Цефат Цефамабол	порошок для приготовления инъекционного раствора
Цефапирин	Цефатрексил	приготовления инъекционного раствора
Дефметазол	Цефметазон	приготовления внутривенных инъекций
Цефрадин	Сефрил Цефрадин	приготовления оральной сuspензии(флаконы) 250мг/5мл
Цефотетан	Цефотетан	порошок для приготовления инъекций

Цефалоридин	Цепорин	порошок для приготовления инъекций
Цефепим	Максипим Максицеф	порошок для приготовления инъекционного раствора
Цефокситин	Анаэроцеф Цефокситин натрия	порошок для приготовления инъекционного раствора
Цефпирамид	Тамицин	порошок для приготовления инъекционного раствора
Цефпиром	Кейтен	порошок для приготовления инъекционного раствора
Цефроксадин	Ораспор	порошок для приготовления инъекционного раствора
Цефсулодин	Монаспор	порошок для приготовления инъекционного раствора
Цефтибутен	Цедекс	Порошок для приготовления супензии
Цефтизоксим	Сефизокс Эпоцелин	порошок для приготовления инъекционного раствора

1.5. Применение β-лактамидов в медицине

β-лактамиды занимают одно из важнейших мест в арсенале лекарственных препаратов, применяемых для лечения инфекционных заболеваний дыхательных путей, мочевыводящих путей, печени и желудочно-кишечного тракта. β-лактамиды относятся к числу наиболее эффективных антибиотиков, широко применяемых в РУз и за рубежом для лечения

инфекционно-воспалительные заболевания, вызванные чувствительными микроорганизмами: инфекции дыхательных путей и лор-органов (пневмония, абсцесс легкого, бронхит, синусит, тонзиллит, фарингит, средний отит), инфекции почек и мочевыводящих путей (цистит, пиелонефрит, пиелит, уретрит), инфекции билиарной системы (холангит, холецистит), хламидийные инфекции у беременных женщин (при непереносимости эритромицина), цервицит, пастереллез, листериоз, инфекции кожи и мягких тканей (рожа, импетиго, вторично-инфицированные дерматозы), инфекции опорно-двигательного аппарата, инфекции ЖКТ (брюшной тиф и паратиф, дизентерия, шигеллез, сальмонеллез, сальмонеллезное носительство), абдоминальные инфекции (перитонит), бактериальный эндокардит (профилактика и лечение), гонорея, менингит, сепсис, коклюш [26, 38, 67].

Вынужденное длительное применение современных антибиотиков в больших дозах приводит к появлению ряда нежелательных побочных эффектов: крапивница, эритема, отек Квинке, ринит, конъюнктивит, лихорадка, боли в суставах, эозинофилия, крайне редко - анафилактический шок, тошнота, рвота, кандидоз полости рта, вагинальный кандидоз, кишечный дисбактериоз, колит, вызываемый *Clostridium difficile*. Было отмечено, что антибиотики могут отрицательно влиять на процесс пищеварение в желудке и кишечнике, увеличивая опасность дисбактериоза [29].

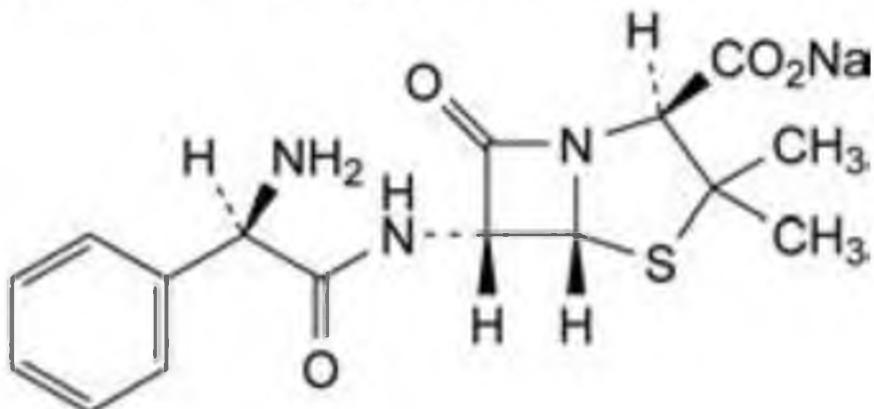
Таким образом, литературные данные свидетельствуют о том, что антибиотики занимает ведущее место в группе β -лактамидов по противоинфекционному действию, обладает хорошей переносимостью, наиболее широко применяется в лечении различных инфекционных заболеваний [75].

1.6. Строение и синтез.

МНН: ампициллин

Эмпирическая формула: C₁₆H₁₈N₃NaO₄S

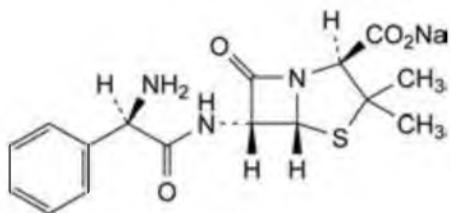
Относительная молекулярная масса: 371,4



Химическое название: натриевая соль (2S,5R,6R)-6{[(2R)-2-амино-2-фенилацетил] амино]-3,3-диметил-7-оксо-4-тиа-1-азабицикло[3.2.0]гептан-2-карбоксилата.

Синтез ампициллина натрия может проходить несколькими путями [19, 73].

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к усовершенствованию технологии получения полусинтетического пенициллина ампициллина (α -аминобензилпенициллина) формулы:



Известны способы получения ампициллина натрия ацилированием 6-аминопеницилановой кислоты (6-АПК) производным фенилглицина, активированным по карбоксильной группе (галогенангидридом или смешанным ангидридом) в водоорганическом растворе при охлаждении.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому экономическому эффекту к предлагаемому способу получения ампициллина

натрия являются методы ацилирования 6-АПК смешанным ангидридом N-замещенного дикарбонильного производного фенилглицина заключающиеся в том, что водноацетоновый раствор соли 6-АПК смешивается с ацетоновым раствором ацилирующего агента при температуре от -10 до -45оС.

Недостатками данных методов являются. Низкий выход ампициллина, не превышающий 80% от 6-АПК. В описанных условиях процесс ацилирования сопровождается разогревом реакционной массы и местными перегревами, особенно сильными в производственных условиях. С повышением температуры снижается эффективность защиты аминогруппы фенилглицильного остатка, увеличивается количество свободных аминогрупп, которые вступают в конкурирующую реакцию ацилирования, уменьшая степень превращения 6-АПК в ампициллин; наличие в готовом продукте олигомерных форм ампициллиноподобных веществ; высокие энергозатраты на охлаждение исходных растворов до рабочих температур.

Целью изобретения является увеличение выхода и качества ампициллина и снижение энергозатрат. Настоящая цель достигается за счет того, что в ледяную суспензию водно-ацетонового раствора соли 6-АПК в течение определенного времени приливается ацетоновый раствор производного фенилглицина, активированного по карбоксильной группе. Для этого получают водно-ацетоновый раствор соли 6-АПК с таким соотношением ацетон:вода, чтобы температура замерзания раствора была на 5-20оС выше температуры хладагента, которым охлаждаются растворы реагентов перед ацилированием. Охлаждают полученный раствор соли 6-АПК до температуры на 3-10оС ниже температуры начала его замерзания, при этом образуется лед-водно-ацетоновый раствор соли 6-АПК, из-за накопления ледяной фазы в суспензии ее температура остается практически постоянной, не снижается разность температур хладагент-суспензия, не снижается коэффициент теплопередачи, что, по сравнению с прототипами, приводит к снижению энергозатрат. Известными методами получают ацетоновый раствор производного фенилглицина, активированного по карбоксильной группе, охлаждают его до температуры от -10 до -30оС (в зависимости от температуры

используемого хладагента) и в течение 2-4 мин приливают в ледяную суспензию водно-ацетового раствора 6-АПК. При этом изменение соотношения ацетон:вода в ледяной суспензии приводит к интенсивному таянию ледяной фазы, поэтому процесс ацилирования, при котором тепло выделяется, протекает одновременно с процессом таяния льда, при котором тепло поглощается. Предлагаемая схема синтеза позволяет исключить разогрев и местные перегревы реакционной массы на стадии ацилирования и, в том числе, получить реакционную массу с температурой ниже температуры используемого хладагента, что приводит к повышению выхода и качества ампициллина. Пример. 16,4 г 6-АПК (в 100% исчислении) суспендировать в 125 мл воды, подщелочить суспензию раствором аммиака до значения pH 8,2-8,4, к полученному раствору прилить 80 мл ацетона, охладить до температуры от -22 до -24°C. Во время охлаждения при температуре -17°C раствор начинает замерзать и по мере дальнейшего охлаждения ледяная суспензия густеет. 26,25 г калиевой соли N-(1-метил-2-этоксикарбонилвинил) Д(-) α-аминофенилуксусной кислоты суспендировать в 239 мл ацетона, охладить до температуры от -25 до -28°C, прилить к смеси 6,6 мл (в 100% исчислении) метилхлорформиата и 3,4 мл 1%-ного раствора в ацетоне N,N-диметилбензиламина, перемешать 45 мин, поддерживая температуру от -25 до -28°C, после чего перелить полученную смесь в течение 2-4 мин в ледяную суспензию раствора аммониевой соли 6-АПК. При этом температура реакционной массы снижается на 4-6°C. Перемешивать смесь 20 мин, после чего подогреть до -10°C и прилить 10% -ный раствор соляной кислоты до значения pH 2,5-3,2, прилить 400 мл хлористого метиlena, подкислить смесь 10% раствором соляной кислоты до значения pH 1,5-2,0, отделить верхний водяной слой раствор хлоргидрата ампициллина, подщелочить его 10% -ным раствором едкого натра до значения pH 4,5-5,0, при этом выпадает осадок ампициллина тригидрата, перемешивать суспензию 5-10 ч при 0-5°C, после чего отфильтровать выпавшие кристаллы, промыть их 80 мл ацетона, высушить до постоянного веса. Вес ампициллина тригидрата 26,3 г, выход от исходной 6-АПК 85%.

Отличительными признаками предлагаемого способа являются следующие:

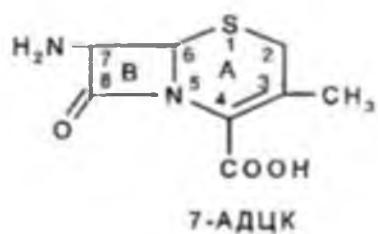
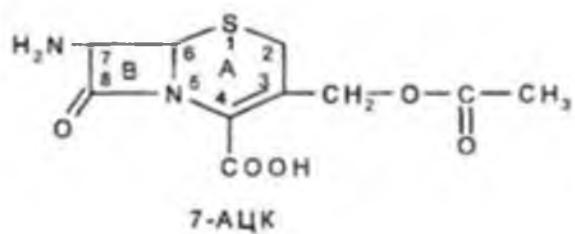
- на стадии ацилирования ацетоновый раствор производного фенилглицина, активированного по карбоксильной группе, приливается к суспензии лед-водно-ацетоновый раствор соли 6-АПК;

- ледяную суспензию водно-ацетонового раствора соли 6-АПК получают замораживанием, для чего при приготовлении раствора соли 6-АПК используют такое соотношение ацетон: вода, чтобы температура начала его замерзания была на 5-20оС выше температуры используемого хладагента.

Ампициллин натрия - порошок белого цвета, горький на вкус. Легкорастворим в воде, умеренно растворим в ацетоне, практически нерастворим в жирных маслах и вазелиновом масле [47, 57].

Структура и свойства цефалоспоринов.

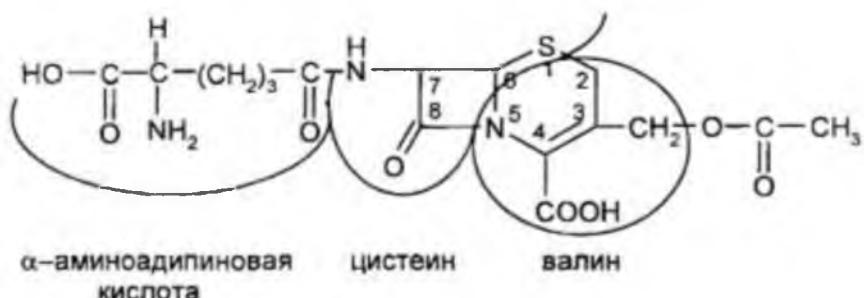
В основе строения природных и полусинтетических цефалоспоринов лежат 7-аминоцефалоспорановая кислота (7-АЦК) и 7-аминодезацетоксицефалоспорановая кислота (7-АДЦК), которые состоят из двух конденсированных колец: (3-лактамного (B) и метадигидротиазинового (A)):



Цефалоспорины являются ацильными производными 7-АЦК или 7-АДЦК.

В 1948 году было установлено, что изолированная Brotru культура относится к виду *Cephalosporium Salmosynnematum* и что она продуцирует 7 различных антибиотиков, одним из которых является цефалоспорин С.

Цефалоспорин С является трипептидом (состоит из валина, цистеина и α -аминоадипиновой кислоты):



Цефалоспорин С

Сам цефалоспорин С не нашел широкого применения в качестве антибактериального средства. Ферментативное удаление боковой цепи (α -аминоадипиновой кислоты) приводит к образованию 7-аминоцефалоспорановой кислоты (7-АДК), из которой путем химического ацилирования хлорангидридами кислот можно получить различные полусинтетические цефалоспорины, примером которых является цефалотин (1962 г.).

При отщеплении ацетоксигруппы в положении 3 молекулы цефалоспорина С образуется 3-дезацетоксицефалоспорин С (имеет 20% активности цефалоспорина С). При удалении из 3- дезацетоксицефалоспорина С остатка α -аминоадипиновой кислоты образуется 7-аминодезацетоксицефалоспорановая кислота (7-АДЦК). Она может быть получена и из 7-АДК при удалении ацетоксигруппы из положения 3.

На основе 7-АДЦК также получен ряд полусинтетических препаратов, например, цефалексин.

Кроме того, микробиологическая активность отдельных цефалоспориновых антибиотиков, полученных путем химической модификации природной молекулы, определяется типом дополнительно введенных заместителей [24, с.5-8; 25, с.904; 26, с.159; 27].

Таблица 3

Структура цефалоспоринов

МНН	Структурная формула	Химическое название
Цефотаксим		(6R,7R)-3-[(ацетилокси)метил] -7-[[[(Z)-2-(2-аминотиазол-4-ил)-2-(метоксиимино)ацетил]амино]-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло [4.2.0] -окт-2-ен-2-карбоновая кислота
Цефалексин		7(В-α-Аминофенил-ацетамидо)-3 -метил-3 -цефем-4-карбоновой кислоты моногидрат
Цефоперазон		(6R,7R)-7-[[[(4-этил-2,3-диоксопиперазин-1-ил)карбонил]амино]-2-(4-гидроксифенил)ацетил]амино]-3-[[[(1-метил-1Н-тетразол-5-ил)сульфанил]метил]-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло-[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоксилат натрия
Цефуроксим		(1RS)-1-[(ацетил)окси]этил(6R,7R)-3-[(карбамоилокси)метил]-7-[[[(Z)-2-(фuran-2-ил)-2-(метоксиимино)ацетил]амино]-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло [4.2.0] -окт-2-ен-2-карбоксилат натрия
Цефтриаксон		(Z)-(6R,7R)-7-[2-(2-амино-1,3-тиазол-4-ил)-2-(метоксиимино)ацетамидо]-8 -оксо-3-[(2,5-дигидро-2-метил-6-оксио-5-оксо-1,2,4-тиазин-3-ил)тиометил]-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0] окт-2-ен-2-карбоксилат натрия

Цефаклор		(6R,7R)-7-[(2R)-2-amino-2-phenylacetyl]amino]-3-chloro-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxylic acid monohydrate
Цефтазидим		(6R,7R)-7-[(Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-[(1-pyridinio) metil]-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilata pentahidrat
Цефиксим		(6R,7R)-7-[(Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-[(karboximetoksimino)-imino]-3-ethenil-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxylic acid trihydrate
Цефадроксил		(6R,7R)-7-[(R)-2-amino-2-(4-hidroksifenil)acetamido]-3-metil-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxylic acid monohydrate
Цефрадин		(6R,7R)-7-[(R)-2-amino-2-(ciklogexa-1,4-diienil)acetamido]-3-metil-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxylic acid
Цефотетан		(6R,7R)-7-(((4-(2-aminooxido-1-karboxi-2-oksositiilen)-1,3-ditiatan-2-il)karbonil)amino-7-metoksi-3-((1-metil-1H-tetrazol-5-il)thio)-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxylic acid
Цефазолин		(6R,7R)-[3-(5-Metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)tiometil)-8-oxo-7-(2-1-tetrazol-1-il-acetamido)-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-en-2-carboxilat natriya

Цефалотин		(6R,7R)-3-ацетилоксиметил-8-оксо-7-[2-(тиофен-2-ил)-ацетил] амино]-5 -тиа-1-азабицикло[4.2.0]-окт-2-ен-2-карбоксилат натрия
Цефамандол		(6R,7R)-7-[(2R)-2-(формилокси)-2-фенилацетил] амино]-3-[(1-метил-1 Н-тетразол-5-ил)сульфанил]-метил]-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло[4.2.0]окт-2-ен-2-карбоксилат
Цефапирин		5 -тиа-1 -азабицикло-[4.2.0] окт-2-ен-2-карбоновая кислота, 3-[(ацетилокси)метил] - 8 -оксо-7-[(4-пиридинилтио)ацетил]амино] -натриевая соль,(6R-транс)

ГЛАВА 2.

2.1. Оборудование и аппаратура.

Для определения количественного содержания и посторонних примесей в субстанциях ампициллина натрия был использован высокоэффективный жидкостной хроматограф (ВЭЖХ) Agilent Technologies “HPLC 1260 Infinity” (США), состоящего из четырех канального насоса для создания градиента низкого давления, термостата колонок (СТО-10А), автоматического пробоотборника “AutoSampler”, инжектора, вакуум-дегазатора, диодо-матричного детектора. Обработку данных и запись хроматограмм осуществлена на персональном компьютере с помощью программного обеспечения OpenLAB версии 2.2.

Также, был использован для определения содержания остаточных органических растворителей в субстанциях ампициллина натрия, газожидкостной хроматограф (ГЖХ) Agilent Technologies “GC 7890” (США), состоящего из пламенно-ионизационного детектора, термостата колонок, автоматического пробоотборника “AutoSampler”. Оснащено с парофазной пробоотборником Agilent Technologies “GC 7610” (США). Обработку данных и запись хроматограмм осуществлена на персональном компьютере с помощью программного обеспечения OpenLAB версии 2.1.

Для контроля кислотности использовали pH-метр Mettler Toledo модели “S 220”.

Взятие навесок осуществлялось при помощи аналитических весов «Sartorius» CP-224S.

Для получения сверхчистой воды бидистиллированную воду дополнитель но очищено на установке «Sartorius».

Для получения азота высокоочищенного для ГЖХ был использован генератор азота “Peak” (чистота азота более 99,99%).

Для проведения микробиологических анализов (стерильность, микробиологическая чистота) были использованы автоклав (паровой стерилизатор), система мембранный фильтрация, термостаты, среды для посева, инструменты и стерильные посуды.

В качестве контрольно-измерительных приборов производственной системы использовано:

- Барометр-анероид М-67 (для измерения давлений комнаты);
- Гигрометр психрометрический ВИТ-2 (для измерения относительной влажности комнаты).

2.2. Материалы, реактивы и объекты анализа.

Хроматографические условия для определения посторонних примесей количественного содержания были подобраны следующим образом:

- Колонка: из нержавеющей стали, длина 250 мм, внутренний диаметр 4,6 мм, наполнитель октилсилилсиликагель для хроматографии, размер частиц 5 мкм;
- Подвижная фаза: 85 объема фазы А и 15 объемов фазы В.
- Скорость потока: 1,0 мл/мин;
- Температура колонки: комнатная.
- Объем вводимой пробы: 50 мкл.

В качестве стандартных веществ были использованы фармацевтические субстанции ЛВ, содержание основного вещества в которых не ниже 99%, отвечающие всем требованиям нормативной документации (НД); стандартные образцы согласно ЕР, USP и ВР; стандартные образцы фирм Fluca и Sigma Aldrich.

Для приготовления элюентов и в подготовке проб использованы растворители: ацетонитрил фирм Sigma Aldrich; метанол Sigma Aldrich; сверхчистая вода, полученная на установке Puris (Южная Корея) из бидистилированной воды; реактивы: соляная кислота, фосфорная кислота, калия дигидрофосфат, натрия гидрофосфат, натрия гидроксид не ниже "х.ч."

Хроматографические условия для определения содержания остаточных органических растворителей были подобраны следующим образом:

- Колонка: капиллярной колонкой из плавленого кварца длиной 30 м и внутренним диаметром 0,53 мм, покрытой неподвижной фазой, содержащей полицианопропилфенилсилоксана и

полиметилсилоксана 6% и 94% соответственно (DB – 624, Agilent Technologies, J&W Scientific);

- газ-носитель: азот;
- Скорость газа-носителя – 1 мл/мин;
- Температура устройства ввода проб - 180°C;
- Температура детектора - 250°C;
- Объем вводимой пробы: 1 мкл.

В качестве стандартных веществ были использованы фармацевтические субстанции ЛВ, содержание основного вещества в которых не ниже 99%, отвечающие всем требованиям нормативной документации (НД); стандартные образцы согласно ЕР, USP и ВР; стандартные образцы фирм Fluca и Sigma Aldrich.

Для приготовления испытуемых растворов и в подготовке проб использованы растворители: хлороформ фирм Sigma Aldrich; дихлорметан Sigma Aldrich; сверхчистая вода, полученная на установке Puris (Южная Корея) из бидистилированной воды.

При выполнении работы была использована субстанция ампициллина натриевая соль.

Используемые органические растворители при необходимости подвергали дополнительной очистке по известным методикам [138,140].

Экспериментальные результаты статистически обрабатывались по известным методикам [141,142]. По полученным экспериментальным данным рассчитывали среднее арифметическое значение X_3 , стандартное отклонение S, относительное стандартное отклонение S_r и ошибку среднего квадратического отклонения S_s , используя следующие формулы:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{n=1}^n X_1}{n}; \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^n (X_1 - \bar{X})^2}{n-1}}; \quad S_r = \frac{S}{\bar{X}}; \quad S_s = \frac{S}{\sqrt{2n}} \quad (2.1)$$

Для выбора доверительного интервала среднего арифметического значения доверительную вероятность распределения принимали Р=0,95.

Результат представляли в виде $\bar{X} \pm \delta$, где $\delta = \frac{st}{\sqrt{n}}$ (2.2)

Статистическая обработка экспериментальных данных производилась с помощью компьютерной программы Excel.

Достоверность результатов аналитического определения подтверждается совокупностью параметров валидации, а именно: определением пригодности хроматографической системы, а также установлением критериев специфичности, правильности, точности, стабильности, линейности, диапазона количественного определения, предела детектирования и предела количественного определения [142].

2.3. Методы и техника эксперимента

ВЭЖХ

Подвижная фаза: 85 объема фазы А и 15 объемов фазы В.

- подвижная фаза А: к 0,5 мл кислоты уксусной разведенной прибавляют 50 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата, 50 мл ацетонитрила и доводят водой до объема 1000 мл;
- подвижная фаза В: к 0,5 мл кислоты уксусной разведенной прибавляют 50 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата, 400 мл ацетонитрила и доводят водой до объема 1000 мл;

В качестве сильного растворителя подвижной фазы использовали ацетонитрил, метанол или смесь ацетонитрила и метанола в соотношении 50/50 по объему. Требуемое значение соотношения элюентов по объему достигали непосредственно в камере смешения насосов хроматографов.

Скорость потока элюента при всех режимах была 1,0 мл/мин. Иные значения указаны в тексте диссертации.

Длины волн детектирования для каждого из определяемых соединений определяли на основе спектров полученных на спектрофотометре, а также при использовании диодно-матричного детектора, и использовали литературные данные. В качестве аналитической выбирали длину волны максимума спектра поглощения вещества. Использовали режим переключения длин волн. В качестве оптимальной выбиралась длина волны в диапазоне от 254 нм для повышения селективности обнаружения, устранения возможных мешающих

влияний вспомогательных веществ, поглощающих в коротковолновой области, и уменьшения помех возникающих на базовой линии в случае использования градиентного режима элюирования. Выбирались и иные длины волн для решения следующих задач: общая длины волны для количественного анализа нескольких компонентов, для снижения интенсивности поглощения в случае превышения шкалы отклика детектора. Для повышения чувствительности отклика в случае веществ с низким коэффициентом экстинкции в максимуме поглощения и при малой концентрации удобнее использовать более интенсивное поглощение органических соединений в коротковолновой области спектра.

Температура колонки. Разделения выполнялись при комнатной температуре (20-25 $^{\circ}\text{C}$).

Объем вводимой пробы. Прибор фирмы Agilent Technologies оснащен автосamplerом (с точностью от 1 мкл до 100 мкл). Оптимальное введение пробы в хроматограф составляет с объемом 50 мкл.

ГЖХ

Условия проведения анализа.

- 1) Прибор: газовый хроматограф фирмы «Agilent Technologies» с программированием температуры, снабженный:
 - а) инжектором со стеклянной вставкой, препятствующей контакту пробы с металлическими поверхностями, который обеспечивает работу в режимах «с расщеплением потока» и «без расщепления потока»;
 - б) пламенно-ионизационным детектором;
 - в) капиллярной колонкой из плавленого кварца длиной 30 м и внутренним диаметром 0,53 мм, покрытой неподвижной фазой, содержащей полицианопропилфенилсилоксана и полиметилсилоксана 6% и 94% соответственно (DB – 624, Agilent Technologies, J&W Scientific);
 - г) газ-носитель: азот.

- 2) Приготовление испытуемой пробы. 0,100 г испытуемого образца и 1 мл воды помещали во флакон, закупорили инертной крышкой и обвализовали алюминиевым колпачком.

3) Приготовление раствора рабочего стандартного образца (РСО). 0,200 г РСО метилен хлористого, N,N-диметиланилина, 2-этилгексановой кислоты растворяли в воде и доводили объем раствора этим же растворителем до 100 мл. 5,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл доводили объем раствора водой до метки и перемешали. Для испытания 1 мл этого раствора помещали во флакон, закупорили инертной крышкой и обвализовали алюминиевым колпачком.

4) Методика.

А. Условия хроматографирования для определения дихлорметана:

- Газ-носитель – азот;
- Деление потока - 5:1;
- Скорость газа-носителя – 1 мл/мин;
- Температура устройства ввода проб - 180°C.
- Температура детектора - 250°C.
- Температуру колонку программируют: поддерживают температуру колонки 40°C в течение 15 мин, затем повышают температуру до 200°C со скоростью 10°C/мин, температуру 200°C выдерживают в течение 5 мин.

Условия для парофазного пробоотборника:

- Температура термостата - 80°C;
- Время терmostатирования – 30 мин;
- Температура блока ввода пробы - 85°C;
- Температура линии переноса - 85°C;
- Время подачи газа-носителя – 30 сек.

В. Условия хроматографирования для определения N,N-диметиланилина:

- Газ-носитель – азот;
- Деление потока - 10:1;
- Скорость газа-носителя – 0,5 мл/мин;
- Температура устройства ввода проб - 250°C.
- Температура детектора - 260°C.

- Температуру колонку программируют: поддерживают температуру колонки 180°C в течение 15 мин, затем повышают температуру до 220°C со скоростью 10°C/мин, температуру 220°C выдерживают в течение 2 мин.

Условия для парофазного пробоотборника:

- Температура термостата - 120°C;
- Время терmostатирования – 20 мин;
- Температура блока ввода пробы - 120°C;
- Температура линии переноса - 100°C;
- Время подачи газа-носителя – 30 сек.

С. Условия хроматографирования для определения 2-этилгексановой кислоты:

- Газ-носитель – азот;
- Деление потока - 5:1;
- Скорость газа-носителя – 1,5 мл/мин;
- Температура устройства ввода проб - 250°C.
- Температура детектора - 270°C.
- Температуру колонку программируют: поддерживают температуру колонки 200°C в течение 12 мин, затем повышают температуру до 220°C со скоростью 10°C/мин, температуру 220°C выдерживают в течение 5 мин.

Условия для парофазного пробоотборника:

- Температура термостата - 120°C;
- Время терmostатирования – 20 мин;
- Температура блока ввода пробы - 120°C;
- Температура линии переноса - 100°C;
- Время подачи газа-носителя – 30 сек.

2.4. Требования к качеству субстанции ампициллина натрия.

Лекарственное вещество «Ампициллина натрия» (Ampicillin sodium) описан в ведущих зарубежных фармакопеях - Фармакопее США 23 издания (Национальный формулляр 18, 6-й выпуск), 24, 25, 26 и 27 издания [125 - 129], Британской фармакопее 1993 года (Дополнения 1994 года и 1996 года), 1998

года, 2001 года и 2003 года [79 - 83], Европейской фармакопеи 8-го издания [89], Японской фармакопеи 17 издания [124]. Министерством здравоохранения Российской Федерации к 2005 году зарегистрировано 7 субстанций ампициллина натрия, производящихся в Польше, Индии, Израиле, Испании, и более 400 препаратов, содержащих ампициллин натрия в качестве активного ингредиента, производимых отечественными и зарубежными фармацевтическими предприятиями [65].

Фармакопея США 23, 24, 25, 26 и 27 издания предъявляет одинаковые требования к субстанции ампициллина натрия. Британская Фармакопея 1993 года (Дополнение 1996), 1998 года, 2001 и 2003 года и Европейская фармакопея также устанавливают единый уровень требований, поэтому далее при ссылках на Фармакопеи США и Британии подразумеваются последние издания.

Согласно описанию, приводимому в фармакопеях Британии 1993 года, 2003 года, Европы, Японии, ампициллин натрия представляет собой белый или почти белый порошок, гигроскопичен. В Фармакопее США 23 и 24 издания описание и растворимость субстанции не приводились. По требованиям Фармакопеи США 25, 26 и 27 издания ампициллин натрия - белый или почти белый гигроскопичный порошок. Сравнительный анализ НД на субстанцию ампициллина натрия показал, что для идентификации используется комплекс химических, физико-химических и физических методов:

- ИК-спектроскопия включена в Фармакопею США 27 издания, Британскую фармакопею 1993 года и 2003 года, Европейскую фармакопею, Японскую фармакопею и во все НД зарубежных фирм-производителей;
- Тонкослойная хроматография (ТСХ) включена в Британскую фармакопею 2003 года, Европейскую фармакопею и в НД на субстанцию, производимую в Польше;
- Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) включена в Фармакопею США 27 издания;

Качественные реакции:

■ На натрий:

образование белого кристаллического осадка при взаимодействии с метоксифенилуксусным реагентом, растворимого в растворе аммиака, (реакция Б) - включена в Британскую (2003 года) и Европейскую фармакопеи;

окрашивание пламени в желтый цвет - включена в Фармакопею США 27 издания и во все НД на зарубежные субстанции;

образование белого кристаллического осадка при взаимодействии с калия пироантимонатом - включена в Британскую фармакопею 1993 года, в Японскую фармакопею и в НД 1995 года на субстанцию индийской фирмы-производителя. Кроме того, в Японскую фармакопею включена реакция образования темно-красного окрашивания при взаимодействии с азотной кислотой [22].

■ На ампициллин: 2 мг испытуемого образца помещают в пробирку длиной около 150 мм и диаметром около 15 мм. Увлажняют 0,05 мл воды, прибавляют 2 мл раствора формальдегида в серной кислоте и встряхивают. Раствор практически бесцветный. Пробирку выдерживают в водяной бане в течение 1 мин. Появляется темно-желтое окрашивание.

Согласно требованиям Британской (2003 года) и Европейской фармакопеи, достаточными для установления подлинности ампициллина натрия являются либо ИК-спектроскопия и качественная реакция на натрий с метоксифенилуксусным реагентом (реакция Б), либо сочетание ТСХ и качественных реакций (окрашивание раствора в темно-синий цвет с образованием синего осадка при взаимодействии со смесью растворов калия феррицианида и железа окисного хлорида в среде хлористоводородной кислоты и реакция Б на натрий. В фармакопеях Японии и США и НД зарубежных фирм все включенные тесты являются обязательными.

Фармакопея США 27 издания, Европейская фармакопея и Британская фармакопея 2003 года сравнивают ИК-спектр вещества со спектром фармакопейного стандартного образца ампициллина натрия, снятым в тех же условиях. В Британской фармакопее 1993 года издания (Дополнение 1994) при испытании на подлинность методом ИК-спектроскопии было предусмотрено

сравнение спектра испытуемого образца с рисунком стандартного ИК-спектра. В Японской фармакопее при описании метода ИК-спектроскопии при определении подлинности вещества указаны конкретные значения длин волн максимумов поглощения. В нормативной документации зарубежных фирм ИК-спектр препарата оценивается по соответству ИК-спектру стандарта ампициллина натрия, при этом методики предусматривают использование стандартных образцов фирм.

Подтверждение подлинности лекарственного вещества методом ТСХ с использованием стандарта ампициллина натрия описано в фармакопеях Британии 2003 года, Европы и НД зарубежных фирм. Только Фармакопея США 27 издания предусматривает использование метода ВЭЖХ для идентификации ампициллина натрия в ходе проведения испытаний на посторонние примеси по сопоставлению времен удерживания пиков на хроматограмме испытуемого раствора и раствора, содержащего стандарт ампициллина натрия.

Показатель «Растворимость», как обязательный параметр качества, включен в монографии на ампициллин натрия Британской фармакопеей 2003 года, Европейской и Японской фармакопеи, в отечественную и зарубежную нормативную документацию. Зарубежные фармакопеи (Британии 1993 года и 2003 года, Европы) характеризуют ампициллин натрия как легко растворим в воде, умеренно растворим в ацетоне, практически нерастворим в жирных маслах и вазелиновом масле. Требования Японской фармакопеи несколько отличаются: препарат должен быть очень легко растворим в воде и умеренно растворим в этаноле. Требования по данному показателю, включенные в НД зарубежных фирм, соответствуют приведенным в фармакопеях Британии 1993 и 2003 года, Европейской фармакопеи и Японской фармакопеи.

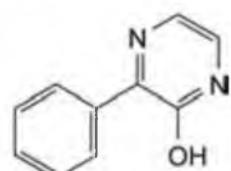
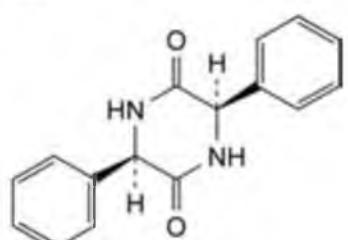
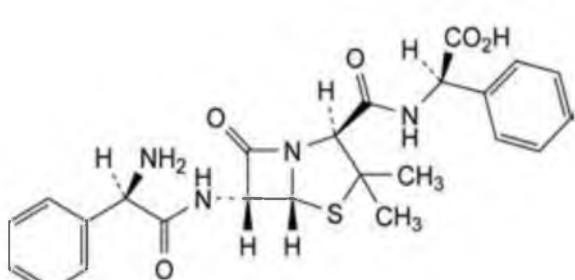
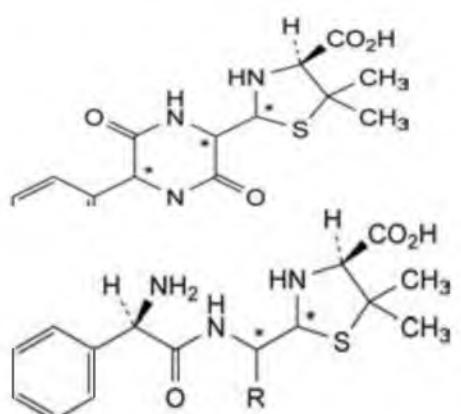
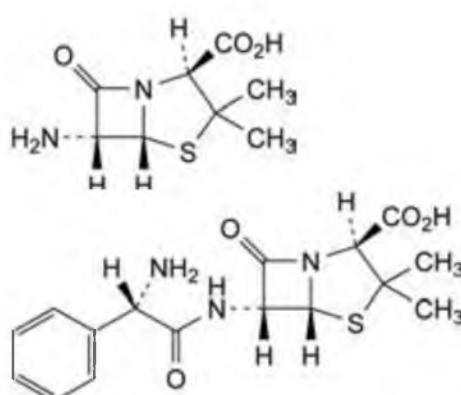
Другим показателем качества ампициллина натрия является оптическая плотность (цветность) раствора. В Фармакопее США 27 издания, Европейской фармакопеи и Британской фармакопеи 2003 года, оценка цветности проводится спектрофотометрическим методом при длине волны 430 нм (норма не более

0,15). В Японской фармакопее определение этого показателя проводится при длине волны 400 нм (норма не более 0,4).

Прозрачность предписывается определять так, 1,0 г испытуемого образца помещают в коническую колбу и медленно прибавляют при постоянном перемешивании 10 мл 1 М раствора кислоты хлористоводородной (раствор А), 1,0 г испытуемого образца растворяют в воде и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем (раствор В), сразу после приготовления растворы А и В по степени мутности не должны превышать эталон II. По требованиям зарубежных фармакопеи и нормативной документации фирм-производителей раствора препарата должен быть прозрачным. Однако следует отметить, что прозрачным по Британской и Европейской фармакопее считается раствор, не превышающий по степени мутности растворитель, воду или эталонную супензию II.

В фармакopeях Британии 1993 и 2003 года, Европейской фармакопее, Японской фармакопее и Фармакопее США 27 издания, зарубежных производителей для определения посторонних примесей в субстанции ампициллина натрия используется метод ВЭЖХ. В Европейской фармакопее, Британской фармакопее 1993 и 2003 года, Японской фармакопее и нормативных документах зарубежных фирм в качестве растворов сравнения используются разведения испытуемого раствора препарата. В Фармакopeях Британии 2003 года, Европы и США (27 издания), нормативной документации Польши и Индии (утвержденных в 2001 году) содержание сумма примесей должна быть не более 2 %. В НД зарубежных фирм, которые были утверждены во время действия Британской фармакопеи 1993 (Дополнение 1994), содержание димера ампициллина нормируется не более 4,5 %, а сумма примесей - не более 2,0 %. В монографии Японской фармакопеи суммарное содержание примесей не регламентируется. В монографиях других зарубежных фармакопеи (Британии 1993 и 2003 года, Европы и Японии) и в нормативных документах фирм идентификация отдельных примесных соединений не предусмотрена. Более подробные требования к определению

содержания посторонних примесей в субстанции ампициллина натрия будут изложены в следующей главе. Известные примеси ампициллина натрия.



A. (2S,5R,6R) -6-Амино -3,3-диметил -7-оксо -4-тиа -1-азабицикло [3.2.0] гептан -2-карбоновая кислота (6-аминопеницил -лановая кислота).

B. (2S,5R,6R) -6- [[(2S) -2-Амино -2-фенил -ацетил] амино] -3,3-диметил -7-оксо -4-тиа -1-азабицикло [3.2.0] гептан -2-карбоновая кислота (L-ампициллин).

C. (4S)-2-(3,6-Диоксо-5-фенилпиперазин-2-ил) -5,5-диметилтиазолидин-4-карбоновая кислота (дикетопиперазины ампициллина).

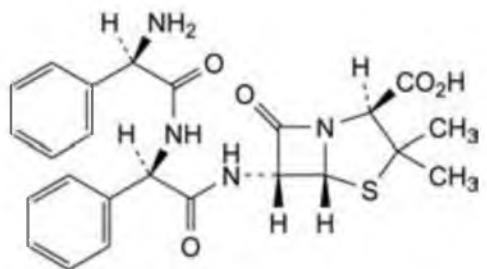
D. R = CO₂H: (4S)-2-[[[(2R)-2-Амино-2-фенил -ацетил] амино] карбоксиметил] -5,5-диметил -тиазолидин -4-карбоновая кислота (пенициллановые кислоты ампициллина).

F. R = H: (2RS,4S)-2-[[[(2R)-2-Амино-2-фенил -ацетил] амино]метил]-5,5-диметилтиазолидин-4-карбоновая кислота (пенициллановые кислоты ампициллина).

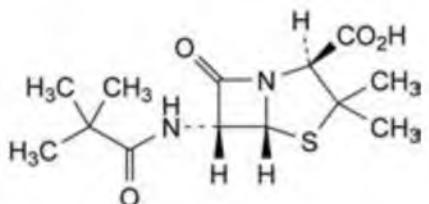
E. (2R)-2-[[[(2S,5R,6R)-6-[(2R)-2-Амино -2-фенил- ацетил] амино] -3,3-диметил -7-оксо -4-тиа-1- азабицикло [3.2.0] гепт-2-ил] карбонил] амино]-2-фенилуксусная кислота (ампициллинил -D-фенилглицин).

G. (3R,6R)-3,6-Дифенилпиперазин-2,5-дион.

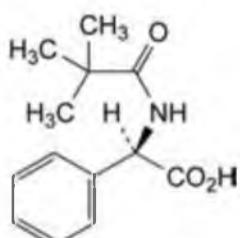
H. 3-Фенилпиразин-2-ол.



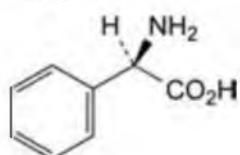
I. (2S,5R,6R)-6-[(2R)-2-[(2R)-2-(D-фенилглицилампициллин).



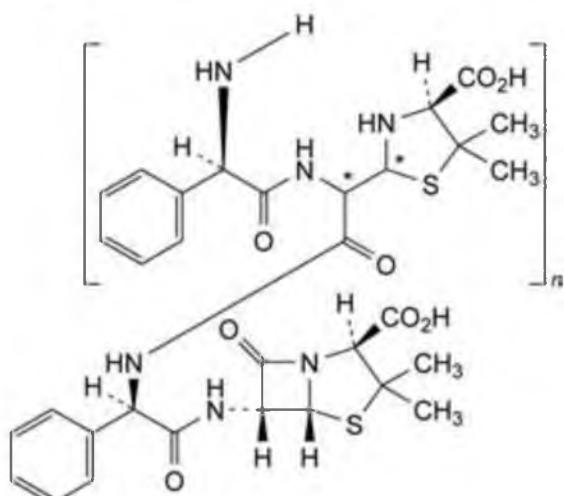
J. (2S,5R,6R)-6-[(2,2-Диметилпропаноил)амино]-3,3-диметил-7-оксо-4-тиа-1-азабицикло[3.2.0]гептан-2-карбоновая кислота.



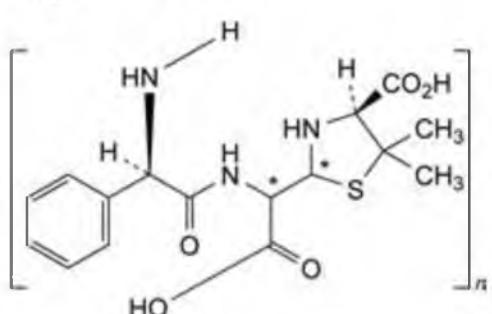
K. (2R)-2-[(2,2-Диметилпропаноил)амино]-2-фенилуксусная кислота.



L. (2R)-2-Амино-2-фенилуксусная кислота (D-фенилглицин).



M. Со-олигомеры ампициллина и пенициллановых кислот ампициллина.



N. Олигомеры пенициллановых кислот ампициллина.

Одним из гарантов безопасности субстанции является контроль содержания остаточных органических растворителей, если они используются в технологическом процессе получения препарата. Требования к качеству ампициллина натрия по данному показателю, включенные в рассматриваемую в данном разделе нормативную документацию, будут изложены в главе 2 практической части этой работы.

Во всех зарубежных фармакопеях и НД зарубежных производителей для количественного определения субстанции ампициллина натрия используется метод ВЭЖХ. Содержание ампициллина натрия согласно требованиям Британской фармакопеи 1993 и 2003 года, Европейской фармакопеи и документации, представленной индийскими производителями и утвержденной в 2001 году, составляет не менее 91,0 % и не более 102,0 % (в пересчете на сухое вещество). В Японской Фармакопее для нижнего предела содержания установлены менее жесткие требования – 850 мкг/мг в пересчете на сухое вещество.

Таким образом, анализ соответствующих статей зарубежных фармакопеи и НД показывает, что постоянно совершенствуются методы оценки качества субстанции ампициллина натрия, в настоящий момент установлены более жесткие требования к качеству лекарственного вещества. Разработаны фармакопейные стандартные образцы (Британская фармакопея 2003 года, Европейская фармакопея, Фармакопея США 27 издания) ампициллина натрия, используемые в анализе данной субстанции: при подтверждении подлинности методами ИК-спектроскопии, ТСХ, ВЭЖХ. При оценке цветности раствора препарата рекомендуется использовать метод спектрофотометрии вместо сопоставления раствора препарата с эталоном. Более жесткие требования предъявляются к содержанию допустимых примесей в препарате и содержанию самого ампициллина натрия.

Можно отметить, что качество субстанций ампициллина натрия, регистрируемых в Российской Федерации зарубежными фирмами и производимых отечественными предприятиями, в целом соответствует

уровню требований ведущих зарубежных фармакопеи. В то же время представляется целесообразной разработка Государственного стандартного образца ампициллина натрия и утверждение нормативной документации (фармакопейной статьи), регламентирующей его качество, что позволило бы осуществлять контроль качества препаратов ампициллина натрия на уровне, предусмотренном ведущими зарубежными фармакопеями.

целлюлозы 1500 выяснено, что в последнем случае создается более постоянная концентрация лекарственного вещества, близкая к максимальной, в результате чего быстрее проявляется положительный терапевтический эффект [46].

2.4. Фармакопейные требования к качеству антибиотиков цефалоспоринового ряда.

Требования ВР 2013 к субстанциям цефалоспоринов соответствуют требованиям ЕР 8. Поэтому в дальнейшем при описании субстанций мы будем ссылаться только на ЕР, имея в виду, что в ВР содержится такая же информация. Рассмотрим только те показатели, которые имеют непосредственное отношение к исследованиям, проводимым в данной работе.

Описание и растворимость

Субстанции цефалоспоринов - белые или белые со слегка желтоватым оттенком (за счет возможного окисления метадигидротиазинового кольца) порошки. Кислотные формы медленно и мало растворимы в воде, натриевые соли - легко растворимы.

Подлинность

ЕР, USP и JP регламентируют при установлении подлинности сравнение ИК- и УФ-спектров испытуемой субстанции со спектрами стандартных образцов. JP при установлении подлинности регламентирует сравнение ИК- и УФ-спектров испытуемой субстанции со стандартными спектрами (находятся в приложении к JP).

В таблице 6 представлены методы установления подлинности лекарственных веществ цефалоспоринов, используемые различными фармакопеями.

Таблица 4

Установление подлинности лекарственных веществ цефалоспоринов

Лекарственное вещество	Фармакопеи		
	ЕР 8	USP 40	JP XVII
Цефазолина натриевая соль	ИК + КР на натрий	ВЭЖХ	УФ, ИК, ЯМР, КР на натрий
Цефоперазона натриевая соль	ИК, ВЭЖХ, КР на натрий	ВЭЖХ, КР на натрий	-
Цефалексин	ИК, ЖХ	ИК, УФ, тех	УФ, ИК, ЯМР
Цефалотина натриевая соль	ИК, КР* на натрий	УФ, КР на натрий	-
Цефамандола нафат	ИК, КР* на натрий	-	-
Цефотаксима натриевая соль	ИК, КР* на натрий	-	-
Цефтазидим натрия карбонат	ИК	ВЭЖХ	УФ, ИК, ЯМР
Цефтриаксона натриевая соль	ИК, КР* на натрий	ИК, ВЭЖХ	УФ, ЯМР, КР* на натрий
Цефуроксима натриевая соль	ИК, ВЭЖХ, КР* на натрий	ВЭЖХ, КР* на натрий	УФ, ИК, ЯМР, КР* на натрий
Цефаклор	ИК	-	-
Цефадроксил	ИК	-	-
Цефапирин	ИК + Реакции на натрий	-	-
Цефатризин пропилен гликоль	ИК + ВЭЖХ	-	-
Цефиксим	ИК	-	-
Цефокситин	ИК + Реакции на натрий	-	-
Цефрадин	ИК	-	-

* КР - качественная реакция.

* ЯМР - спектроскопия ядерного магнитного резонанса.

Удельное вращение

В таблице 7 представлены пределы нормы удельных вращений лекарственных веществ цефалоспоринов, используемые различными фармакопеями.

Таблица 5

Нормы удельных вращений лекарственных веществ цефалоспоринов

Лекарственное вещество	Фармакопеи	
	EP 8	JP XVII
Цефазолина натриевая соль	От - 15 ⁰ до - 24 ⁰	От - 19 ⁰ до - 23 ⁰
Цефоперазона натриевая соль	-	От - 15 ⁰ до - 25 ⁰
Цефалексин	От +149 ⁰ до +158 ⁰	От +144 ⁰ до +158 ⁰
Цефалотина натриевая соль	От +124 ⁰ до +134 ⁰	От +124 ⁰ до +134 ⁰
Цефамандола нафат	От - 35 ⁰ до - 45 ⁰	-
Цефотаксима натриевая соль	От +58 ⁰ до +64 ⁰	От +58 ⁰ до +64 ⁰
Цефтриаксона натриевая соль	От - 155 ⁰ до - 170 ⁰	От - 153 ⁰ до - 170 ⁰
Цефуроксима натриевая соль	От +59 ⁰ до +66 ⁰	-
Цефаклор	От +101 ⁰ до +111 ⁰	От +105 ⁰ до +120 ⁰
Цефадроксил	От +165 ⁰ до +178 ⁰	От +164 ⁰ до +182 ⁰
Цефапирин	От +150 ⁰ до +165 ⁰	-
Цефатризин пропилен гликоль	От +63 ⁰ до +69 ⁰	От +52 ⁰ до +58 ⁰
Цефиксим	-	От - 75 ⁰ до - 88 ⁰
Цефокситина натриевая соль	От +206 ⁰ до +214 ⁰	-
Цефрадин	От +80 ⁰ до +90 ⁰	-

рН растворов

В таблице 8 представлены пределы нормы рН растворов лекарственных веществ цефалоспоринов, используемые различными фармакопеями.

Таблица 6

Нормы рН растворов лекарственных веществ цефалоспоринов

Лекарственное вещество	Фармакопеи		
	EP 8	USP 40	JP XVII
Цефазолина натриевая соль	От 4,0 до 6,0	От 4,0 до 6,0	От 4,8 до 6,3
Цефоперазона натриевая соль	От 4,5 до 6,5	От 4,5 до 6,5	От 4,5 до 6,5
Цефалексин	От 4,0 до 5,5	-	-
Цефалотина натриевая соль	От 4,5 до 7,0	-	От 4,5 до 7,0
Цефамандола нафат	От 6,0 до 8,0	От 3,5 до 7,0	-
Цефотаксима натриевая соль	От 4,5 до 6,5	От 4,5 до 6,5	От 4,5 до 6,5
Цефтазидим натрия карбонат	От 5,0 до 7,5	-	-
Цефтриаксона натриевая соль	От 6,0 до 8,0	От 6,0 до 8,0	От 6,0 до 8,0
Цефуроксима натриевая соль	От 5,5 до 8,5	От 6,0 до 8,5	-
Цефаклор	От 3,0 до 4,5	От 3,0 до 4,5	-
Цефадроксил	От 4,0 до 6,0	От 4,0 до 6,0	От 4,0 до 6,0
Цефапирин	От 6,5 до 8,5	-	-
Цефатризин пропилен гликоль	-	-	-
Цефиксим	От 2,6 до 4,1	От 2,6 до 4,1	-
Цефокситина натриевая соль	От 4,2 до 7,0	От 4,2 до 7,0	-
Цефрадин	От 3,5 до 6,0	-	-

Потеря в массе при высушивании / Вода

Определение содержания воды в зарубежных фармакопеях проводится для всех цефалоспоринов, кроме цефтазидима натрия карбоната и цефотаксима натрия. Для последних определяют потерю в массе при высушивании путем сушки под вакуумом при температурах от 100 до 120 °C в течение 2-4 (до 6) часов (или до постоянной массы).

Определение содержания воды проводят для большинства субстанций цефалоспоринов по методу Карла Фишера.

В таблице 9 представлены соответствующие нормы.

Таблица 7

Нормы потери в массе при высушивании или содержания воды в субстанциях цефалоспоринов.

Лекарственное вещество	Фармакопеи		
	EP 8	USP 40	JP XVII
Цефазолина натриевая соль	Не более 6,0 %	Не более 6,0 %	Не более 2,5 %
Цефоперазона натриевая соль	Не более 5,0 %	-	Не более 1,0 %
Цефотаксима натриевая соль	Не более 3,0 %	Не более 3,0 %	Не более 3,0 %
Цефтазидим натрия карбонат	Не более 13,5 %	-	-
Цефтриаксона натриевая соль	От 8,0% до 11,0%	От 8,0% до 11,0%	От 8,0% до 11,0%
Цефуроксима натриевая соль	Не более 3,5 %	-	-
Цефаклор	От 3,0% до 6,5%	От 3,0% до 6,5%	Не более 6,5 %
Цефадроксил	От 4,0% до 6,0%	От 2,4% до 4,5%	От 4,2% до 6,0%
Цефиксим	От 9,0% до 12,0%	От 9,0% до 12,0%	От 9,0% до 12,0%
Цефокситина натриевая соль	Не более 1,0 %	Не более 1,0 %	-
Цефрадин	Не более 6,0 %	-	-

Посторонние примеси

Общая информация об органических примесях

Данный раздел известен как «Related Substances» или «Chromatographic Purity», и в отечественной НД его часто обозначают как «посторонние примеси», хотя речь, конечно, идет именно о соединениях, имеющих близкое с лекарственным веществом строение.

Определение некоторых особо важных примесей иногда выделяют в отдельные разделы, например, определение димера ампицилиина в ампициллине.

Таблица 8

Нормы родственных примесей в субстанциях цефалоспоринов

Лекарственное вещество	Фармакопеи		
	EP 8	USP 40	JP XVII
Цефазолина натриевая соль	Индивидуальная примесь – не более 1,0 %; Сумма примесей – не более 3,5 % (ВЭЖХ)	-	Индивидуальная примесь – не более 1,5 %; Сумма примесей – не более 2,5 % (ВЭЖХ)
Цефоперазона натриевая соль	Индивидуальная примесь – не более 1,5 %; Сумма примесей – не более 4,5 % (ВЭЖХ)	-	Индивидуальная примесь – не более 1,5 %; Сумма примесей – не более 5,0 % (ВЭЖХ)
Цефотаксима натриевая соль	Примеси A,B,C, D,E,F – не более 1,0 %; Индивидуальная примесь – не более 0,2 %; Сумма примесей – не более 3,0 % (ВЭЖХ)	Индивидуальная примесь – не более 1,0 %; Сумма примесей – не более 3,0 % (ВЭЖХ)	Индивидуальная примесь – не более 1,0 %; Сумма примесей – не более 3,0 % (ВЭЖХ)
Цефтазидим натрия карбонат	Примеси A,B,G – не более 0,2 %; Индивидуальная примесь – не более 0,1 %; Сумма примесей – не более 1,0 %; Примесь F – не более 0,3 %. (ВЭЖХ)	-	-
Цефтриаксона натриевая соль	Индивидуальная примесь – не более 1,0 %; Сумма примесей – не более 4,0 % (ВЭЖХ)	-	Индивидуальная примесь – не более 1,0 %. (ВЭЖХ)
Цефаклор	Индивидуальная примесь – не более 0,5 %; Сумма примесей – не более 2,0 %	Индивидуальная примесь – не более 0,5 %; Сумма примесей – не более 2,0 %	Индивидуальная примесь – не более 0,5 %; Сумма примесей – не более 1,0 %

	(ВЭЖХ)	(ВЭЖХ)	(ВЭЖХ)
Цефадроксил	Примесь А – не более 1,0 %; Индивидуальная примесь – не более 1,0 %; Сумма примесей – не более 3,0 %. (ВЭЖХ)	Примесь А – не более 1,0 %; Индивидуальная примесь – не более 1,0 %. (TCX)	Индивидуальная примесь – не более 1,0 %. (TCX)
Цефиксим	Индивидуальная примесь – не более 0,5 %; Сумма примесей – не более 3,0 %. (ВЭЖХ)	Индивидуальная примесь – не более 1,0 %; Сумма примесей – не более 2,0 %. (ВЭЖХ)	Индивидуальная примесь – не более 1,0 %; Сумма примесей – не более 2,5 %. (ВЭЖХ)
Цефрадин	Примеси А, В, С, D, E, F, G – не более 0,25 %; Индивидуальная примесь – не более 0,25 %; Сумма примесей – не более 2,0 %. (ВЭЖХ)	-	-

Цефалоспорины могут содержать, в частности, следующие посторонние примеси:

- изомерия положения заместителей;
- отсутствие метильной группы;
- отсутствие карбоксильной группы;
- образование сложных эфиров по карбоксильной группе.

В таблице 10 представлены нормы содержания посторонних примесей в субстанциях цефалоспоринов. Указано предельное содержание каждой отдельной примеси, суммы примесей и методы их определения.

В субстанции цефотаксима натрия, цефтазидима натрия карбоната и цефадроксила выделяют специфицированные примеси и другие детектируемые примеси (таблица 11). При этом согласно ЕР 8:

- специфицированная примесь (specified impurity) - примесь, для которой в данной фармакопейной статье указана структура (в списке примесей) и для

которой установлен специфический показатель качества (то есть предел содержания);

- другие детектируемые примеси (other detectable impurities) - примеси с известной структурой, которые могут детектироваться в указанной фармакопейной статье методикой, но обычно имеющие содержание ниже предела идентификации;
- для них устанавливается общий предел содержания.

Таблица 9

Описание отдельных примесей по ЕР

Цефотаксим натрия	
Примесь А	
Примесь В	
Примесь С	
Примесь D	
Примесь Е	

Примесь F	
Цефазидим натрия карбонат	
Примесь A	 and epimer at C*
Примесь B	
Примесь G	
Примесь F	
Цефадроксил	

Примесь А	
-----------	--

Содержание органических растворителей

Общая информация об остаточных органических растворителях

Данная общая фармакопейная статья устанавливает предельное содержание растворителей, которое может присутствовать в субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах в результате производственного процесса. Данная статья не распространяется на зарегистрированные лекарственные средства. Фармакопея применяет одни и те же принципы, описанные в ней к существующим субстанциям, вспомогательным веществам и готовым лекарственным средствам, независимо от того, являются они или нет объектом фармакопеи. Все субстанции, вспомогательные материалы и готовые лекарственные средства должны проверяться на содержание тех растворителей, которые могут в них присутствовать.

Если при производстве разрешено использование растворителя класса 1, то его предельное содержание должно устанавливаться в частной фармакопейной статье.

Обычно частные статьи не включают тесты по контролю остаточных растворителей, относящихся к классу 2, так как применяемые растворители могут меняться в зависимости от производителя. Компетентные уполномоченные органы должны быть информированы о растворителях, используемых в производстве. Эта информация должна приводиться в досье, которое подается для регистрации.

Если используются растворители класса 3, то для контроля их содержания можно применять тест «Потеря в массе при высушивании» или тест, указанный в частной статье. Если для растворителей класса 3 обосновано и разрешено предельное содержание более 0,5%, то тест, указанный в частной

статье, является обязательным. В этом случае расчеты ведутся с перерасчетом на безводное и свободное от остаточных растворителей вещество. Во всех случаях компетентные органы должны быть проинформированы об используемых растворителях класса 3.

Таблица 10

Нормы остаточных органических растворителей в субстанциях цефалоспоринов

Лекарственное вещество	Фармакопеи		
	EP 8	BP 2013	JP XVII
Цефазолина натриевая соль	N,N-Диметиланилин – не более 0,002%.	N,N-Диметиланилин – не более 0,002%.	-
Цефоперазона натриевая соль	Ацетон – не более 2,0%	Ацетон – не более 2,0%	-
Цефотаксима натриевая соль	Этанол – не более 2,0%; N,N-Диметиланилин – не более 0,002%; 2-Этилгексановая кислота – не более 0,5%.	Этанол – не более 1,0%; N,N-Диметиланилин – не более 0,002%; 2-Этилгексановая кислота – не более 0,5%.	-
Цефтриаксона натриевая соль	N,N-Диметиланилин – не более 0,002%; 2-Этилгексановая кислота – не более 0,8%.	N,N-Диметиланилин – не более 0,002%; 2-Этилгексановая кислота – не более 0,8%.	-
Цефаклор	-	-	-
Цефадроксил	N,N-Диметиланилин – не более 0,002%.	N,N-Диметиланилин – не более 0,002%.	-
Цефиксим	Этанол – не более 1,0%.	-	-

ГЛАВА 3.

РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ АМПИЦИЛЛИНА

Как следует из изложенного в главе обзора литературных данных, контроль на посторонние примеси включают все рассматриваемые нормативные документы, регламентирующие качество субстанции ампициллина натрия. Представлялась актуальной сравнительная оценка субстанций ампициллина натрия различных производителей, зарегистрированных в Узбекистане, с целью установления уровня содержания примесных продуктов. Для исследования были отобраны субстанции ампициллина натрия производства Индии и Китая, которые проходили разовую регистрацию в Республики Узбекистана, и для которых на момент разовой регистрации отсутствовала утвержденная в Республики Узбекистана нормативная документация, регламентирующая качество, а также образцы субстанций отечественного производства.

Материалы и методы исследования.

Для определения посторонних примесей в субстанции ампициллина натрия ведущими зарубежными фармакопеями и другой нормативной документацией предусмотрен метод ВЭЖХ. Хроматографические условия определения не имеют принципиальных различий (таблица 2), поэтому при выполнении исследования мы сочли возможным ориентироваться на условия, приведенные в монографии Европейской фармакопеи 8 издания на субстанцию ампициллина натрия.

Условия проведения анализа:

Прибор: ВЭЖХ-хроматограф, оснащенный насосом HPLC Pump Waters 501, детектором спектрофотометрическим переменно-волновым Lambda-Max Model 481, интегратором ellega series Carbo Erba instrumentazione.

Колонка: из нержавеющей стали, длина 250 мм, внутренний диаметр 4,6 мм, наполнитель окстилсилицикагель для хроматографии (end-capped), размер частиц 5 мкм;

Длина волны детектирования 254 нм;

Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин.

Подвижная фаза: 85 объема фазы А и 15 объемов фазы В.

– подвижная фаза А: к 0,5 мл кислоты уксусной разведенной прибавляют 50 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата, 50 мл ацетонитрила и доводят водой до объема 1000 мл;

– подвижная фаза В: к 0,5 мл кислоты уксусной разведенной прибавляют 50 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата, 400 мл ацетонитрила и доводят водой до объема 1000 мл;

– объем вводимой пробы: по 50 мкл растворов сравнения (b) и (c) хроматографируют изократически, используя соотношение подвижных фаз А и В начального времени градиента; по 50 мкл испытуемого раствора (b) и раствора сравнения (d) хроматографируют согласно программе градиента; 50 мкл подвижной фазы А хроматографируют согласно программе градиента в качестве контрольного опыта.

Испытуемый раствор (a). 31,0 мг испытуемого образца растворяют в подвижной фазе А и доводят до объема 50,0 мл этим же растворителем.

Испытуемый раствор (b). Раствор готовят непосредственно перед использованием. 31,0 мг испытуемого образца растворяют в подвижной фазе А и доводят до объема 10,0 мл этим же растворителем.

Раствор сравнения (a). 27,0 мг ФСО ампициллина безводного растворяют в подвижной фазе А и доводят до объема 50,0 мл этим же растворителем.

Раствор сравнения (b). 2,0 мг ФСО цефрадина растворяют в подвижной фазе А и доводят до объема 50 мл этим же растворителем. К 5,0 мл полученного раствора прибавляют 5,0 мл раствора сравнения (a).

Раствор сравнения (c). 1,0 мл раствора сравнения (a) доводят подвижной фазой А до объема 20,0 мл.

Раствор сравнения (d). К 0,20 г испытуемого образца прибавляют 1,0 мл воды Р и нагревают при температуре 60°C в течение 1 ч. 0,5 мл полученного раствора доводят подвижной фазой А до объема 50,0 мл.

Пригодность хроматографической системы: раствор сравнения (b):

– разрешение: не менее 3,0 между пиками ампициллина и цефрадина; при необходимости изменяют соотношение подвижных фаз А и В.

После соблюдения указанных условий вводили в хроматограф по 50 мкл испытуемых растворов и стандартных растворов. Регистрировали хроматограмму в течение 60 минут. На хроматограммах испытуемых растворов площадь любого пика, кроме основного пика и димера ампициллина, сравнивалась с 2-кратной площадью основного пика на хроматограмме раствора сравнения (с) (содержание любой единичной примеси не должно превышать 2,0 %). На хроматограмме испытуемого раствора (b) площадь пика, соответствующего димеру ампициллина, сравнивалась с 4,5-кратной площадью основного пика на хроматограмме раствора сравнения (с) (содержание димера ампициллина должно быть не более 4,5 %).

3.2. Результаты и их обсуждение.

В указанных выше условиях было проведено определение посторонних примесей в образцах ампициллина натрия. Получены хроматограммы испытуемых растворов, стандартных растворов и раствора для проверки пригодности хроматографической системы.

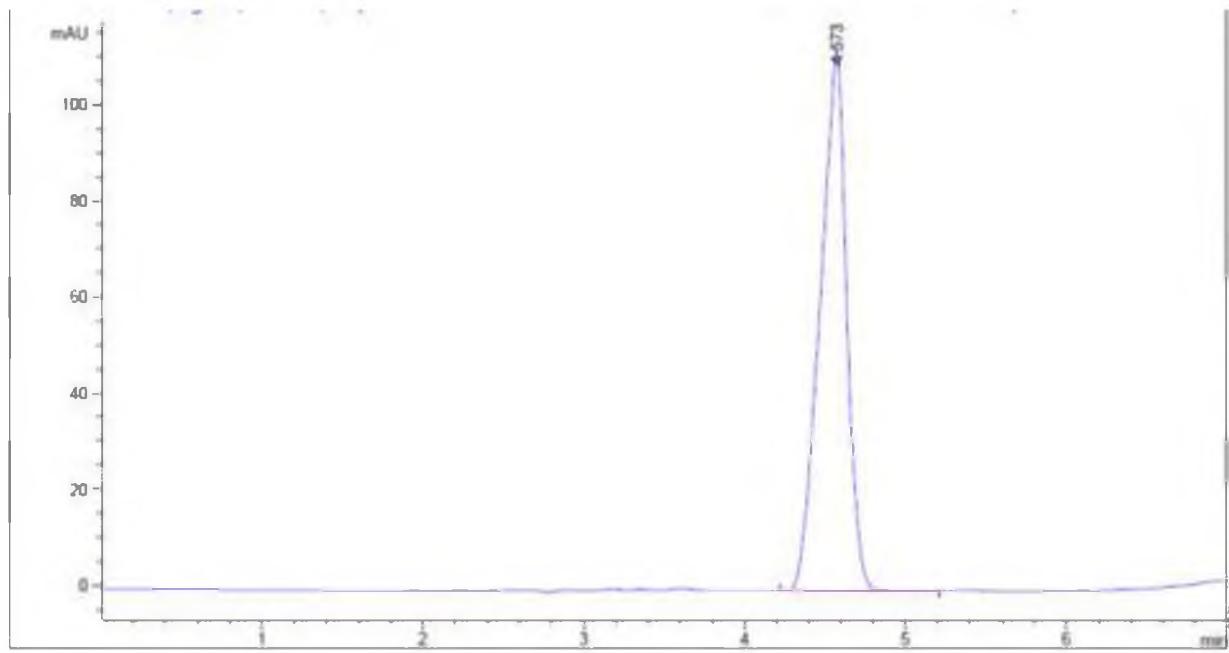


Рисунок 1. Хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы.

На рисунке 1 показано, что в предлагаемых условиях определения на хроматограммах раствора для проверки пригодности хроматографической системы, относительное стандартное отклонение полученных 6 хроматограмм ампициллина натрия составляет 0,42 %.

Таблица 11

Условия определения посторонних примесей в субстанции ампициллина натрия.

Параметры	EP 8,0 метод ВЭЖХ	ВР 2009 метод ВЭЖХ	JP XVII Метод ВЭЖХ.	ВР 2005 метод ВЭЖХ
Колонка	25 см x 4,6 мм с УФ-детектором (254 нм). Наполнитель C18 (октадецилсилильный), размером частиц 5 мкм	25 см x 4,6 мм с УФ-детектором (254 нм). Наполнитель C18 (октадецилсилильный), размером частиц 5 мкм	15 см x 4,6 мм с УФ-детектором (230 нм). Наполнитель C18 (октадецилсилильный), размером частиц 5 мкм	25 см x 4,6 мм с УФ-детектором (254 нм). Наполнитель C18 (октадецилсилильный), размером частиц 5 мкм
ПФ	Подвижная фаза: фаза А – фаза В (85:15). Скорость: 1 мл/мин	Подвижная фаза: фаза А – фаза В (85:15). Скорость: 1 мл/мин	Подвижная фаза: 5,94 г аммония гидрофосфата в 900 мл воды – ацетонитрил с pH=5,0 (900:100). Время удерживания ампициллина около 6 мин.	Подвижная фаза: фаза А – фаза В (85:15). Скорость: 1 мл/мин
Вводимый объем	50 мкл	50 мкл	10 мкл	20 мкл
Пригодность системы	На хроматограмме раствора сравнения (b) не менее 3,0 между пиками ампициллина и цефрадина.	На хроматограмме раствора сравнения (b) не менее 3,0 между пиками ампициллина и цефрадина.	Относительное стандартное отклонение полученных 6 хроматограмм не более 1,0%.	На хроматограмме раствора сравнения (b) не менее 3,0 между пиками ампициллина и цефрадина.

Время элюирования	$t_R + 60$ мин. (t_R - время удерживания ампициллина на хроматограмме раствора сравнения (c))	$t_R + 60$ мин. (t_R - время удерживания ампициллина на хроматограмме раствора сравнения (c))	Должно в 10 раза превышать время удерживания ампициллина	Не менее 60 минут
Нормы	Содержание димера ампициллина - не более 4,5 %. Содержание любой единичной примеси - не более 2,0 %.	Содержание димера ампициллина - не более 4,5 %. Содержание любой единичной примеси - не более 2,0 %.	Содержание любой единичной примеси - не более 1,0 %.	Содержание димера ампициллина - не более 4,5 %. Содержание любой единичной примеси - не более 2,0 %. Сумма примесей - не более 5,0 %.

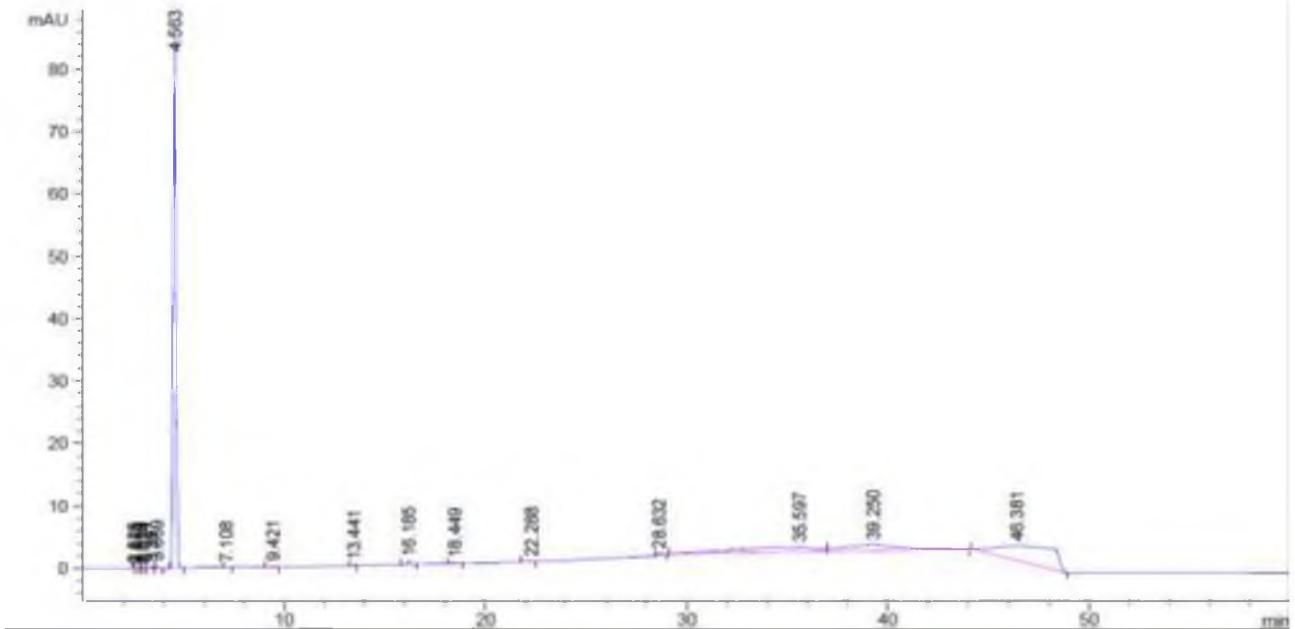


Рисунок 2. Хроматограмма раствора сравнения (с) для анализа образцов ампициллина натрия.

На хроматограмме раствора сравнения (с) присутствует основной пик ампициллина натрия со временем удерживания 4,56 мин.

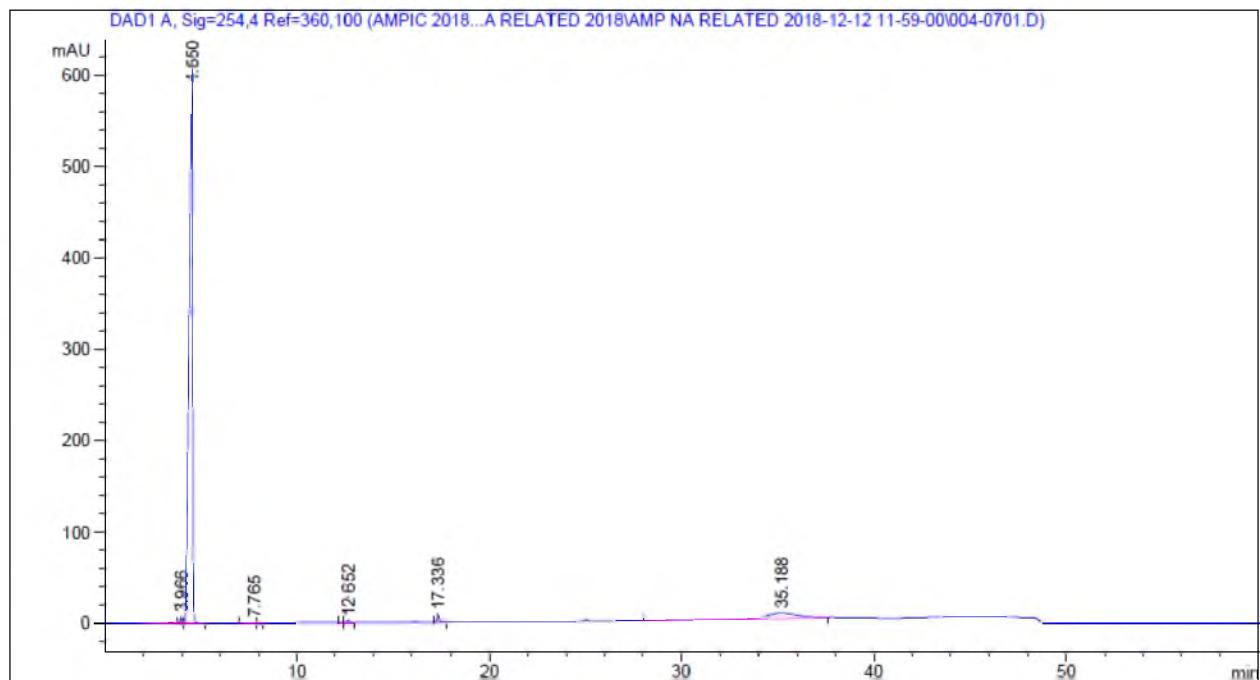


Рисунок 3. Хроматограмма образца серии 970422-21 производства Китая.

На рисунке 3 показано, что на хроматограмме раствора данного образца присутствует основной пик со временем удерживания 4,550 мин, и пять пика примесных соединений, времена удерживания которых 3,966 мин, 7,765 мин, 12,652 мин, 17,336 мин и 35,188 мин.

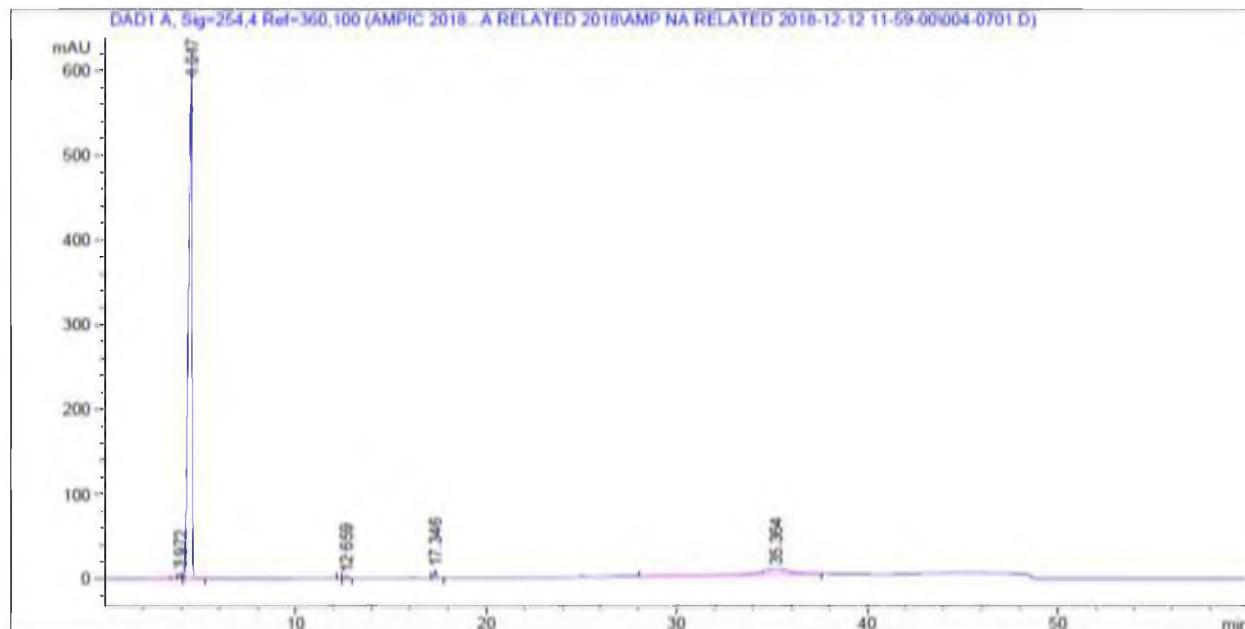


Рисунок 4. Хроматограмма образца серии А191042018 производства Индии.

На рисунке 4 показано, что на хроматограмме раствора анализируемого образца обнаруживается пик основного вещества со временем удерживания 4,547 мин, а также четыре пика примесей, времена удерживания которых 3,972 мин, 12,659 мин, 17,346 мин и 35,364 мин.

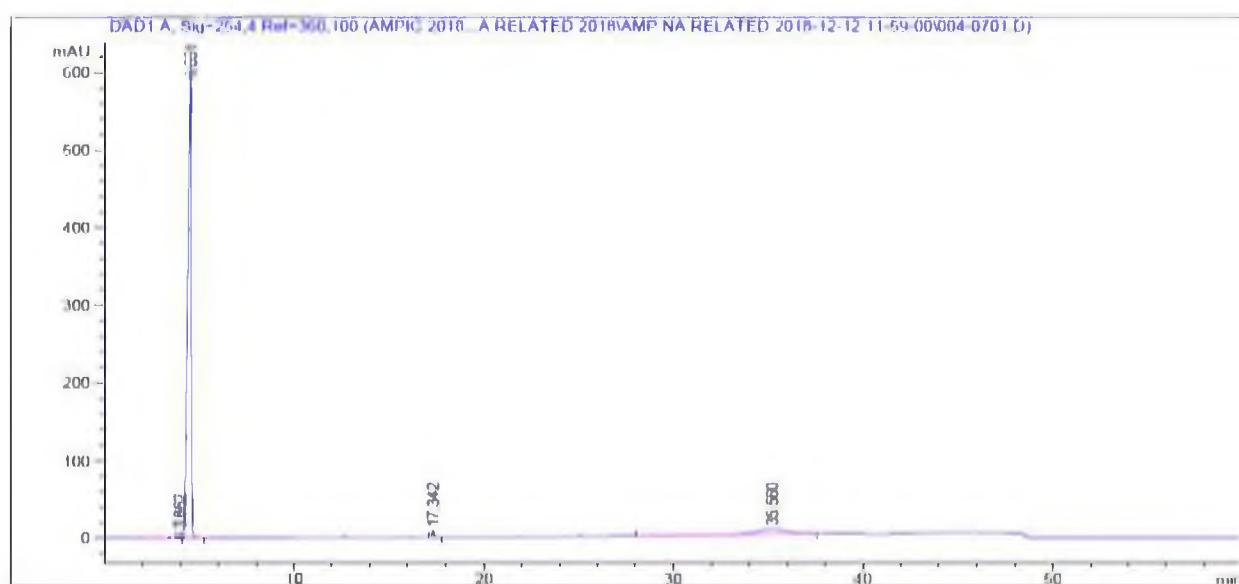


Рисунок 5. Хроматограмма образца серии 2018099721 производства России.

На рисунке 5 показано, что на хроматограмме раствора анализируемого образца обнаруживается пик основного вещества со временем удерживания 4,651 мин, а также три пика примесей, времена удерживания которых 3,862 мин, 17,342 мин и 35,560 мин.

В таблице 2 представлены данные по содержанию в анализируемых субстанциях ампициллина натрия посторонних примесей.

Полученные результаты показывают, что уровень содержания как единичных примесей, так и суммы примесных продуктов в анализируемых образцах не превышает установленных документацией норм.

Образец серии 970422-21, произведенный в Китае, содержит пять примесных соединения в количестве от 0,09 % до 1,15 %.

Образец серии А191042018, произведенный в Индии, содержит четыре примесных соединения в количестве от 0,14 % до 1,03 %.

Образец серии 2018099721 производства России содержит три примеси, содержание которых составляет от 0,11 % до 0,98 %.

Полученные данные показывают, что все исследуемые образцы содержат димер ампициллина со временем удерживания около 3,8 мин, содержание которой в субстанциях различных производителей находится в пределах 0,66 % (субстанция производства России) до 1,09 % (субстанция производства Китая). Также все образцы содержат примесь со временем удерживания около 17 мин, содержание которой находится на уровне 0,5 %. При этом исследуемые вещества показывают различия в количестве единичных примесей и в их суммарном содержании.

Таблица 12

Содержание посторонних примесей в субстанциях ампициллина натрия.

	Ампициллин натрия, серия 970422-21 Изготовитель Китай	Ампициллин натрия, серия A191042018 Изготовитель Индия	Ампициллин натрия, серия 2018099721 Изготовитель Россия
Времена удерживания	3,966 мин 7,765 мин 12,652 мин 17,336 мин 35,188 мин	3,972 мин 12,659 мин 17,346 мин 35,364 мин	3,862 мин 17,342 мин 35,560 мин
Содержание димера ампициллина	1,09 %	1,12%	0,66 %
Содержание единичных примесей	0,09 % 0,12 % 0,79 % 1,15 %	0,14 % 0,52 % 1,03 %	0,11 % 0,98 %
Суммарное содержание примесей	3,24 %	2,81 %	1,75 %

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В СУБСТАНЦИЯХ АМПИЦИЛЛИНА НАТРИЯ

Успешное решение проблемы обеспечения внутрипроизводственного аналитического контроля технологических процессов получения ЛВ и лекарственных форм на их основе во многом обусловлено использованием высокопроизводительных, избирательных, чувствительных и экономичных методов определения ЛВ в ходе процедур контроля качества технологического процесса. Наиболее полно этим требованиям отвечают доступные для производственной лабораторной практики хроматографические методы анализа, для которых значительный объем аналитической информации, получаемой непосредственно в ходе технологического процесса, и доступность унифицируемой приборной базы, способствуют дальнейшему расширению областей их использования в практике фармацевтического анализа. Расширение возможностей ГЖХ в анализе многокомпонентных лекарственных смесей также обусловлено относительной простотой способов определения ЛВ, а также техники выполнения измерений и возможностями стандартизации этих аналитических процедур. Следует отметить, что во многих случаях им характерна малая специфичность, чувствительность, а также длительность, трудоемкость выполнения аналитических процедур при их использовании, зачастую необходимость использования методов разделения компонентов анализируемых смесей. Эти факторы ограничивают использование вышеупомянутых аналитических подходов для анализа ЛВ в субстанциях с технологического оборудования при производстве их лекарственных форм и проблема разработки экспрессных методов определения этих ЛВ в различных фармацевтических объектах является весьма актуальной [51-54].

4.1. Пределы содержания остаточных органических растворителей.

Содержание органических растворителей является одним из нормативных показателей, которые гарантируют безопасность промышленной продукции, позволяют судить об уровне технологии ее получения и в конечном итоге обеспечивают высокий уровень качества лекарственных веществ, используемых для производства готовых лекарственных средств.

Уровень содержания остаточных растворителей в лекарственных средствах нормируется в зависимости от класса растворителей (согласно ICN "Guideline for Residual Solvents" - руководство по остаточным органическим растворителям).

Растворители, которых необходимо избегать.

Растворители класса 1 не должны применяться в производстве субстанций и лекарственных препаратов из-за неприемлемой токсичности или их вредного воздействия на окружающую среду. Однако если их использования нельзя избежать при получении лекарственного препарата с необходимым терапевтическим эффектом, их уровни должны быть в пределах, указанных в таблицах 13-14, если они не регламентированы иным образом. (1,1,1-трихлорэтан включен в таблицу 13 из-за опасности для окружающей среды).

Таблица 13

Растворители класса 1 в фармацевтических препаратах.

Растворитель	Предел концентрации	Причина
Бензол	2	Канцероген
Углерода тетрахлорид	4	Токсичен и наносит вред окружающей среде
1,2-Дихлорэтан	5	Токсичен
1,1-Дихлорэтен	8	Токсичен
1,1,1 -Трихлорэтан	1500	Наносит вред окружающей среде

Растворители, которые должны нормироваться.

Таблица 14.

Растворители класса 2 в фармацевтических препаратах

Растворитель	PDE (мг/день)	Предел концентрации (ppm)
Ацетонитрил	4,1	410
Хлорбензол	3,6	360
Хлороформ	0,6	60
Циклогексан	38,8	3880
1,2-Дихлорэтен	18,7	1870
Дихлорметан	6,0	600
1,2-Диметилацетамид	1,0	100
1,4-Диметилформамид	8,8	880
1,4-Диоксан	3,8	380
2-Этоксиэтанол	1,6	160
Этиленгликоль	6,2	620
Формамид	2,2	220
Гексан	2,9	290
Метанол	30,0	3000
2-Метоксиэтанол	0,5	50
Метилбутилкетон	0,5	50
Метилциклогексан	11,8	1180
N-Метилпирролидон	48,4	4840
Нитрометан	0,5	50
Пиридин	2,0	200
Сульфолан	1,6	160
Тетралин	1,0	100
Толуол	8,9	890
1,1,2-Трихлорэтен	0,8	80
Ксилен*	21,7	2170

*обычно 60 % т-ксилона, 14 % р-ксилона, 9 % о-ксилона с 17 % этилбензола.

Растворители с низким токсичным потенциалом.

Растворители класса 3 (таблица 15) считаются наименее токсичными для здоровья человека. Однако длительные исследования по токсичности или канцерогенности для многих растворителей этого класса не проводились. Имеющиеся данные показывают, что они менее токсичны в острых или кратковременных исследованиях и отрицательны в исследованиях по генотоксичности. Принято считать, что количество этих остаточных

растворителей 50 мг/день или менее (что соответствует 5000 ppm или 0,5 % по 1 способу оценки содержания растворителей), допустимо, если изготовитель может доказать, что оно реально относительно возможностей производства и GMP.

Таблица 15.

Растворители класса 3, которые должны быть лимитированы по правилам GMP или другим требованиям качества.

Уксусная кислота	Гептан
Ацетон	Изобутилацетат
1-Бутанол	Изопропилацетат
2-Бутанол	Метилацетат
Бутилацетат	3-Метил-1 -бутанол
Метиловый эфир	Метилэтилкетон
Кумол	2-Метил-1 -пропанол
Диметилсульфоксид	Пентан
Этанол	1-Пропанол
Этиловый эфир	1-Пентанол
Этилформиат	2-Пропанол
Этилацетат	Пропилацетат
Муравьиная кислота	Тетрагидрофуран

Растворители, для которых не найдено адекватных токсикологических данных.

Растворители, представленные в таблице 6, также могут заинтересовать изготовителей вспомогательных веществ, активных субстанций или лекарственных препаратов. Для данной группы остаточных растворителей не было найдено адекватных токсикологических данных, на которых базируются нормы PDE. Поэтому производителям в каждом конкретном случае необходимо предоставлять обоснование для остаточных уровней этих растворителей в производимых лекарственных препаратах.

Таблица 16.

Растворители, для которых не было найдено адекватных токсикологических данных.

1,1 -Диэтоксипропан	Метилизопропилкетон
1,1 - Диметоксиметан	Метилтетрагидрофуран
2,2-Диметоксипропанол	Петролейный эфир
Изооктан	Трихлоруксусная кислота
Изопропиловый эфир	Трифтоторуксусная кислота

Оценка содержания остаточных органических растворителей в лекарственных препаратах.

Для этой цели используется 2 способа:

В первом случае критерием оценки является концентрация растворителя, выраженная в ppm. Расчет осуществляется с использованием регламентируемых норм PDE (мг/день) по уравнению (1).

$$\text{Концентрация (ppm)} = \frac{1000 \times \text{PDE}}{\text{Доза}} \quad (1)$$

Лекарственный препарат в целом и каждое действующее и/или вспомогательное вещество в его составе должны соответствовать предельным нормам содержания остаточных растворителей (таблица 14). Указанные пределы были рассчитаны исходя из суточной дозы препарата 10 г.

Если и лекарственная форма, и ее компоненты по уровню остаточного растворителя не превышают пределов, представленных в таблице 15, то это позволяет производителю использовать составляющие лекарственные препараты в любой пропорции, при сохранении общей массы неизменной.

Данный способ оценки уровня растворителей используется в том случае, когда доза ежедневного приема препарата заранее неизвестна и может варьировать.

Если ежедневная доза препарата не превышает 10 г, дальнейшие расчеты не требуются. При втором способе определения уровня остаточных

органических растворителей, критерием пределов содержания являются нормы PDE мг/день.

В этом случае допускается превышение пределов концентрации остаточных растворителей в ррм отдельных компонентов, при соответствии нормам PDE мг/день (таблица 14) препарата в целом.

Данный способ используется при дозах препарата более 10 г в день, а также в случае внесения изменений в технологический процесс и увеличения уровня остаточного растворителя.

Увеличение содержания растворителя в таких случаях допускается, если производителем было доказано, что это технически достижимый минимум концентрации.

Содержание остаточных органических растворителей в лекарственных средствах может быть представлено в следующих вариантах:

При наличии растворителей класса токсичности 3 их уровень выражается величиной потери в массе при высушивании.

При наличии растворителей класса 2 указывается наименование каждого из них и отмечается, что его содержание ниже предела в единицах ррм.

При наличии растворителей классов 2 и 3 указывается, что содержание каждого из растворителей 2 класса ниже предела в единицах ррм, а содержание растворителей класса 3 - менее 0,5 %.

Если растворители класса 2 или класса 3 присутствуют в пределах больших, чем пределы концентрации 1 способа или 0,5 %, соответственно, они должны быть идентифицированы и количественно определены.

В случае присутствия растворителей 1 класса, они должны быть идентифицированы и количественно определены.

4.2. Методы определения остаточных органических растворителей в лекарственных средствах.

Определение остаточных органических растворителей может быть осуществлено любыми валидными методами. Наиболее часто для этих целей используется метод газо-жидкостной хроматографии. Для определения

ратворителей 3 класса допускается применение такого неспецифического метода, как потеря в массе при высушивании [53].

Газожидкостная хроматография применяется для идентификации и количественного определения органических растворителей и имеет свои особенности. Этот метод очень быстрый, позволяет анализировать сложные смеси и требует малого объема пробы [95, 111, 119].

Метод ГЖХ широко применяется для определения остаточных количеств органических растворителей в лекарственных препаратах различных фармакологических групп - глюокортикоидных, фитопрепаратах, противовопухолевых, противосудорожных, гипотензивных [15, 21, 24, 25, 27, 30, 58, 78, 98, 99].

В газожидкостной хроматографии компоненты исследуемой смеси распределяются между двумя фазами: мобильной и стационарной. Мобильной фазе соответствует нереактивный газ, в то время как стационарная фаза состоит из нелетучей органической жидкости, поддерживается соответствующим сухим веществом и находится в колонке. Исследуемая пробы вводится в мобильную фазу и проходит через колонку. Индивидуальные компоненты пробы проходят через колонку с различной скоростью, которая зависит от летучести компонентов и от растворимости в стационарной фазе, где они разделяются. Затем разделенные компоненты удаляются из колонки. Они проходят через соответствующий детектор, подающий сигналы, которые и регистрируются как результат хроматограммы [9].

Основные части прибора: (а) устройство для регулирования и измерения скорости потока газа-носителя, (б) хроматографическая колонка, заключенная в термостат, (с) устройство для введения пробы, (д) детектор или записывающее устройство [43, 60, 61].

Также для анализа остаточных органических растворителей в фармацевтических препаратах применяется метод очистительной и мембранный масс-спектрометрии. Метод сочетает динамичность мембраны, вовлеченной в масс-спектрометрию. Границы детектирования при исследовании смеси бензола, толуола, хлороформа, 2-пентена, 2-метил и 3-метилпентана 0,05-0,1 мг/кг.

В количественном анализе метод показывает хороший линейный ($r^2 > 0,9998$) и приемлемый, повторяющийся в течение дня ($RSD = 7,9 - 18 \%$) и ($RSD = 6,8 - 10 \%$) через день, результат. Метод очистительной и мембранный масс-спектрометрии объединяется с изготовленной на заказ Solver программой и сравнивается с методом очистительной трубчатой газовой хроматографией / масс-спектрометрией для идентификации остаточных органических растворителей из подлинных проб. Результаты показывают, что очистительная и мембранный / масс-спектрометрия / Solver обеспечивает достоверную идентификацию главных летучих органических смесей в лекарственных средствах, летучие органические смеси с концентрацией ниже 0,5 мг/кг лучше распознать с помощью очистительной и трубчатой газовой хроматографии/ масс-спектрометрией. Другие преимущества метода очистительной и мембранный масс-спектрометрии - это проведение анализа в короткий период времени и отсутствие требования дополнительной обработки пробы [85, 108, 110, 112].

Практический интерес представляло сравнение образцов ампициллина натрия различных производителей, как по характеру остаточных растворителей, так и по их количественному содержанию.

В нормативную документацию, регламентирующую качество ампициллина натрия, включается определение остаточных органических растворителей, используемых при производстве. Например, методом ГЖХ контролируется содержание дихлорметана (не более 0,2 %) в НД на субстанцию, производимую в Китае, N,N-диметиланилин (не более 0,002 %) - в НД на субстанцию Индийского производства. В субстанции, производимой в России, методом ГЖХ определяется содержание 2-этилгексановая кислота (не более 0,80 %), N,N-диметиланилин (не более 0,002 %).

В Фармакопею Евросоюза [89] включены в виде общей статьи требования по нормированию остаточных органических растворителей. Эта статья устанавливает следующие лимиты: дихлорметана не более 0,2 %, N,N-диметиланилин не более 0,002 %, 2-этилгексановая кислота не более 0,80%.

Материалы и методы исследования.

Анализировались имеющиеся в нашем распоряжении зарубежные субстанции ампициллина натрия производства Индии и Китая, ввезенные в РУз на условиях краткосрочной регистрации. Работа проводилась в соответствии с требованиями Спецификация SPC/050/04/14 на «Ampicillin Sodium Sterile» [53].

Условия проведения анализа.

1) Прибор: газовый хроматограф фирмы «Agilent Technologies» с программированием температуры, снабженный:

а) инжектором со стеклянной вставкой, препятствующей контакту пробы с металлическими поверхностями, который обеспечивает работу в режимах «с расщеплением потока» и «без расщепления потока»;

б) пламенно-ионизационным детектором;

в) капиллярной колонкой из плавленого кварца длиной 30 м и внутренним диаметром 0,53 мм, покрытой неподвижной фазой, содержащей полицианопропилфенилсилоксана и полиметилсилоксана 6% и 94% соответственно (DB – 624, Agilent Technologies, J&W Scientific);

г) газ-носитель: азот.

2) Приготовление испытуемой пробы. 0,100 г испытуемого образца и 1 мл воды помещали во флакон, закупорили инертной крышкой и обвалировали алюминиевым колпачком.

3) Приготовление раствора рабочего стандартного образца (РСО). 0,200 г РСО метилен хлористого, N,N-диметиламилина, 2-этилгексановой кислоты растворяли в воде и доводили объем раствора этим же растворителем до 100 мл. 5,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл доводили объем раствора водой до метки и перемешали. Для испытания 1 мл этого раствора помещали во флакон, закупорили инертной крышкой и обвалировали алюминиевым колпачком.

4) Методика.

А. Условия хроматографирования для определения дихлорметана:

- Газ-носитель – азот;

- Деление потока - 5:1;

- Скорость газа-носителя – 1 мл/мин;
- Температура устройства ввода проб - 180°C.
- Температура детектора - 250°C.

- Температуру колонку программируют: поддерживают температуру колонки 40°C в течение 15 мин, затем повышают температуру до 200°C со скоростью 10°C/мин, температуру 200°C выдерживают в течение 5 мин.

Условия для парофазного пробоотборника:

- Температура термостата - 80°C;
- Время терmostатирования – 30 мин;
- Температура блока ввода пробы - 85°C;
- Температура линии переноса - 85°C;
- Время подачи газа-носителя – 30 сек.

В. Условия хроматографирования для определения N,N-диметиланилина:

- Газ-носитель – азот;
- Деление потока - 10:1;
- Скорость газа-носителя – 0,5 мл/мин;
- Температура устройства ввода проб - 250°C.
- Температура детектора - 260°C.
- Температуру колонку программируют: поддерживают температуру колонки 180°C в течение 15 мин, затем повышают температуру до 220°C со скоростью 10°C/мин, температуру 220°C выдерживают в течение 2 мин.

Условия для парофазного пробоотборника:

- Температура термостата - 120°C;
- Время терmostатирования – 20 мин;
- Температура блока ввода пробы - 120°C;
- Температура линии переноса - 100°C;
- Время подачи газа-носителя – 30 сек.

С. Условия хроматографирования для определения 2-этилгексановой кислоты:

- Газ-носитель – азот;
- Деление потока - 5:1;

- Скорость газа-носителя – 1,5 мл/мин;
- Температура устройства ввода проб - 250°C.
- Температура детектора - 270°C.
- Температуру колонку программируют: поддерживают температуру колонки 200°C в течение 12 мин, затем повышают температуру до 220°C со скоростью 10°C/мин, температуру 220°C выдерживают в течение 5 мин.

Условия для парофазного пробоотборника:

- Температура термостата - 120°C;
- Время терmostатирования – 20 мин;
- Температура блока ввода пробы - 120°C;
- Температура линии переноса - 100°C;
- Время подачи газа-носителя – 30 сек.

Для установления пригодности хроматографической системы для анализа должны были выполняться следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по двум рядом стоящим пикам, не менее 1000 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площадей пиков метилен хлористого, N,N-диметиланилина и 2-этилгексановой кислоты не более 10 %;
- коэффициенты разделения R_s , рассчитанные для пиков метилен хлористого, N,N-диметиланилина, 2-этилгексановой кислоты с пиками ближайших соединений, не менее 3.

5) Идентификация.

Идентификацию осуществляли на основании сопоставления времен удерживания пиков растворителей в испытуемой пробе и соответствующих РСО.

6) Количественное определение.

Количественное определение проводили методом сравнения со стандартным образцом в варианте абсолютной калибровки для каждого исследуемого органического растворителя.

1 мкл пробы вводили в хроматограф, получая не менее 5 хроматограмм в указанных выше условиях.

Количественное содержание каждого растворителя X, в %, вычисляли по формуле:

$$x = (S_{\text{исп}} \times C \times 0,0001 \times V) / (S_{\text{ст}} \times a)$$

где:

$S_{\text{исп}}$ - площадь пика на хроматограмме испытуемого раствора;

$S_{\text{ст}}$ - площадь пика на хроматограмме стандартного раствора;

C - концентрация испытуемого раствора, мг/мл;

V - объем разведения при приготовлении испытуемого раствора, мл;

a - навеска испытуемого вещества, мг;

0,0001 - коэффициент пересчета %.

4.3. Результаты и их обсуждение.

В указанных выше условиях было проведено определение остаточных органических растворителей в субстанциях ампициллина натрия. Получены хроматограммы испытуемых растворов, стандартных растворов и раствора бланк (газ-носитель, азот).

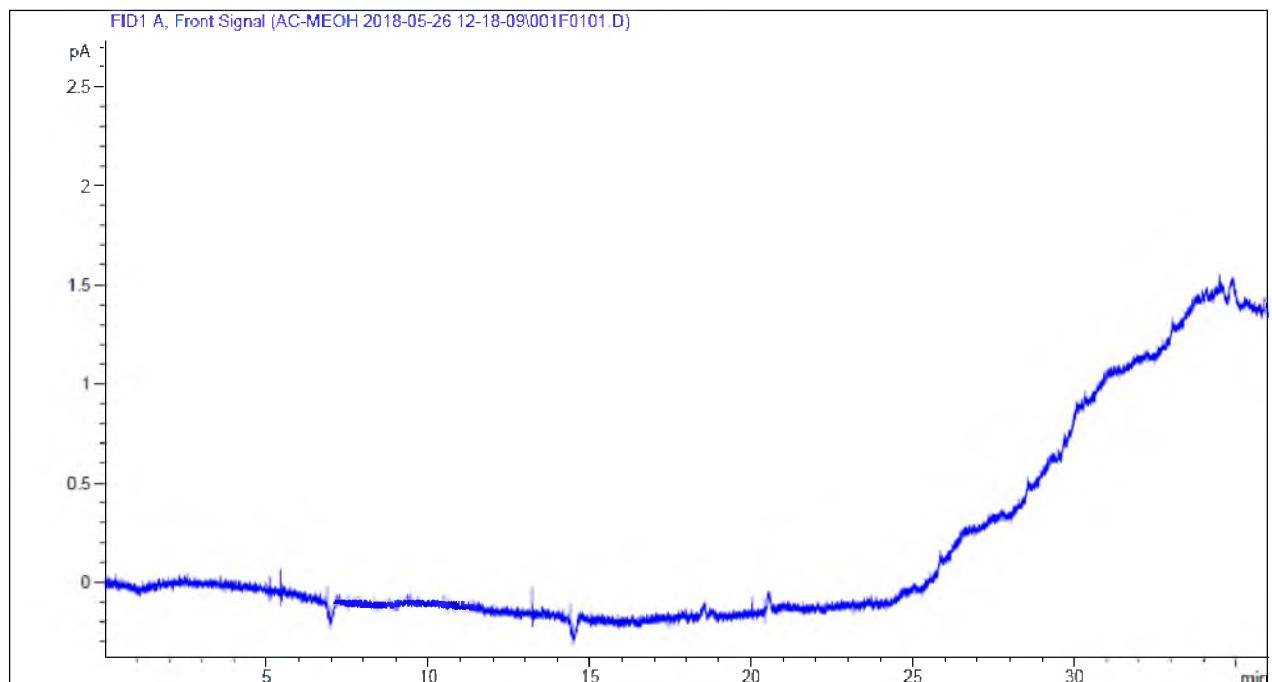


Рисунок 6. Хроматограмма раствора бланк (газ-носитель, азот).

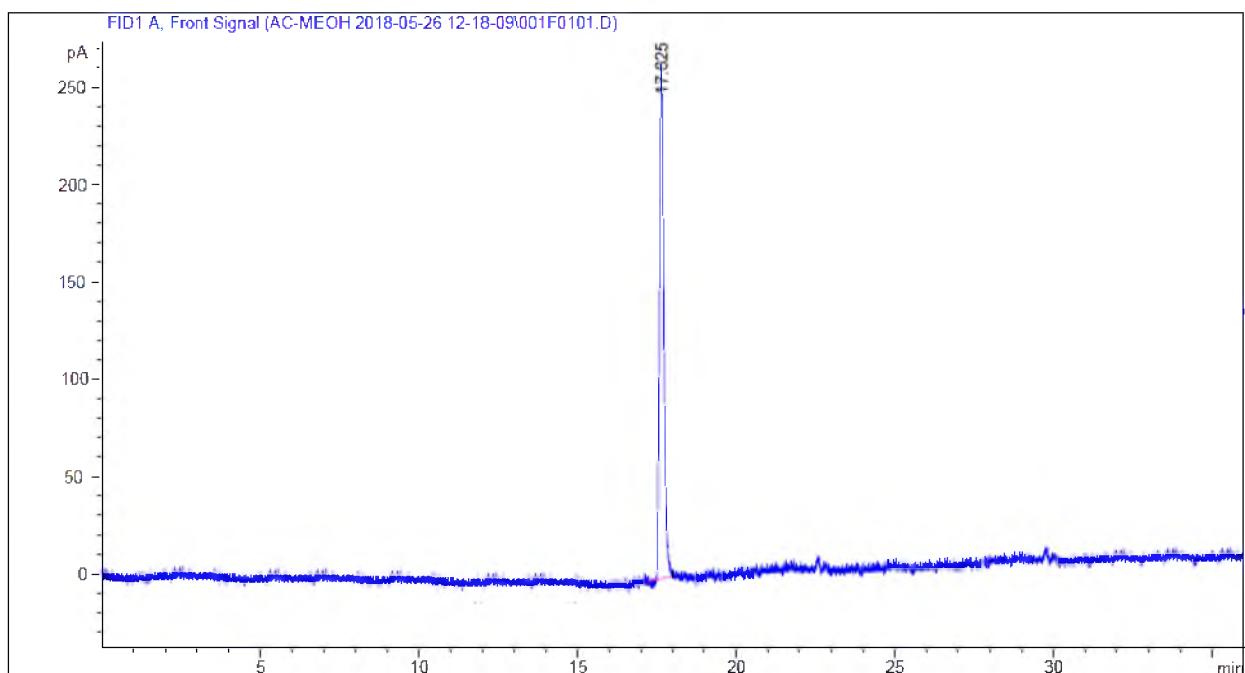


Рисунок 7. Хроматограмма стандартного раствора дихлорметана.

На хроматограмме раствора стандарта присутствует основной пик дихлорметана со временем удерживания 17,625 мин.

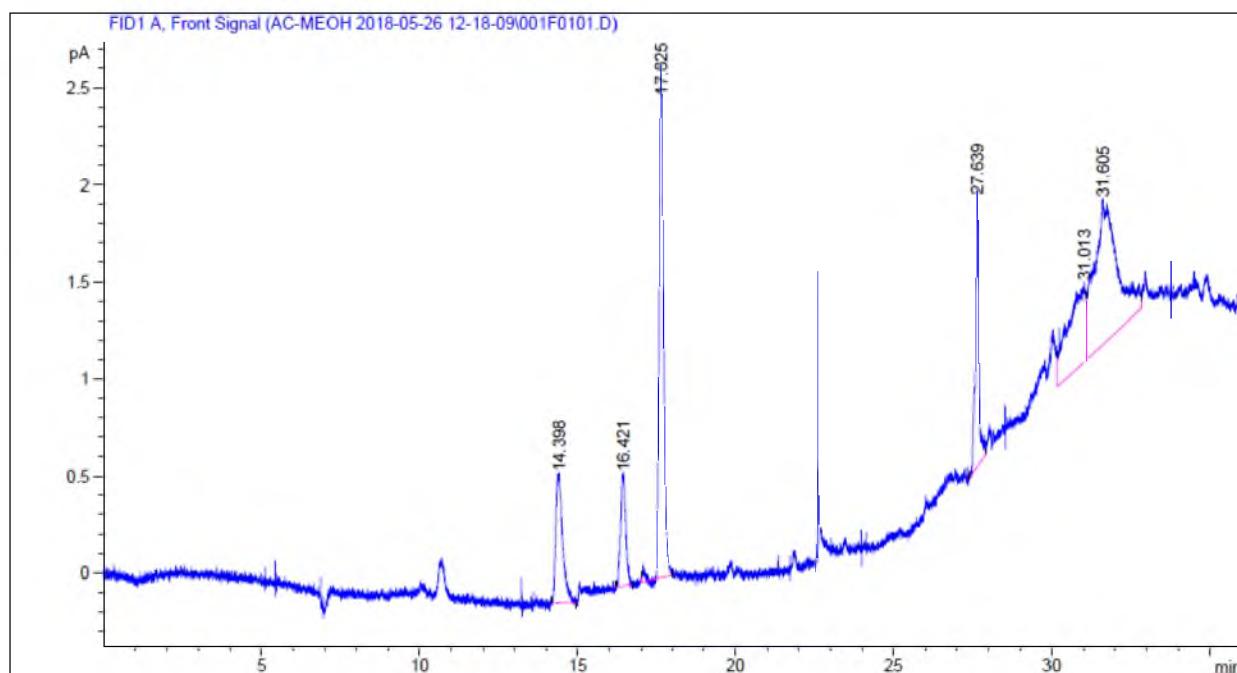


Рисунок 8. Хроматограмма образца серии 970422-21 производства Китая. На рисунке 8 показано, что на хроматограмме раствора данного образца присутствует пик дихлорметана со временем удерживания 17,625 мин.

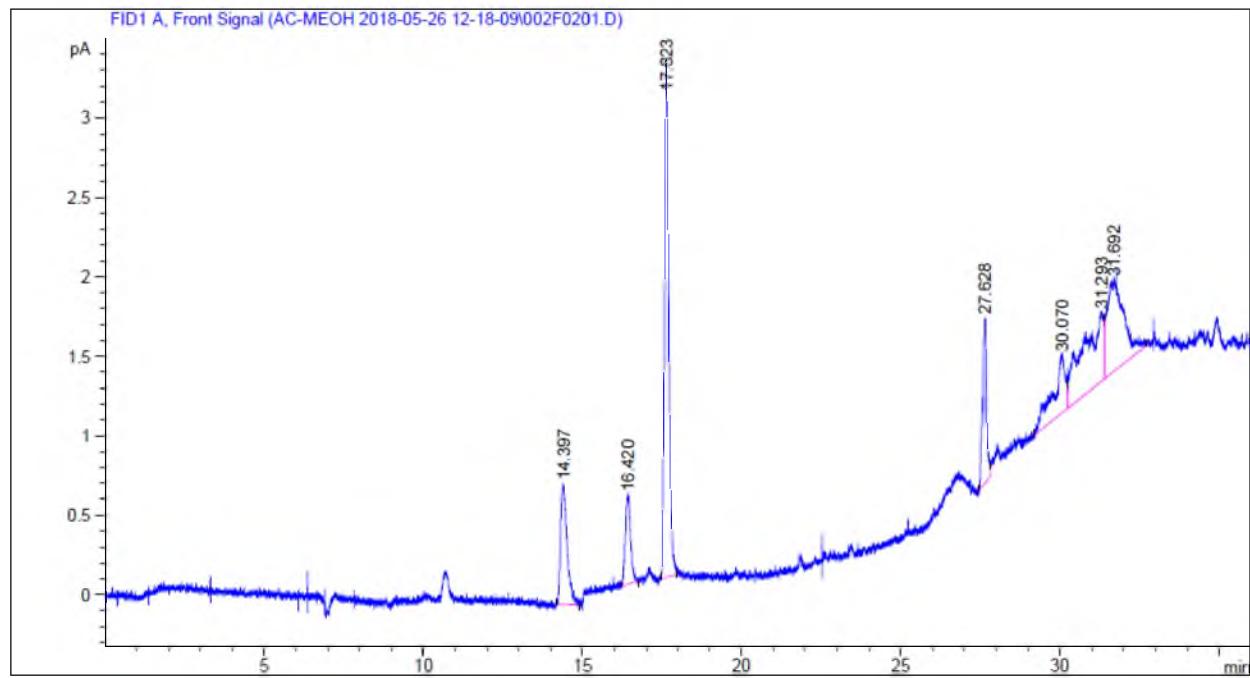


Рисунок 9. Хроматограмма образца серии А191042018 производства Индии.

На рисунке 9 показано, что на хроматограмме раствора данного образца присутствует пик дихлорметана со временем удерживания 17,623 мин.

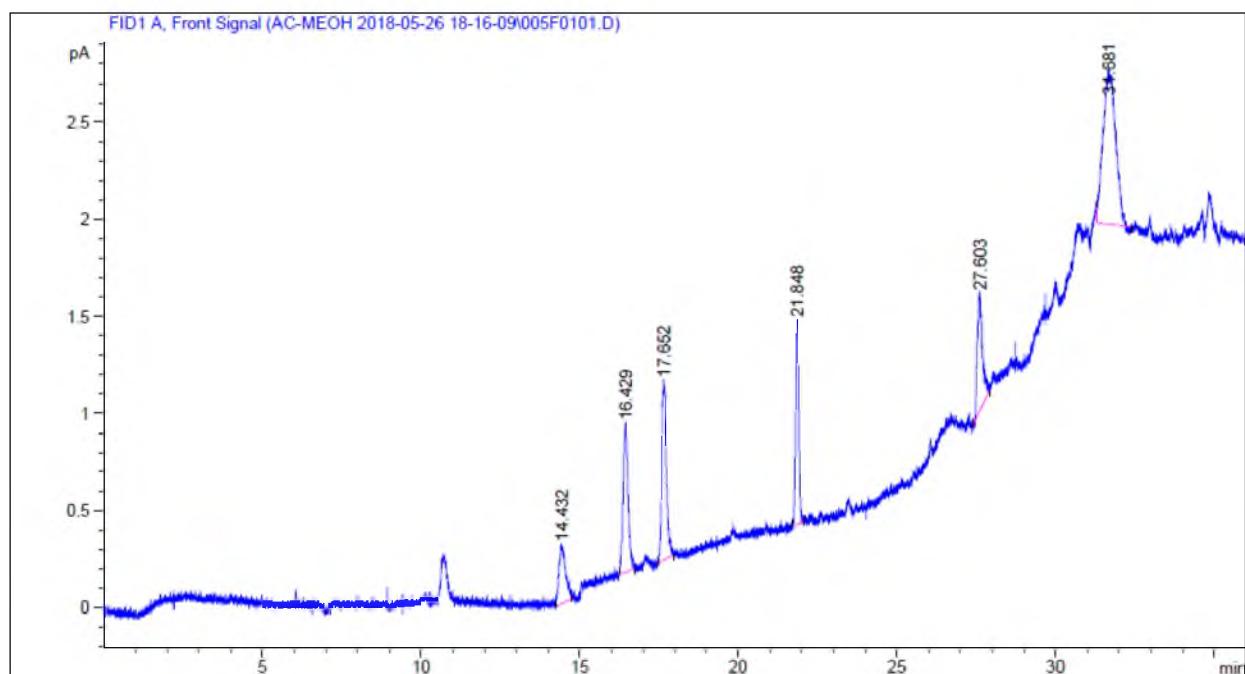


Рисунок 10. Хроматограмма образца серии 2018099721 производства России.

На рисунке 10 показано, что на хроматограмме раствора данного образца присутствует пик дихлорметана со временем удерживания 17,652 мин.



Рисунок 11. Хроматограмма раствора бланк (растворитель - хлороформ) для определения содержание N,N-диметиланилина.

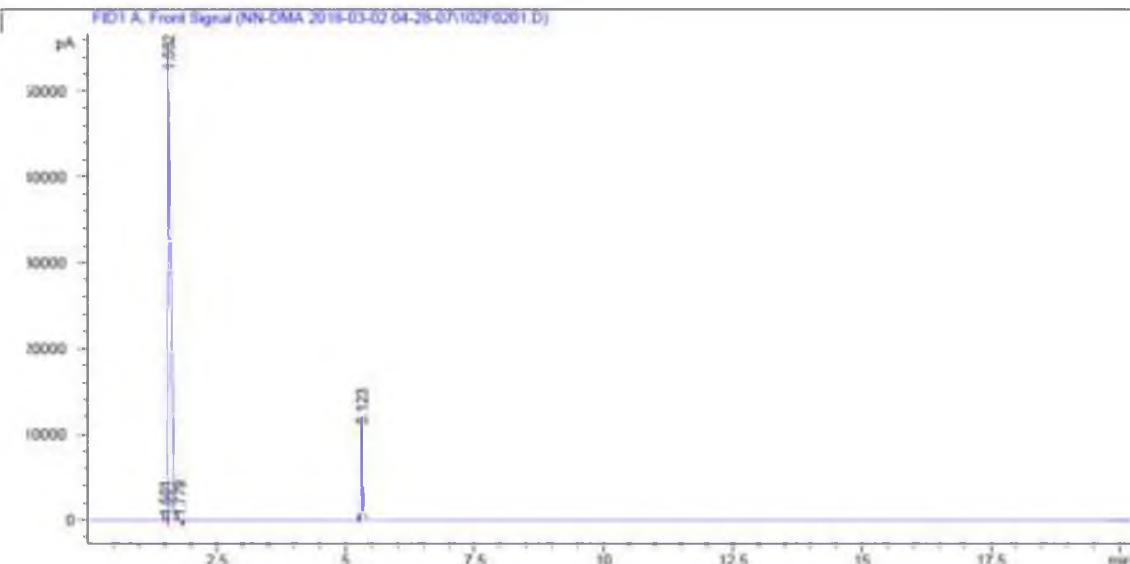


Рисунок 12. Хроматограмма стандартного раствора N,N-диметиланилина.

На хроматограмме раствора стандарта присутствует основной пик N,N-диметиланилина со временем удерживания 5,123 мин.

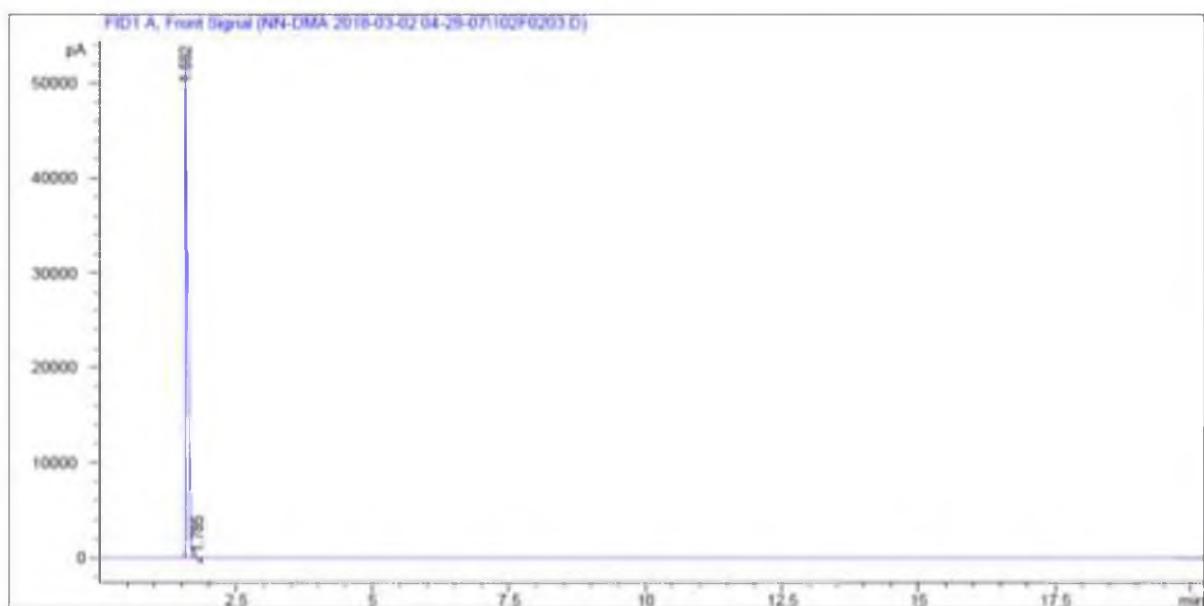
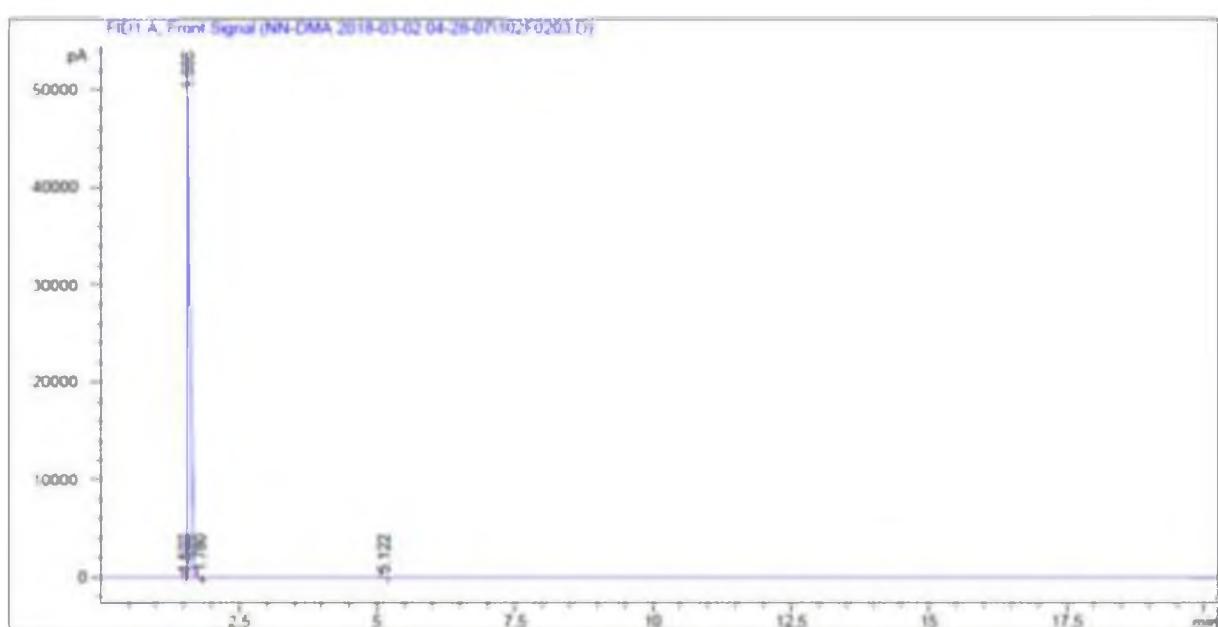


Рисунок 13. Хроматограмма образца серии 970422-21 производства Китая. На



рисунке 13 показано, что на хроматограмме раствора данного образца не обнаружено пик N,N-диметиланилина.

Рисунок 14. Хроматограмма образца серии А191042018 производства Индии. На рисунке 14 показано, что на хроматограмме раствора данного образца присутствует пик N,N-диметиланилина со временем удерживания 5,122 мин.

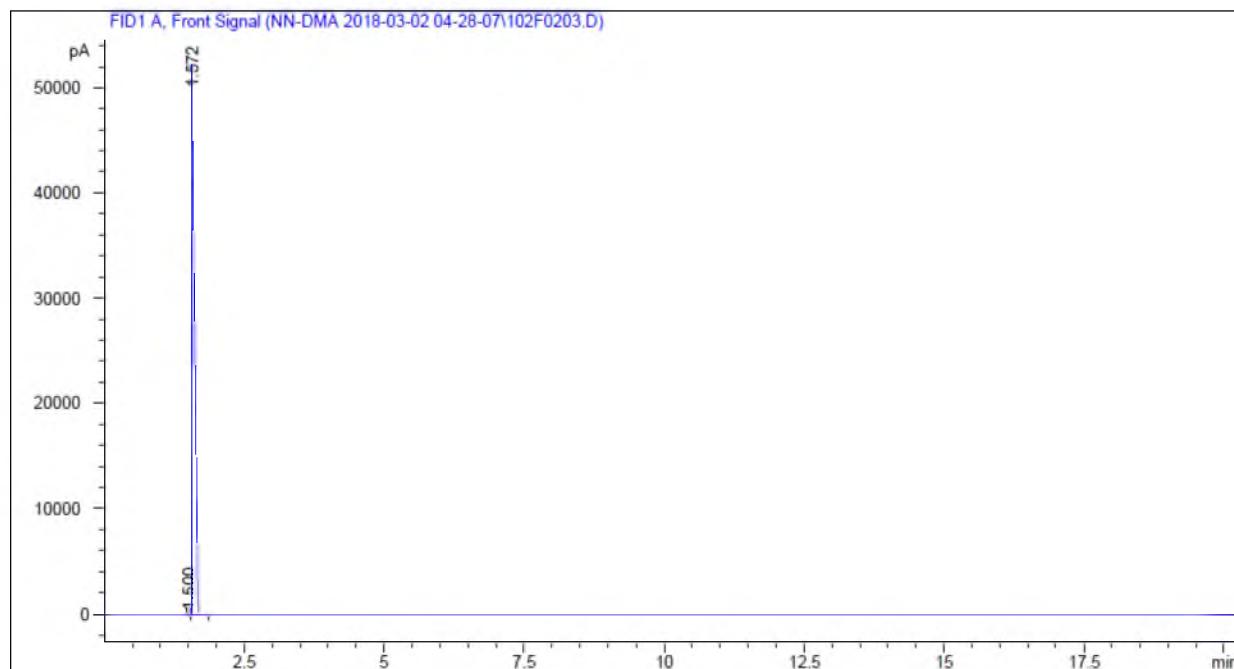


Рисунок 15. Хроматограмма образца серии 2018099721 производства России. На рисунке 15 показано, что на хроматограмме раствора данного образца не обнаружено пик N,N-диметиланилина.

Результаты определения остаточных растворителей в субстанциях ампициллина натрия приведены в таблице 16.

Таблица 16.

Содержание остаточных органических растворителей в субстанциях ампициллина натрия.

Происхождение субстанции	Количество в %	Норма
Китай	Дихлорметан - 0,0091 %	Дихлорметан - не более 0,2 %
	N,N-диметиланилин – не обнаружено	N,N-диметиланилин - не более 0,002 %
	2-этилгексановая кислота - 0,0016 %	2-этилгексановая кислота - не более 0,8 %

Индия	Дихлорметан - 0,0112 %	Дихлорметан - не более 0,2 %
	N,N-диметиланилин – 0,00011%	N,N-диметиланилин - не более 0,002 %
	2-этилгексановая кислота - 0,0027 %	2-этилгексановая кислота - не более 0,8 %
Россия	Дихлорметан - 0,0021 %	Дихлорметан - не более 0,2 %
	N,N-диметиланилин – не обнаружено	N,N-диметиланилин - не более 0,002 %
	2-этилгексановая кислота - 0,0009 %	2-этилгексановая кислота - не более 0,8 %

Полученные экспериментально результаты показывают отсутствие в анализируемых образцах растворителей первого класса токсичности.

Метилен хлористый в количестве от 0,0021 до 0,0102 % был обнаружен в субстанциях, произведенных в Индии, Китая и России. N,N-диметиланилин отсутствует в образцах производства Индии и России. А в субстанциях производства Индии в количестве около 0,00011 %. 2-этилгексановая кислота в количестве от 0,0009 до 0,0027 % был обнаружен в субстанциях, произведенных в Индии, Китая и России.

Все найденные органические растворители относятся к растворителям 3 класса с низким токсическим потенциалом (нормируются правилами GMP или другими требованиями качества).

Полученные результаты содержания остаточных растворителей в субстанциях ампициллина натрия не превышают норм, Европейской фармакопеей 8 издания и ICH.

ГЛАВА V. АНАЛИЗ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ МЕТОДОМ ГЖХ.

В фармацевтическом анализе газовая хроматография используется для оценки чистоты, установления подлинности и количественного определения лекарственных средств в тестах «Посторонние примеси», «Однородность дозирования», «Растворение», «Количественное определение», «Остаточные органические растворители» и др. В анализе фармакопейных цефалоспоринов применяются различные методики пробоподготовки, условия хроматографирования и используются различные критерии пригодности хроматографической системы.

Целью настоящей работы являлась разработка унифицированной методики анализа лекарственных средств группы цефалоспоринов с использованием метода ГЖХ.

Для этого решались следующие задачи:

- оптимизация методики пробоподготовки субстанций и лекарственных препаратов цефалоспоринов;
- улучшение хроматографических условий (сорбент, подбор параметров колонки, выбор детектирования, температурный режим детектора и вводимого блока, объем пробы и др.), оптимальных для определения остаточных органических растворителей, таких как ацетон, метанол, дихлорметан, этанол, триэтиламин, 2-этилгексанская кислота и N,N-диметиланилин в составе цефалоспоринов;
- оценка параметров пригодности хроматографической системы.

5.1. Определение содержания N,N-диметиланилина.

Испытание на содержание N,N-диметиланилина проводили методом газовой хроматографии. По 1 мкл бланк, испытуемого раствора и стандартного раствора попеременно хроматографировали на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором, получая не менее 3 хроматограмм для каждого из растворов.

Приготовление растворов

Приготовление испытуемого раствора: 1,00 г препарата поместить в пробирку с притертой пробкой вместимостью 10 мл, растворить в 5 мл 1М раствора натрия гидроксида и прибавить 1,0 мл раствора внутреннего стандарта, энергично встряхивать в течение 1 мин, дают фазам расслоиться и хроматографировать верхний (органический) слой.

Приготовление стандартного раствора. 0,050 г РСО N,N - диметиланилина поместить в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавить 25 мл 1М раствора кислоты хлористоводородной, растворить при перемешивании, довести объем раствора водой для инъекций до метки и перемешать. 5,0 мл полученного раствора поместить в мерную колбу вместимостью 250 мл и довести объем раствора водой до метки и перемешать.

К 1,0 мл полученного раствора прибавить 5,0 мл 1М раствора натрия гидроксида и 1 мл раствора внутреннего стандарта, энергично встряхивать в течение 1 мин, дают фазам расслоиться и хроматографировать верхний (органический) слой.

Приготовление 1 М раствора натрия гидроксида. 40 г натрия гидроксида поместить в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворить в воде, объем раствора довести водой до метки и перемешать.

Приготовление раствора внутреннего стандарта. 0,060 г РСО нафталина поместить в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворить в циклогексане, довести объем раствора циклогексаном до метки и перемешать.

1 мл полученного раствора поместить в мерную колбу вместимостью 25 мл, довести объем раствора циклогексаном до метки и перемешать.

Условия хроматографирования

Параметры колонки. Для проведения фармакопейного анализа рекомендуется использовать хроматографические колонки, имеющие внешний диаметр от 0,2 до 0,53 мм, изготовленного из капиллярно-кварцевого материала. В данной работе была выбрана колонка капиллярная кварцевая 25м x 0,32 мм (внутренняя поверхность покрыта слоем поперечно-сшитого полиметилфенилсилоксана толщиной 0,52 мкм). Кроме размера колонки, есть

ещё важные параметры, как температура и время, которые влияет на разделение пиков. В эксперименте использовали нижеуказанный режим:

- поддерживают температуру колонки 110°C в течение 4 мин, затем температуру повышают до 200°C со скоростью 8° в мин., и поддерживают такую температуру 5 мин.

Подвижная фаза. ГЖХ считается очень чувствительным прибором, поэтому для проведения анализов на этом приборе используется, только высокоочищенные газы (азот, гелий и др.) со значением чистоты 99,99%. В данной работе в качестве газа-носителя был использован азот, со скоростью 30 см/сек и с делением потока 10:1.

Температура вводимого блока и детектора ПИД. В данной работе была выбрана оптимальная температура для вводимого блока 200 °C и для детектора ПИД 250 °C.

Параметры пригодности хроматографической системы.

В данном исследовании ориентировались на требования, указанные в таблице 23. При этом опирались на базовые требования, ряд из которых регламентируется зарубежными фармакопеями. Для повышения точности и воспроизводимости анализа стремились к достижению более высоких показателей.

Таблица 17

Требования к параметрам пригодности хроматографической системы, принятые в данной работе

Параметр	Базовое требование	Желательное значение
Эффективность (N)	Не менее 1500 т.т.	Не менее 3000 т.т.
Фактор симметрии (As)	От 0,8 до 2,0	От 0,8 до 1,5
Относительное стандартное отклонение (RSD)	Не более 2,0%	Не более 1,5%

В данной работе мы придерживались той позиции, что при разработке методик анализа на современных аналитических колонках следует ориентироваться на минимальное значение эффективности не менее 1500 т.т., так как значения менее 1000-1500 характерны для сильно «размытых» пиков.

При этом достижение значений эффективности 4000 т.т. и более является предпочтительным, поскольку это позволяет более точно проводить количественный анализ, а также разделять примеси при невысоких значениях селективности.

Настоящее исследование показало, что, действительно, пики N,N - диметиланилина имеют тенденцию к образованию больших «хвостов». Поэтому, в первом приближении, ориентировались на максимальное значение фактора симметрии 2,0. Однако при разработке методик анализа всё же старались получать значения фактора симметрии от 0,8 до 1,5.

В настоящей работе в качестве основного ориентира также служило RSD 2,0%, но стремились к тому, чтобы при анализе значение данного параметра было не более 1,5%.

Полученные результаты

Проводили анализ определения содержания N,N – диметиланилина по разработанной методике и хроматографировали последовательно бланк, стандарт и испытуемый образец.

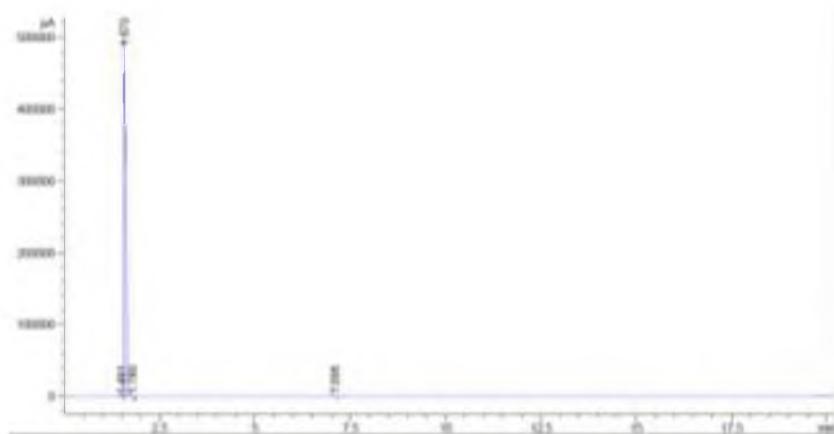


Рисунок 20. Хроматограмма раствора бланк. В хроматограмме видно, что кроме пиков циклогексана (время удерживания – 1,570 мин.) и внутреннего стандарта нафтилина (время удерживания – 7,096 мин.) нет других пиков.

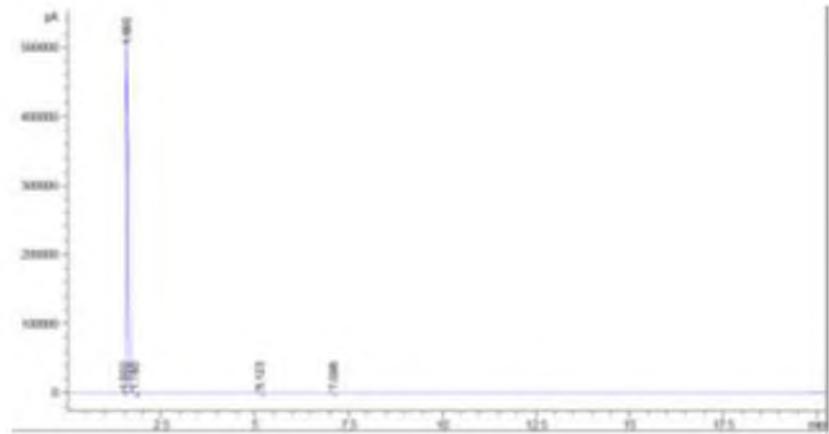


Рисунок 21. Хроматограмма раствора стандарта. В хроматограмме видно, что кроме пика циклогексана (время удерживания – 1,565 мин.), есть ещё пик N,N – диметиланилина (время удерживания – 5,123 мин.) и нафталина (время удерживания – 7,096 мин.).

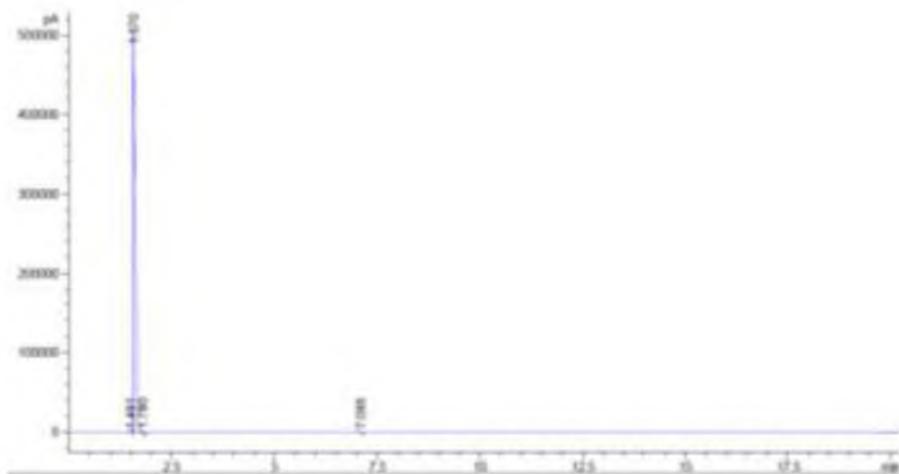


Рисунок 22. Хроматограмма испытуемого раствора. В хроматограмме препарата «Витаксон» не обнаружено содержание N,N – диметиланилина.

5.2. Определение содержания 2-этилгексановой кислоты.

Испытание на содержание 2-этилгексановой кислоты проводили методом газовой хроматографии. По 1 мкл испытуемого раствора и стандартного раствора попаременно хроматографировали на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором, получая не менее 3 хроматограмм для каждого из растворов.

Приготовление растворов

Приготовление испытуемого раствора. 0,3000 г препарата растворить в 4 мл кислоты хлористоводородной. К полученному раствору прибавить 1,0 мл раствора внутреннего стандарта, энергично встряхивать, дать расслоиться и хроматографировать верхний (органический) слой.

Приготовление стандартного раствора. 0,0750 г 2-этилгексановой кислоты РСО поместить в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворить в растворе внутреннего стандарта, довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать. К 1,0 мл полученного раствора прибавить 4 мл кислоты хлороводородной, энергично встряхивать, дать расслоиться и хроматографировать верхний (органический) слой.

Приготовление раствора внутреннего стандарта. 0,050 г 3-циклогексилпропионовой кислоты РСО поместить в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворить в циклогексане, довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать.

Условия хроматографирования

Параметры колонки. Для проведения фармакопейного анализа рекомендуется использовать хроматографические колонки, имеющие внешний диаметр от 0,2 до 0,53 мм, изготовленного из капиллярно-кварцевого материала. В данной работе была выбрана колонка капиллярная кварцевая 10 м × 0,53 мм (неподвижная фаза макрогол 20 000 2-нитротерефталата) с толщиной пленки 1 мкм. Кроме размера колонки, есть ещё важные параметры, как температура и время, которые влияет на разделение пиков. В эксперименте использовали нижеуказанный режим:

- температура колонки: начальная 40 °C (задержка 2 мин) с повышением до 200 °C со скоростью 30 °C/мин (задержка 3 мин).

Подвижная фаза. ГЖХ считается очень чувствительным прибором, поэтому для проведения анализов на этом приборе используется, только высокоочищенные газы (азот, гелий и др.) со значением чистоты 99,99%. В данной работе в качестве газа-носителя был использован азот, со скоростью 10 мл/мин.

Температура вводимого блока и детектора ПИД. В данной работе была выбрана оптимальная температура для вводимого блока – 200 °С и для детектора ПИД – 300 °С.

Параметры пригодности хроматографической системы.

В данном исследовании ориентировались на требования, указанные в таблице 24. При этом опирались на базовые требования, ряд из которых регламентируется зарубежными фармакопеями. Для повышения точности и воспроизводимости анализа стремились к достижению более высоких показателей.

Таблица 17

Требования к параметрам пригодности хроматографической системы, принятые в данной работе

Параметр	Базовое требование	Желательное значение
Коэффициент разделения пиков, рассчитанный для пиков 2-этилгексановой кислоты и внутреннего стандарта	Не менее 2,0	Не менее 2,2
Фактор симметрии (As)	От 0,9 до 1,8	От 1,1 до 1,5
Относительное стандартное отклонение (RSD)	Не более 2,0%	Не более 1,5%

В данной работе мы придерживались той позиции, что при разработке методик анализа на современных аналитических колонках следует ориентироваться на минимальный коэффициент разделения пиков, рассчитанный для пиков 2-этилгексановой кислоты и внутреннего стандарта не менее 2,0. При этом достижение коэффициента разделения пиков 2,2 т.т. и более является предпочтительным, поскольку это позволяет более точно проводить количественный анализ, а также разделять примеси при невысоких значениях селективности.

Настоящее исследование показало, что, действительно, пики 2-этилгексановой кислоты имеют тенденцию к образованию больших «хвостов». Поэтому, в первом приближении, ориентировались на максимальное значение фактора симметрии 1,8. Однако при разработке методик анализа всё же старались получать значения фактора симметрии от 1,1 до 1,5.

В настоящей работе в качестве основного ориентира также служило RSD 2,0%, но стремились к тому, чтобы при анализе значение данного параметра было не более 1,5%.

Полученные результаты

Проводили анализ определение содержания 2-этилгексановой кислоты по разработанному методики и хроматографировали последовательно бланк, стандарт и испытуемый образец.



Рисунок 23. Хроматограмма раствора бланк. В хроматограмме видно, что кроме пиков циклогексана (время удерживания – 0,470 мин.) и внутреннего стандарта 3-циклогексилпропионовой кислоты (время удерживания – 7,689 мин.) нет других пиков.

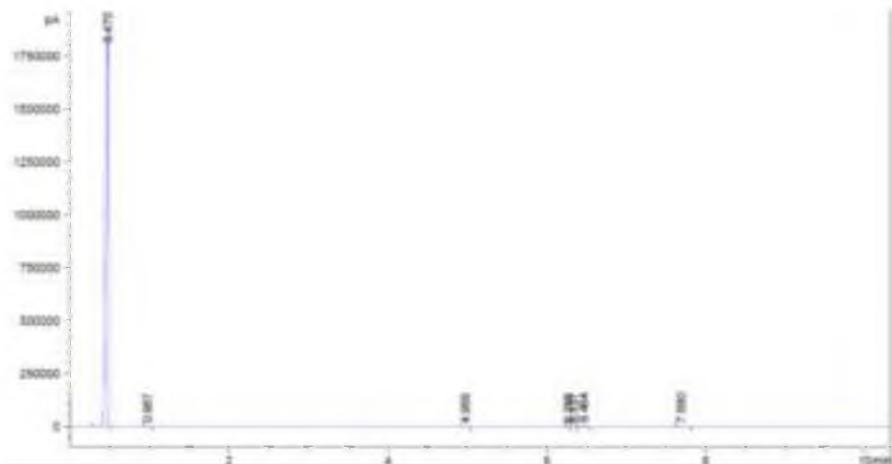


Рисунок 24. Хроматограмма раствора стандарта. В хроматограмме видно, что кроме пика циклогексана (время удерживания – 0,470 мин.), есть ещё пики 2-этилгексановой кислоты (время удерживания – 6,464 мин.) и 3-циклогексилпропионовой кислоты (время удерживания – 7,690 мин.).

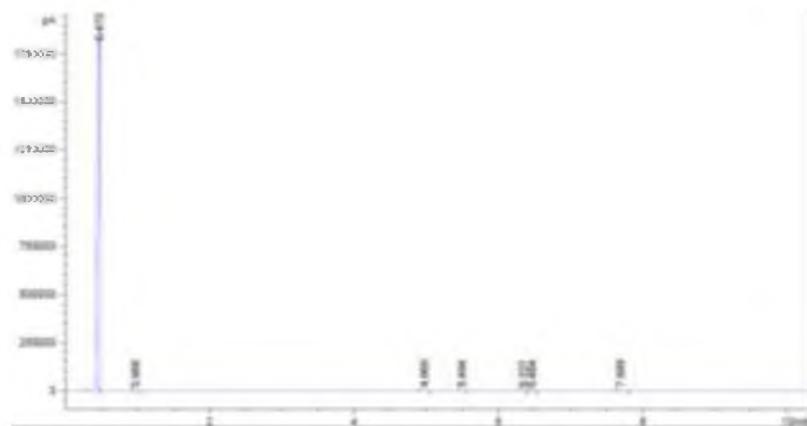


Рисунок 25. Хроматограмма испытуемого раствора. В хроматограмме препарата «Витаксон» содержит 0,0091% 2-этилгексановой кислоты (время удерживания – 6,464 мин.).

5.3. Определение содержания дихлорметана и ацетона.

Испытание на определение содержания остаточного количества органических растворителей (метиленхлорид, ацетон) проводили методом газовой хроматографии. По 1 мл паровой фазы раствора препарата и стандартного раствора III попаременно хроматографировали на газовом хроматографе оснащенным прибором HeadSpace, с пламенно-ионизационным детектором, получая не менее 3 хроматограмм для каждого из растворов.

Приготовление растворов

Приготовление раствора препарата. 0,1 г препарата и 1 мл воды поместить во флакон, укупорить инертной крышкой и обваливать алюминиевым колпачком.

Приготовление стандартного раствора I. 0,2 г РСО метилена хлористого поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворить в воде, довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать.

Приготовление стандартного раствора II. 0,05 г РСО ацетона поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворить в воде, довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать.

Приготовление стандартного раствора III. По 5 мл полученных растворов (I и II) поместить в мерную колбу вместимостью 50 мл довести объем раствора водой до метки и перемешать.

1 мл полученного раствора поместить во флакон, укупорить инертной крышкой и обваливать алюминиевым колпачком.

Условия хроматографирования

Параметры колонки. Для проведения фармакопейного анализа рекомендуется использовать хроматографические колонки, имеющие внешний диаметр от 0,2 до 0,53 мм, изготовленного из капиллярно-кварцевого материала. В данной работе была выбрана колонка капиллярная кварцевая 30м×0,53мм с толщиной пленки 1,8 мкм. Кроме размера колонки, есть ещё важные параметры, такие как температура и время, которые влияют на разделение пиков. В эксперименте использовали нижеуказанный режим:

- температуру колонки программируют: поддерживают температуру колонки 40°C в течение 15 мин, затем повышают температуру до 200°C со скоростью 10°C/мин, температуру 200°C выдерживают в течение 5 мин.

Подвижная фаза. ГЖХ считается очень чувствительным прибором, поэтому для проведения анализов на этом приборе используется, только высокоочищенные газы (азот, гелий и др.) со значением чистоты 99,99%. В данной работе в качестве газа-носителя был использован азот, со скоростью 1,0 мл/мин и с делением потока 5:1.

Температура вводимого блока и детектора ПИД. В данной работе была выбрана оптимальная температура для вводимого блока – 180 $^{\circ}\text{C}$ и для детектора ПИД – 250 $^{\circ}\text{C}$.

Условия для парофазного пробоотборника (HeadSpace):

- температура термостата - 80 $^{\circ}\text{C}$;
- время термостатирования – 30 мин;
- температура блока ввода пробы - 85 $^{\circ}\text{C}$;
- температура линии переноса - 85 $^{\circ}\text{C}$;
- время подачи газа-носителя – 30 сек.

Полученные результаты

Проводили анализ определения содержания ацетона и дихлорметана по разработанной методике и хроматографировали последовательно стандарт и испытуемый образец.

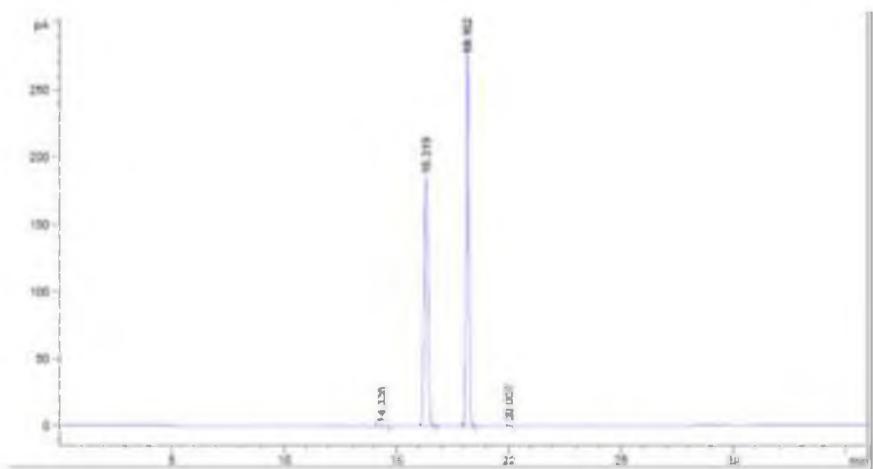


Рисунок 26. Хроматограмма раствора стандарта III. В хроматограмме 1-пик ацетона (время удерживания – 16,319 мин.) и 2-пик дихлорметана (время удерживания – 18,162 мин.).

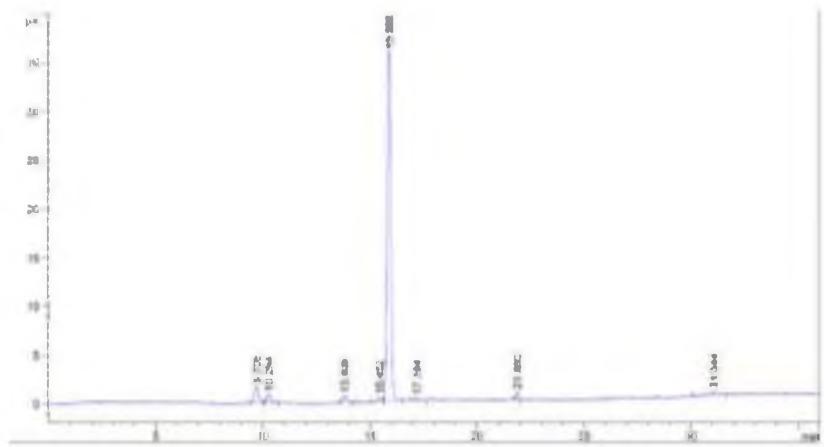


Рисунок 27. Хроматограмма испытуемого раствора. В хроматограмме препарата «Интралин» не обнаружено содержание дихлорметана, а содержание ацетона (время удерживания – 15,886 мин.) составляет 0,0102%.

ВЫВОДЫ

1. На основании сравнительной оценки требований к качеству ампициллина натрия по зарубежным фармакопеям и отечественной нормативной документации показана необходимость формирования оптимальных аналитических методик стандарта качества на лекарственное вещество «Ампициллина натрия» с включением разделов «Посторонние примеси», «Остаточные органические растворители», что отвечает современному уровню развития фармакопейного анализа в направлении гармонизации испытаний и норм.

2. Методом ВЭЖХ проведена экспериментальная оценка посторонних примесей в субстанциях ампициллина натрия различных производителей. Установлено, что количество примесей варьирует от трех до пяти с максимальным содержанием единичной примеси 1,15 % и димера ампициллина 1,09 %, что находится в пределах норм (не более 2,0 % и не более 4,5 %, соответственно).

3. Методом ГЖХ установлена природа и фактический уровень остаточных органических растворителей в анализируемых образцах ампициллина натрия. Показано, что все растворители относятся к третьему классу токсичности. Метилен хлористый в количестве от 0,0020 до 0,011 % был обнаружен в субстанциях, произведенных в Индии, Китая и России. N,N-диметиланилин отсутствует в образцах производства Индии и России. А в субстанциях производства Индии в количестве около 0,00011 %. 2-этилгексановая кислота в количестве от 0,0009 до 0,0027 % был обнаружен в субстанциях, произведенных в Индии, Китая и России.

4. Разработана унифицированная методика анализа лекарственных средств группы цефалоспоринов с использованием метода ГЖХ для определения содержания N,N – диметиланилина, 2-этилгексановой кислоты, дихлорметана и ацетона в лекарственных препаратах.

5. Подобраны оптимальные условия хроматографирования для определения остаточных органических растворителей: температурный режим, время и скорость, при проведении анализа.

6. После проведения анализов, при сравнении растворов: бланк, стандарта и испытуемого раствора видно, что в растворе бланк кроме пиков циклогексана

и внутреннего стандарта нафтилина нет других пиков, в хроматограмме раствора стандарта, кроме пика циклогексана, наблюдается пик N,N – диметиланилина и нафтилина, а в хроматограмме испытуемого раствора препарата «Витаксон» не обнаружено содержания N,N – диметиланилина.

7. В результате полученных данных можно сделать вывод, что препарат «Витаксон», основным действующим веществом которого является Цефтриаксона натриевая соль, свободен от содержания остаточного органического растворителя N,N – диметиланилина.

8. В результате полученных данных, при проведении анализа на определение содержания ацетона и дихлорметана по разработанной методике, хроматографировали последовательно стандарт и испытуемый раствор. При сравнении раствора стандарта и испытуемого раствора видно, что на хроматограмме раствора стандарта, наблюдается пик ацетона и дихлорметана, а на хроматограмме испытуемого раствора препарата «Интралин» не обнаружено содержания дихлорметана.

9. В результате полученных данных можно сделать вывод, что препарат «Интралин», основным действующим веществом которого является Цефазолина натриевая соль, свободен от содержания остаточных органических растворителей дихлорметана.

10. В результате полученных данных, при проведении анализа на определение содержания N,N – диметиланилина, 2-этилгексановой кислоты, дихлорметана и ацетона, относительное стандартное отклонение (RSD) составило не более 1,5%.

11. Разработано оптимальных и экспрессных методов анализа по определению «Посторонние примеси», «Остаточные органические растворители» в субстанциях.

12. На основании полученных экспериментальных результатов показана целесообразность устанавливать природу органических растворителей в субстанциях, поступающих для регистрации в РУз с целью последующего использования для производства лекарственных препаратов, что позволяет судить о технологии их получения и выявить производителя конкретной субстанции.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1.....	6
1.1. Фармакологические аспекты. Введение	6
1.2. Пенициллиновые лекарственные средства: история открытия и механизмы действия.....	6
1.3. Классификация пенициллинов.....	9
1.4. Номенклатура цефалоспоринов.....	10
1.5. Применение β-лактамидов в медицине.....	13
1.6. Строение и синтез.....	15
ГЛАВА 2.	23
2.1. Оборудование и аппаратура.....	233
2.2. Материалы, реактивы и объекты анализа.....	244
2.3. Методы и техника эксперимента	266
2.4. Требования к качеству субстанции ампициллина натрия.....	29
2.5. Фармакопейные требования к качеству антибиотиков цефалоспоринового ряда.....	37
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОСТОРОННИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИЯХ АМПИЦИЛЛИНА НАТРИЯ	48
3.1. Материалы и методы исследования.....	48
3.2. Результаты и их обсуждение	51
ГЛАВА 4. ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ В СУБСТАНЦИЯХ АМПИЦИЛЛИНА НАТРИЯ.....	58
4.1. Пределы содержания остаточных органических растворителей.....	599
4.2. Методы определения остаточных органических растворителей в лекарственных средствах.....	63
4.4. Результаты и их обсуждение.....	70
ГЛАВА V. АНАЛИЗ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ МЕТОДОМ ГЖХ.....	70
5.1. Определение содержания N,N-диметиламилина.....	76
5.2. Определение содержания 2-этилгексановой кислоты.....	80
5.2. Определение содержания дихлорметана и ацетона.....	84
ВЫВОДЫ.....	88
Литература	91

Литература

1. Автоматическая классификация и идентификация антибиотиков по колебательным спектрам / Трофимов А.Р., Федорченко Е.И., Урибе В.Д., Королева М.Я., Кульянов Е.Г. // «Достижения в области фармацевтического и химико-токсикологического анализа»: Сб. научн. трудов / ММА им. И.М. Сеченова; под ред. Арзамасцева А.П., Изотова Б.Н. — М., 1991. -С. 71 — 77.
2. Арзамасцев А.П. Основные направления создания и оценки качества лекарственных средств // Вопросы биологической медицины и фармацевтической химии. -2001. № 4. -С. 3-5.
3. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П. О необходимости нормирования остаточных органических растворителей в лекарственных и вспомогательных веществах. Медико-фармацевтический форум. Тезисы докладов.-М.-2002.-С. 135.
4. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Багирова В.Л. Основные аспекты совершенствования фармакопейного анализа // Химико-фармацевтический журнал. -2000. -№ 5. -С. 46-48.
5. Багирова В.Л., Киселева Г.С, Тенцова А.И. Методические указания по разработке теста «Растворение» на индивидуальные препараты // Фарматека. -1997. -№ 1. -С. 39 - 40.
6. Багирова В.Л., Прокофьева В.И., Сашенкова Н.С. Сравнительная характеристика теста «растворение» как метода оценки качества лекарственных препаратов по ГФ XI и зарубежным фармакопеям // Фармате-ка.-1995.-№6.-С.2-4.
7. Беллами Л. Новые данные по ИК-спектрам сложных молекул. -М.: Мир, 1971.-318 с.
8. Березкин В.Г., Пахомов В.П., Сакодынский К.И. Твердые носители в газовой хроматографии. -М.: Химия, 1975.
9. Вигдергауз М.С. Количественный газо-хроматографический анализ органических соединений. -Куйбышев, 1987.
10. Викулова С. Биоэквивалентность и дженерики: созданы друг для друга //

Ремедиум. -№ 12. -С. 30 - 32.

11. Волченок В.И., Урибе-Эчеваррия В.Д., Арзамасцев А.П. и др. Определение ампициллина натрия в присутствии димера ампициллина методом ВЭЖХ. Сб. «Актуальные вопросы клинической фармакологии». - 1984. -Вып. 2. -С. 45 - 49. -Деп. во ВНИИМИ 4.02.87 № 12759.
12. Волченок В.И., Мурашкина Л.В., Кукас В.Г. и др. Проникновение ампициллина через биологические мембранны // Химико-фармацевтический журнал. -1991. -№ 12. -С. 77 - 79.
13. ВФС 42-3422-99 «Ампициллина натрия».
14. Гиошон Ж., Гийемен К. Количественная газовая хроматография для лабораторного анализа и промышленного контроля. -М.: Мир, 1991. -Т. 2. - 375 с.
15. Государственная фармакопея СССР. - XI изд. - М., 1998. - Вып. 1. - С. 159.
16. Государственный реестр лекарственных средств. -М., 2002.
17. Дементьева Н.Н. Физико-химические и биологические методы анализа в контроле качества лекарственных средств. Юбилейный выпуск к 50-летию Института: Сб. ст. -Москва, 1994. -С. 168-191.
18. Дементьева Н.Н. Оценка качества и фармакокинетическое изучение лекарственных средств методом ГЖХ: (Алкалоиды, барбитураты, анестезирующие препараты). Диссертация на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук /1-й Московский медицинский институт им. И.М. Сеченова. Москва, 1988. - 375 с.
19. Журавлева М.В. Фармакокинетика, фармакодинамика и клиническая эффективность ампициллина. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / 2-й Московский государственный медицинский институт им. Н.И. Пирогова. -М, 1988. -24 с.
20. Заславская Г.С., Карпова Т.А., Никишина Л.Е. Определение остаточных растворителей в стероидных препаратах. «Гормональная регуляция в норме и при патологии»: Материалы областной юбилейной научной конференции, посвященной 70-летию основания Харьковского НИИ эндокринологии и химии гормонов, 19-20 декабря 1989 г., г. Харьков / Отв. ред. - А.И.

- Гладкова. -Харьков. -1989. -С. 133 - 134.
21. Изучение антиканцерогенных эффектов комбинации антибиотиков / В.Г. Беспалов, В.А. Александров, М.Ю. Лидак, А.К. Вейнберг // Химико-фармацевтический журнал. -1993. -№ 1. -С. 43 - 45.
22. Кабанов В.С., Кирюткин Г.В. Определение остаточных количеств растворителей в фитопрепаратах методом ГЖХ. Научные труды, 1988. -Т. 26.- С. 89-92.
23. Карташов В.С. Идентификация лекарственных средств - производных фенилпропионовой, фенилуксусной и антраксиловой кислот методом спектроскопии ЯМР // Вопросы биологической медицины и фармацевтической химии. -2001. -№ 4. -с. 38 - 40.
24. Кирсанова Т.Г. Анализ состояния фармацевтического рынка России // Фарматека. -1998. -№ 1. -С. 6 - 9.
25. Киселева Г.С. Биоэквивалентность и качество лекарственных средств. «Современные проблемы фармацевтической науки и практики: Сб. ст.» -М., 1999.-Ч. 1.-С. 117-122.
26. Киселева Г.С. Биофармацевтическая оценка качества лекарств // Фармацевтический вестник. -1998. -№ 8. -С. 21.
27. Контроль полупродуктов производства ампициллина натрия методами полярографии / В.И. Левина, СЮ. Рябова, Е.Ю. Хмельницкая, Н.Б. Григорьев // Вопросы биологической медицины и фармацевтической химии. -2000. -№ 2.-С. 39-43.
28. Либерман С.С, Яхонтов Л.Н. Противовоспалительные средства. -Итоги науки и техники, ВНИИТИ АМН СССР. -М., 1973. -Т. 4. -С. 127.
29. Либерман С.С., Яхонтов Л.Н. Противовоспалительные средства (антибиотики). Итоги науки и техники. Фармакология. Химико-терапевтические средства. -Токсикология. М., ВНИИТИ АН СССР, 1973. -Т. 4. -125 с.
30. Машковский М.Д. Лекарственные средства. -Изд. 13-е, новое-Харьков: Торсинг, 1997. -Том 1. -С. 172.
31. Мешковский А.П. Обеспечение качества фармацевтических субстанций за

- рубежом - сегодня и завтра // Фарматека. -2000. -№ 1. -С. 29 -34.
32. Мешковский А.П. Рекомендации ВОЗ в области определения эквивалентности воспроизведенных лекарственных препаратов // Фарматека. -1998. -№3. -С. 3-7.
33. Минченкова О.А. Изучение физико-химических свойств и разработка методик оценки качества антибиотиков. Диссертация на соискания ученой степени кандидата фармацевтических наук / Первый Московский медицинский институт им. И.М. Сеченова. -Москва, 1984.
34. Минченкова О.А., Лошинин А.Н., Урибе-Эчеваррия В.Д. и др. Идентификация полупродуктов синтеза ампициллина натрия методом ГЖХ. Изыскание новых способов изготовления лекарств и методов их исследования. Сб. научн. трудов. -М., 1983. -С. 45 - 46.
35. Митрука Б.М. Применение газовой хроматографии в микробиологии и медицине. Под ред. Проф. К.М. Синяка. -М.: Медицина, 1978. -607 с.
36. Насонов Е.Л. Пенициллиновые противовоспалительные препараты: (Перспективы применения в медицине). -М.: Анко, 2000. -с. 143.
37. Насыбуллина Н.М. Пенициллиновые противовоспалительные препараты и их лекарственные формы: (Обзор) // Химико-фармацевтический журнал. -1999. Т. 33. -№ 2. С. 30 - 35.
38. Некрошус Е.С., Решетняк В.Ю., Арзамасцев А.П. Координационные соединения переходных металлов с ампициллином // Фармация. -1990. -№ 4.- С. 40-43.
39. Некрошус Е.С., Арзамасцев А.П. Стойкость комплексов антибиотиков с переходными металлами // Фармацевтический журнал. —1992. -№ 1. -С. 76-78.
40. Обеспечение качества фармацевтических препаратов: Сб. рекомендаций и тематических материалов: [Перевод] / ВОЗ. -М., 1998. -VI. -С. 82.
41. Отраслевой стандарт 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения».
42. Спецификация SPC/050/04/14 на «Ampicillin Sodium Sterile», ООО «Jurabek Laboratories».
43. Потеря промышленного потенциала производства фармацевтических

- субстанций - фактор угрозы стратегической безопасности России. Проблема и предлагаемые пути решения / Ю.Т. Калинин, А.И. Мачула, М.И. Григорьев и др. // Химико-фармацевтический журнал. -2000. Т. 34. -№ 9. -С. 49 - 54.
44. Прикладная ИК-спектроскопия. -Пер. с англ. под ред. Д. Кендала. -М.: Мир, 1970.-С. 105-130.
45. Рейхарт Д.В., Багирова В.Л. Состояние и проблемы регистрации и качества субстанций для изготовления лекарственных средств. Медико-фармацевтический форум. Тезисы докладов. -М. —2002. -С. 135.
46. Решетняк В.Ю. Методологические аспекты анализа и стандартизации лекарственных веществ на основе их физико-химических характеристик. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук. -М. -1992. с. 45.
47. Рышкова Н.Е. Совершенствование методов стандартизации лиофильно высушенных лекарств на примере противоопухолевого препарата из класса нитрозомочевины. Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. -М. -2000. -с 150.
48. Садчикова Н.П. Совершенствование принципов и методов фармакопейного анализа в системе стандартизации лекарственных средств. Диссертация в виде научного доклада на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / ММА им. И.М. Сеченова. -Москва, 2001.-54 с.
49. Сакодынский К.И. Теория и практика газовой хроматографии. -Москва, 1977.
50. Сакодыский К.И., Нестерова Г.А., Чичиро В.Е. Использование газожидкостной хроматографии для определения летучих примесей в химико-фармацевтических препаратах. Тезисы докладов на III Всесоюзной конференции по аналитической химии органических соединений. -М.: Наука, 1976.-С. 92.
51. Салихов И.Г., Зиганшина Л.Е., Зиганшин А.У. Пенициллиновые антибиотики: Методическое руководство. -Казань: Государственный медицинский университет, 1997. —38 с.
52. Сигидин Я.Л., Шварц Г.Я., Арзамасцев А.П. и др. Лекарственная терапия воспалительного процесса. Экспериментальная и клиническая

53. фармакология противовоспалительного процесса. -М.: Медицина, 1988.-240 с.
54. Сильверстейн Р., Басслер Г., Морилл Т. Спектрометрическая идентификация органических соединений. -М.: Мир, 1977. -590 с.
55. Сравнительная оценка уровня требований к качеству ампициллина натрия /Т.М. Карманова, Е.Л. Ковалева, Н.П. Садчикова и др. // Фармация. -2002. -№> 1. -С. 13-15.
56. Страчунский Л.С., Козлов С.Н. Антибиотики. Клиническая фармакология - врачу. -Смоленск: Смоленская государственная медицинская академия, 1997. -с. 70.
57. Тринус Ф.П. Бета-лактамные противовоспалительные средства. -Киев: Здоровье, 1975. -С. 239 - 240.
58. Трофимов А.Р., Федорченко Е.И., Урибе-Эчеваррия В.Д. и др. Автоматическая классификация и идентификация антибиотиков по колебательным спектрам. Сб. научн. трудов «Достижения в области фармакологического и химико-токсикологического анализа». -М., 1991. -С. 71-77.
59. Тулаганов А.А. Стандартизация, контроль качества и фармакокинетика антибиотиков. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук / ММА им И.М. Сеченова. -Москва, 1992. - 42 с.
60. Чеботаренко Н.А. Фармакокинетика ампициллин натрия у детей при заболеваниях суставов. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / ММА им. И.М. Сеченова. -Москва, 1995.-22 с.
61. Шварц Г.Я. Успехи в изучении механизмов действия и создании новых антибиотиков // Химико-фармацевтический журнал. -1980. -Т. 14. -№ 29. -С. 22-41.
62. Bicchi C, Bertolio A. Determination of residual solvents in drugs by head-space gas chromatography. -Farmaco [Prat]. -1982, Mar; 37 (3). -P. 99 -97.
63. British Pharmacopoeia. Diclofenac sodium. -London. -1993. Addendum

- 1994.-p. 1320.
- 64.British Pharmacopoeia. Diclofenac sodium. -London. -1993. Addendum 1996.-p. 1759.
- 65.British Pharmacopoeia. Diclofenac sodium. -London. -1993. -p. 462.
- 66.British Pharmacopoeia. Diclofenac sodium. -London. -2006. -p. 559.
- 67.British Pharmacopoeia. Diclofenac sodium. -London. -2009.
- 68.Brooks P.M., Day R.O. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: differences and similarities / N. Engl. J. Med. - 1993. -V. 324. -P. 1716 - 1725.
- 69.Camarasu C, Mezei M., Varga G.B. Residual solvents determination in pharmaceutical products by GC-HS and GC-MS-SPMEII J. Pharm. Biomed. Anal. -1998 Dec; 18 (4 - 5). -P. 623 - 638.
- 70.Chan K.K.H., Vjas K.H., Whuck K.A. A rapid and sensitive method for determination of ampicillin sodium by high-performance liquid chromatography // Anal. Lett. -1982. -V. 15. -P. 1649.
- 71.Costa P., Lobo J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles II European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. - 2001. - № 13. -P. 123 - 133.
- 72.Diaz-Gonsales F., Gonsales-Alvaro I., Campanero M.R. et al. Prevention of in vitro neutrophil-endotelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal anti-inflammatory drugs II J. Clin. Invest. -1995. -V. 95. -P. 1756-1765.
- 73.European Pharmacopoeia. 8th edition, volume 2.0. Ampicillin sodium. - Council of Europe, Strasbourg, 2014. -p. 1564.
- 74.FID Guidelines for Dissolution Testing of Solid Oral Products II Final Draft. - 1995. Pharmacopeial Forum. -1995. -V. 21. -№ 5. -P. 1371 - 1379.
- 75.Flower R.S. Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis / Pharmacol. Rev. -1973. -V. 26. -P. 33 - 67.
- 76.Flower R.S., Grygleveski R., Herbacznska C.K. et al. Effect of antiinflammatory drugs on prostaglandin biosynthesis II Nature (New Biol.). - 1972.-V. 238.-P. 104-106.
- 77.Flower R.S., Vane J.R. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explain

- the antipyretic activity of paracetamol (4-acetaminophenol) //Nature. -1972.-V. 240. -P. 410-411.
- 78.Fowler P.D. Voltarol: ampicillin sodium II Clin. Rheumatol. Dis. -1979. -V. 5.-P. 427-464.
- 79.Franke J.P., Wijsbeek J., R.A. De Zeeuw et al. Systematic analysis of solvents and other volatile substances by gas chromatography II J. Anal. Toxicol. - 1988. -V. 12. -P. 20 - 24.
- 80.Guidance for industry. Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. - Office of training and communications. Division of communications management the drug information branch, HFD-210, 5600 Fishers Lane Rockville, MD 20857. - 1997.
- 81.Guidance for industry. Immediate release solid oral dosage forms. Scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls, in vitro dissolution testing and in vivo bioequivalence documentation. Center for drug evaluation and research (CDER). - 1995.
- 82.Guimbard S.P., Person M., Vergnaud J.P. Determination of residual solvents in pharmaceutical products by gas chromatography coupled to a head-space injection system and using an external standard II J. Chromatogr. -1987, Aug 21; 403.-P. 109-121.
- 83.Haky J.E., Strickney T.M. Automated gas chromatographic method for the determination of residual solvents in bulk pharmaceutical II J. Chromatogr. — 1985, Mar 8; 321 (1). -P. 137 - 144.
- 84.Hucker H.B., Kwan K.C., Duggan D.E. Pharmacokinetics and metabolism of non-steroidal anti-inflammatory agents II Progr. Drug. Metabol. -1980.-V. 5.- P. 166-221.
- 85.Ieiger U.P., Degen P.H., Sioufi A. Quantitative assay of diclofenac in biological material by gas-liquid chromatography II J. Chromatogr. -1975. -V. III. -P. 293 - 298.
- 86.Ikeda M., Kawase M., Hiramatsu M. et al. Improved gas chromatographic method of determination ampicillin II J. Chromatogr. -1980. -V. 183. -№ 1. - P. 41 - 47.

- 87.Investigation of Bioavailability and Bioequivalence Commission of the European Communities III /54/98-EN. -1991.
- 88.John V.A. The pharmacokinetics and metabolism of ampicillin sodium in animal and man II Rheumatol. Rehabil. -1979. -V. 17 (suppl.2).-P.2-ll.
- 89.Kandell M.S., Thornbill D.P. Willis J.V. Factors affecting the pharmacokinetics of ampicillin sodium //Rheumatol. Rehabil. -1979. -V. 17 (Suppl. 2).-P. 22-35.
- 90.Kujuba D.A., Herschman H.R. Dexamethason inhibits mitogen induction of the TISIO prostaglandin synthesis/cyclooxygenase gene II J. Biol. Chem. - 1992. -V. 267. -P. 7991 - 7994.
- 91.Lewis J. Leeson, J. Thuro Carstensen. Dissolution technology, 1974. -P. 58-106.
- 92.Martin S., Smith R. Some application of GC/MS in the forensic laboratory II Amer. Lab. -1978, 10, 5. -P. 53 - 54.
- 93.Martindale. The Extra Pharmacopoeia. Twenty-ninth edition. — London. -The Pharmaceutical Press. -1989.
- 94.Mfadden W. Techniques of combined gas chromatography/mass spectrometry: Application in organic analysis. -New York. -1973.
- 95.Mulligan K.S. Factors that influence the determination of residual solvents in pharmaceuticals by automated static head-space sampling coupled to capillary GC-MS II J. Chromatogr. Sci. -1995. -Jan; 33 (1). -P. 49 - 54.
- 96.Ojala M., Poutaleh M., Mattila I. et al. Analysis of residual solvents in pharmaceuticals with purge-and-membrane mass spectrometry II Rapid-Commun-Mass-Spectrom. -2000; 14 (11). -P. 994 - 998.
- 97.Owen S.C., Roberts M.S., Friesen W.T. Rapid high performance liquid chromatographic assay for the simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma II J. Chromatogr. -1987. -V. 416. -№ 2. -P.293 - 302.
- 98.Riess W., Stierlin H. Pharmacokinrtics and metabolism of the antiinflammatory agent voltaren II Scand. J. Rheumatol. -1978. -Suppl. 22. -P. 17 - 29.

- 99.Rodnan G.P., Benedek T.S. The early history of antirheumatic drugs I Arthritis Rheum. -1970. -V. 13. -P. 145 - 165.
- 100.Sarbu C, Marution C, Vlassa M. Direct fluorescence detection of non-steroidal antiinflammatory agents separated by TLC (9-isothiocyanatoacridine derivatives) II Chromatographia. -1986. -V. 21, № 10.-P. 590-600.
- 101.Sarbu C. Detection of some non-steroidal anti-inflammatory agents on thin-layer chromatographic plates coated with fluorescent mixture II J. of Chromatography. -1986. -V. 376. -P. 286 - 288.
- 102.Sayed Y.M.EL, Abdulhameed M.E., Suliman M.S. el al. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of ampicillin sodium in serum and its use in pharmacokinetic studies II J. Pharm. Pharmacol. -1988. -V. 40. -P. 727 - 729.
- 103.Sedivec V., Flek Y. Handbook of analysis of organic solvents. -New York. 1976.-P. 69-79.
- 104.Seibert K. Zhang Y., Leahy K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -1994. -V. 91. -P. 12013 - 12017.
- 105.Smith J.N., Willis A.L. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets II Nature (New Biol.). -1971. -V. 231. -P. 35 -237.
- 106.Schneider W. Degen P.H. Simultaneous determination of ampicillin sodium and its metabolites in plasma by capillary column gas chromatography with electron capture detection II J. Chromatogr. -1981. -V. 217. -№ 2. -P. 263-271.
- 107.Stierlin H., Faigle G. W. Biotransformation of ampicillin sodium in animal and man. II. Quantitative determination of the unchanged drug and principal phenolic metabolites in urine and bile II Xenobi-otica. -1979. -V. 9. -№ 10. -P. 611 - 621.
- 108.The Pharmacopoeia of Japan. Twelfth edition. English version. Ampicillin sodium. —Japan. -1991. -p. 258.
- 109.The United States Pharmacopeia. The National Formulary. USP
- 110.Ampicillin sodium. -Twinbrook Parkway, Rockville M.D. -1995. -p.3670.

- 111.The United States Pharmacopeia. The National Formulary. USP
- 112.Ampicillin sodium. -Twinbrook Parkway, Rockville M.D. -2000. -p.546.
- 113.The United States Pharmacopeia. The National Formulary. USP XXV.
Amicillin sodium. -Twinbrook Parkway, Rockville M.D.
- 114.The United States Pharmacopeia. The National Formulary. USP
115. Ampicillin sodium. -Twinbrook Parkway, Rockville M.D.
- 116.The United States Pharmacopeia. The National Formulary. USP
- 117.Ampicillin sodium. -Twinbrook Parkway, Rockville M.D.
- 118.Todd P.A., Sorkin E.M. Ampicillin sodium. A reappraising of its pharmacodinamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy II Drugs. -1988. -V. 35. -P. 244.
- 119.Tomas W.O. A., Jefferics T.M., Parfltt R.T. Determination of four non-steroidal anti-inflammatory agents and their metabolites in plasma and urine by HPLCII J. Pharm. Pharmacol. -1979. -V. 31. -№ 12 (Suppl. 91).
- 120.Vane J.R., Botting R.M. The history of anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. In. New Target in Inflammation. Inhibitors of COX-2 or adhesion molecules. Ed. N. Bazar. Acad. Publishers, 1966. -P. 1 -12.
- 121.Vane J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs //Nature (New Biol.). -1971. -V. 231. -P. 232 -235.
- 122.Verbeeck R.R., Blackburn G.L., Loewen Y.R. Clinical pharmacokinetics of non-steroidal anti-inflammatory drags II Clin. Pharmacokinet. -1983. -V. 8. - № 4. -P. 297 - 331.
- 123.Wessman G. Aspirin II Sci. Amer. -1991, 1 January. -P. 84 - 90.