

TOSHKENT FARMATSEVTIKA INSTITUTI KENGASHINING

2025 yil 04 iyundagi 10-sonli majlis bayonidan

KO'CHIRMA

Qatnashdilar:

Majlis raisi K.S.Rizayev
Kengash kotibi Z.V.Turdiyeva
Kengash a'zolari - 40 nafar

KUN TARTIBI:

5. Turli maslalar

5.1.5. 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.

TINGLANDJ:

Ushbu masala yuzasidan, Kengash kotibi Z.V.Turdiyeva so'zga chiqib, Toshkent farmatsevtika instituti Muammolar hay'atining 2025 yil 26 maydagi 7-sonli majlisida Farmalsevtik kimyo kafedrasi professori R.A. Xusainova tomonidan "Гармонизация и стандартизация показателей качества лекарственных препаратов цефалоспоринового ряда" nomli monografiya muhokama qilinganligi va chop etishga ruxsat olish uchun institut Kengashiga taqdim etilganligini aytdi.

Taqrizchilar: Mavlyanova M.B.- Farmatsevtika ta'lif va tadqiqot instituti, analitik va farmatsevtik kimyo kafedrasi dotsenti, farm.f.n. Zulfikariyeva D.A.-Toshkent farmatsevtika instituti, toksikologik kimyo kafedrasi professori, farm.f.d.

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

QAROR QILINDI:

Farmatsevtik kimyo kafedrasi professori R.A. Xusainova tomonidan "Гармонизация и стандартизация показателей качества лекарственных препаратов цефалоспоринового ряда" 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

**ГАРМОНИЗАЦИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ПРЕПАРАТОВ ЦЕФАЛОСПОРИНОВОГО РЯДА
(*Монография*)**



Ташкент 2025

В течение последнего десятилетия вопросы стандартизации и контроля качества лекарственных средств продолжают оставаться актуальными как на международном, так и на национальном уровне.

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. 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.

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.

В качестве объекта наших исследований был выбраны наиболее широко применяемые антибиотики из группы цефалоспоринного ряда. Качество готовых лекарственных средств в значительной степени определяется уровнем требований к исходным субстанциям, который должен быть не ниже фармакопейного и обеспечивать безопасность медицинского применения лекарственного средства. Учитывая вышеизложенное гармонизация и стандартизации лекарственных средств 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 определяет актуальность данной монографии.

Автор:

ХУСАИНОВА Р.А. – профессор кафедры фармацевтической химии Ташкентского фармацевтического института, д.фарм.н., проф

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.

ВВЕДЕНИЕ

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).

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 [1]. 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 [2, 3, 4]. 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 [5, 6, 7].

Фармакологические аспекты цефалоспоринов

Цефалоспорины - бактерицидные антибиотики, обладающие широким спектром антимикробного действия, охватывающим большое число так называемых проблемных возбудителей, в том числе пенициллиназообразующие стафилококки, энтеробактерии, в частности клебсиеллы; как правило, цефалоспорины хорошо переносятся, их аллергизирующее действие выражено относительно мало.

Общим фрагментом в химической структуре β -лактамных антибиотиков является бета-лактамное кольцо, именно с его наличием связана микробиологическая активность этих препаратов.

Цефалоспорины занимают первое место среди всех антимикробных препаратов по частоте применения. Популярность этих антибиотиков объясняется наличием у них многих положительных качеств, в их числе:

- широкий спектр антимикробного действия с учетом всех препаратов этого класса, охватывающий практически все микроорганизмы, за исключением энтерококков, хламидий и микоплазм; бактерицидный механизм действия;

- устойчивость к бета-лактамазам стафилококков у препаратов I и II поколений и грамотрицательных бактерий у препаратов III и IV поколений; хорошая переносимость и небольшая частота побочных проявлений;
- простота и удобство дозирования. Классификация цефалоспориновых антибиотиков основана на их спектре антимикробной активности [14, с.144; 15, с.531; 16, с.368].

Механизм бактерицидного действия цефалоспоринов связан с повреждением клеточной мембраны бактерий, находящихся в стадии размножения, что обусловлено специфическим ингибирированием ферментов клеточных мембран.

Цефалоспорины оказывают бактерицидное действие, которое связано с нарушением образования клеточной стенки бактерий. По антимикробному действию относятся к антибиотикам широкого спектра действия, устойчивы к пенициллиназе. [17, с.320; 18, с. 272; 19, с. 379; 11].

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА **Высокоэффективная жидкостная хроматография.**

Жидкостная хроматография - метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой является жидкость. Подвижная фаза в жидкостной хроматографии выполняет двоякую функцию:

- 1) обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке (подобно подвижной фазе в газовой хроматографии);
- 2) регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ. В ЖХ природа подвижной фазы имеет существенно большее значение. В результате комбинации ограниченного числа сорбентов и неограниченного числа, различных по составу, подвижных фаз возможно решение чрезвычайно большого числа встречающихся на практике задач. Метод ЖХ применим для

разделения значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, поскольку большая часть веществ не обладает летучестью, а многие вещества неустойчивы при высоких температурах. В ЖХ разделение обычно происходит при комнатной температуре [20, с.55-56; 21, с.77-78; 22, с.616].

ЖХ подразделяется на варианты в соответствии с характером основных проявляющихся межмолекулярных взаимодействий:

- в ситовой хроматографии разделение компонентов осуществляется за счет разницы в растворимости молекул при их прохождении (фильтрации) через слой сорбента;
- в адсорбционной хроматографии – за счет разницы в адсорбируемости молекул, проходящих через слой частиц сорбента, покрытых неподвижной фазой в виде тонкого слоя или поверхностнопривитых радикальных групп;
- в ионообменной и ионной хроматографии – за счет разницы в способности к обмену ионами с ионообменниками;

Для анализа объектов окружающей среды наиболее широко используют ВЭЖХ в адсорбционном и ионообменном вариантах [23, с.288; 24, с.528; 25, с.294-301].

Молекулярная адсорбционная хроматография.

В зависимости от природы подвижной (ПФ) и неподвижной (НФ) фазы различают нормально-фазовую (НФХ) и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографию. В нормально-фазовой ВЭЖХ НФ – полярная (чаще всего силикагель), а ПФ – неполярная (гексан, либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями – хлороформом, спиртами и т.д.). Удерживание веществ растет с увеличением их полярности. Разделения компонентов достигают, меняя элюирующую силу подвижной фазы, которая зависит от энергии взаимодействия компонентов ПФ с поверхностью НФ. В нормально-фазовой хроматографии элюирующая способность ПФ увеличивается с ростом ее полярности.

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами C8, C18); ПФ – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Наименьшей элюирующей способностью обладает вода, а для повышения элюирующей способности в ПФ вводят ацетонитрил, метанол и другие растворители. Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы [26, с.236-243; 27, с.85-96; 28, с.2-6; 29, с.207-228].

Подвижная фаза, прежде всего, должна растворять разделяемые компоненты. Основными характеристиками подвижных фаз являются ее элюирующая способность и селективность. Элюирующая способность подвижной фазы – это ее способность вступать в межмолекулярные взаимодействия с разделяемыми соединениями и группами на поверхности сорбента. Эти взаимодействия способствуют десорбции разделяемых соединений, более быстрому перемещению хроматографических зон. Многократное увеличение гибкости метода ВЭЖХ достигается за счет применения в качестве подвижных фаз смесей растворителей. Принцип составления таких смесей прост. Необходимо взять два индивидуальных растворителя, один из которых имеет заведомо недостаточную элюирующую силу, а другой – заведомо избыточную, варьируя соотношение растворителей, можно получить нужную элюирующую способность. Под этим обычно имеют в виду, что на данном сорбенте данный сорбат будет иметь приемлемое значение фактора удерживания. Помимо элюирующей способности подвижная фаза должна обладать селективностью по отношению к компонентам разделяемой смеси. Селективность подвижных фаз связана с их способностью к специфическим взаимодействиям с сорбатами, определяемыми их структурными признаками. Благодаря разному характеру взаимодействий значение элюирующей способности по отношению к сорбатам различного строения будет отличаться, что и

позволит их разделить. Селективность, как и элюирующая способность, определяется в первую очередь природой более сильного компонента смеси [30; 31, с.207-2013; 32, с.517-530].

Элюотропные ряды являются простейшей формой оценки силы индивидуальных растворителей. Они дают количественную оценку адсорбционной способности растворителей в тех или иных вариантах хроматографического разделения. Элюотропный ряд – это перечень растворителей, расположенных в порядке возрастания элюирующей способности, которая может быть охарактеризована различными параметрами [33, с.288]. В качестве таких параметров используют:

- параметр адсорбционной силы растворителя ϵ^0 , который представляет собой относительную энергию взаимодействия молекул подвижной фазы с поверхностью адсорбента;
- параметр P' (параметр Снайдера), который рассчитывают, как сумму логарифмов коэффициентов распределения стандартных веществ (этанола, диоксана и нитрометана) между паровой фазой и испытуемым растворителем;
- параметр S , который отражает чувствительность величин удерживания к изменению состава подвижной фазы. Эта величина предложена для ОФ ВЭЖХ.

Свойства растворителей, используемых в ВЭЖХ приведены в таблице 16.

Основой всех способов классификации селективности является различная способность растворителей вступать в межмолекулярные взаимодействия различных типов, представление интегрального параметра элюирующей силы в виде суммы парциальных величин, характеризующих протонодонорные, протоноакцепторные, диполь-дипольные и некоторые другие свойства растворителей. Снайдер разбил 81 исследованный растворитель на восемь классов, которые определенным образом располагаются в треугольнике селективности (рис. 1). Его вершинам

отвечают гипотетические растворители, способные к взаимодействиям только одного типа: X_e – протонодонорным, X_d – протоноакцепторным и X_n – диполь-дипольным [34, с.106-166; 35, с.166]. Окружности в его пределах изображают области, соответствующие реально существующим растворителям, поделенным на восемь групп селективности:

I – алифатические простые эфиры, амины; II – алифатические спирты; III – пиридины, тетрагидрофуран, амиды (кроме формамида); IV – гликоли, уксусная кислота, формамид; V – метиленхлорид, этиленхлорид; VI – алифатические кетоны и сложные эфиры, диоксан, сульфоны, нитрилы; VII – ароматические углеводороды, нитросоединения; VIII – фторированные спирты, вода, хлороформ.

Таблица 1

Свойства растворителей для ВЭЖХ

Растворитель	Предел прозрачности для УФ-света, нм	Элюирующая сила ϵ^0 на силикагеле	Параметр R'	Параметр S	Группа селективности
Ацетонитрил	190	0,50	5,8	3,1	VI
Вода	-	1,50	10,2	0,0	VIII
Гексан	190	0,01	0,1	-	-
Диоксан	215	0,45	4,8	3,5	VI
Метанол	205	0,7	5,1	3,0	II
Метиленхлорид	233	0,32	3,1	-	V
Пропанол-2	205	0,55	3,9	4,2	II
Тетрагидрофуран	212	0,44	4,0	4,4	III
Толуол	285	0,1	2,4	-	VII
Триэтиламин	-	-	1,9	-	I
Уксусная кислота	-	-	6,0	-	VI
Хлороформ	245	0,26	4,1	-	VIII
Этанол	210	0,6	4,3	3,6	II
Этилацетат	256	0,38	4,4	-	VI

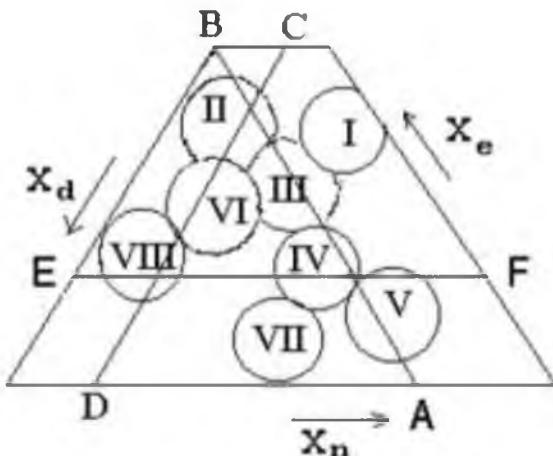


Рис. 1. Классификация растворителей по Снайдеру.

Кругами выделены области, в которых группируются растворители по селективности: X_e – способность к протонодонорным взаимодействиям; X_d – способность к протоноакцепторным взаимодействиям; X_n – способность к диполь-дипольным взаимодействиям.

AB, CD и EF - тренды изменения способности к соответствующим взаимодействиям.

Этот наглядный подход позволяет предвидеть насколько вероятно изменение селективности при замене одного растворителя другим. Растворители одной группы сходны по селективности, максимального изменения селективности можно ожидать при замене одного растворителя на другой из группы, наиболее удаленной на треугольнике [36, с.412-416, 37, с.1289-1298].

Для улучшения разделения высокополярных и ионогенных компонентов и формы хроматографического пика в подвижную фазу вводят специфические добавки: фосфорную и уксусную кислоты при разделении соединений кислотного характера; аммиак и алифатические амины при разделении соединений основного характера, алкилсульфаты натрия при разделении соединений анионного характера, соли тетраалкиламмония при разделении соединений катионного характера.

Обращенно-фазовая ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ)

Обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) имеет ряд преимуществ перед другими вариантами жидкостной хроматографии:

- это очень гибкий метод, так как, изменяя состав водно-органических смесей, используемых в качестве подвижной фазы, можно на одной колонке обеспечить разделение соединений различной природы;
- селективность данного метода почти всегда значительно выше, чем других вариантов хроматографии для всех соединений, кроме сильнополярных;
- при использовании гидрофобизированных силикагелей быстро устанавливается равновесие между подвижной и неподвижной фазой, эти сорбенты отличаются высокой эффективностью разделения;
- можно осуществлять разделение соединений, растворимых как в воде, так и в органических растворителях;
- возможность использования в подвижной фазе буферных растворов может улучшить селективность и эффективность разделения ионогенных соединений.

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижной фазой служат гидрофобизированные силикагели, которые получают при обработке силикагеля хлор- и алcoxисиланом. Широко в аналитической практике используют гидрофобизированные силикагели с привитыми октадецильными группами (C18). Плотность прививки составляет $1,1\text{--}2,3 \text{ нм}^2$. В зависимости от способа обработки свойства гидрофобизированных силикагелей могут изменяться, поэтому свойства коммерческих колонок различных фирм несколько отличаются [38, с.345-352; 39, с.300; 40, с.7146-7157]. Содержание углерода составляет 5-20%. Степень покрытия поверхности силикагеля органическим модификатором составляет 10-60%, в лучших случаях она достигает 90%. Наличие остаточных силанольных групп приводит к тому, что адсорбционный и ионообменный механизмы удерживания всегда сопутствуют обращенно-фазовому. Для уменьшения числа силанольных групп сорбенты дополнительно обрабатывают триметилхлорсиланом (это

называют эндкеппингом). В таблице 17 представлены типичные обращенно-фазовые сорбенты. Наиболее популярными являются силикагели следующих торговых марок: бондопак, лихросорб, порасил, сепарон, сферисорб, нуклеосил, кромасил. Недостатками обращенно-фазовых сорбентов на основе силикагеля являются ограниченно допустимый диапазон pH и сорбционная активность силанольных групп. Этого недостатка в значительной степени лишены колонки нового поколения фирмы «Феноминекс», ее колонка Луна C18 обладает стабильностью в диапазоне значений pH 1,5-10.

Механизм разделения соединений в этом варианте хроматографии пока до конца неясен. Наиболее удачными и распространенными являются теория, использующая представления о параметрах растворимости Гильдебранта, и сольвофобная теория Хорвата-Меландера. По теории, основанной на параметрах растворимости Гильдебранта, удерживание определяется молекулярными взаимодействиями разделяемых веществ с подвижной и неподвижной фазой [41, с.1845-1860; 42, с.1591-1597]. Зависимость фактора емкости вещества от состава подвижной фазы описывается уравнением

$$\ln k = A\varphi^2 + B\varphi + C \quad (8), \text{ где}$$

φ – объемная доля органического компонента (модификатора) в подвижной фазе, А, В и С – константы.

Однако поведение соединений сложного строения с несколькими функциональными группами часто не удается описать данной зависимостью. Более адекватно закономерности удерживания сорбатов в ОФ ВЭЖХ описываются сольвофобной теорией. Хорвартом и Миландером впервые было показано, что водные элюенты, не содержащие органических растворителей, могли быть использованы для разделения полярных биологических молекул на октадецилсиликагеле. Даже при отсутствии органического компонента в элюенте, взаимодействие между растворенным веществом и привитыми углеводородными радикалами неподвижной фазы, являлось причиной удерживания растворенного вещества. Что позволило сделать вывод о том, что удерживание в обращено-фазовом варианте в

основном определяется гидрофобными взаимодействиями [43, с.40-41; 44; 45; 46, с.51-64; 47].

Таблица 2
Сорбенты для обращенно-фазовой ВЭЖХ

Сорбент	S_p , м ² /г	Диаметр пор, нм	Диаметр частиц, мкм	Форма частиц
Адсорбсил С ₈	450	6	5, 10	Нерегулярная
Адсорбсил С ₁₈	450	6	5, 10	Нерегулярная
Адсорбсфер С ₈	200	8	3, 5, 10	Сферическая
Адсорбсфер С ₁₈	200	8	3, 5, 10	Сферическая
Алтима С ₈		10	5, 10	Сферическая
Алтима С ₁₈		10	5, 10	Сферическая
АльфаБонд С ₈	300	12,5	5, 10	Нерегулярная
АльфаБонд С ₁₈	300	12,5	10	Нерегулярная
М-Бондопак С ₁₈	300	10	10	Нерегулярная
М-Бондопак Фенил	300	10	10	Нерегулярная
Гиперсил С ₈	170	10	3, 5, 10	Сферическая
Гиперсил ОДС	170	10	3, 5, 10	Сферическая
Зорбакс С ₈	350	7	8	Сферическая
Зорбакс ОДС	350	7	8	Сферическая
Диасорб-130-С1	300-350	11	5, 7, 10	Нерегулярная
Диасфер 130-С8	300-350	11	5, 7, 10	Сферическая
Диасфер-130-С18Т	300-350	11	5, 7, 10	Сферическая
Лихросорб RP-2	300	6	10	Нерегулярная
Лихросорб RP 18	300	10	5, 10	Сферическая
Луна С ₁₈			3, 5	Сферическая
Луна С ₈			5	Сферическая
Нуклеосил С ₁₈		10	3, 5, 7, 10	Сферическая
Партицил ОДС-3		5	10	Нерегулярная
Сепарон С ₁₈		10	5, 10	Сферическая
Силасорб С ₂		10	5, 7, 10, 15, 20	Нерегулярная
Силасорб С ₈		10	5, 7, 10, 15, 20	Нерегулярная
Силасорб С ₁₈		10	5, 7, 10, 15, 20	Нерегулярная
Сферисорб С18		10	5, 7, 10, 15, 20	Сферическая

Важнейшую роль в понимании механизма удерживания обращенно-фазовой хроматографии сыграли работы Хорвата и его школы. Суть теории Хорвата заключается в следующем. Существует принципиальное различие между процессами сорбции на полярных поверхностях из относительно неполярных растворителей («нормально-фазовый режим») и сорбции из воды либо сильнополярных растворителей на неполярных поверхностях («обращенно-фазовый режим»). В первом случае, между молекулами сорбатов и неподвижных фаз образуются ассоциаты за счет кулоновских взаимодействий или водородных связей. Во втором случае, причиной ассоциации на поверхности являются так называемые сольвофобные взаимодействия в подвижной фазе. Для полярных подвижных фаз, в особенности содержащих воду, характерно сильное кулоновское взаимодействие и образование водородных связей между молекулами растворителей. Все молекулы в таких растворителях связаны довольно прочно межмолекулярными силами. Для того чтобы поместить в эту среду молекулу сорбата, необходимо образование «полости» между молекулами растворителя. Энергетические затраты на образование такой «полости» лишь частично покрываются за счет взаимодействия полярных групп в молекуле сорбата с полярными молекулами растворителя. В аналогичном положении по отношению к растворителю находятся и неполярные молекулы неподвижной фазы [48, с.388; 49, с.300]. С энергетической точки зрения более выгодно такое положение, когда поверхность раздела между полярной средой (растворителем) и неполярными фрагментами неподвижной фазы и молекул сорбата минимальна. Уменьшение этой поверхности и достигается при сорбции (рис. 2).

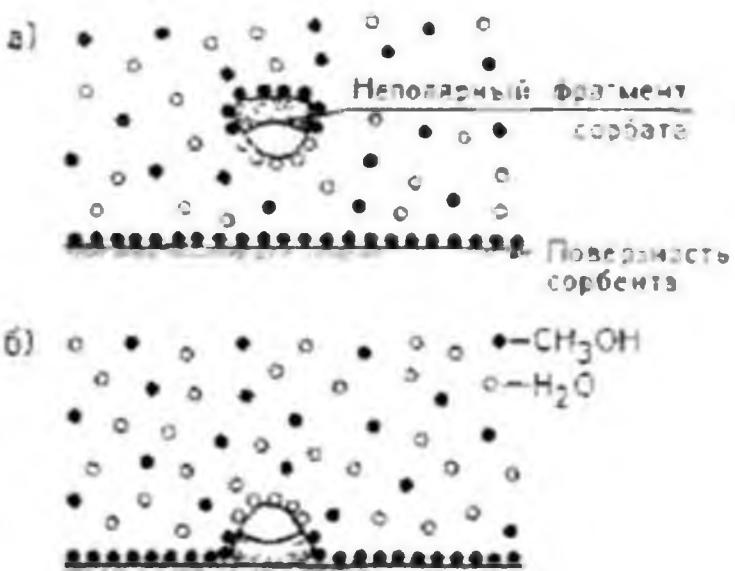


Рис. 2. К механизму обращенно-фазовой хроматографии: а – сорбат в растворе; б - сорбат на поверхности неподвижной фазы. Молекулы воды и органического растворителя обозначены светлыми и темными кружками соответственно.

Обращенно-фазовая хроматография широко применяется не только для разделения нейтральных соединений, но и ионогенных веществ. В принципе, и для таких соединений процесс сорбции описывается сольвофобной теорией. Однако сорбаты такого рода существуют в растворе и адсорбированном состоянии, как в виде нейтральных молекул, так и в виде ионов. Каждой из этих форм соответствует свое значение фактора удерживания. В зависимости от pH среды изменяются соотношение различных форм в растворе и факторы удерживания [50, с.134-142; 50, с.123].

В качестве подвижной фазы обычно используют смеси растворителей, т.к. это позволяет улучшить селективность и эффективность разделения и уменьшить время необходимое для его проведения.

Меняя состав подвижной фазы в ОФЖХ, можно изменять удерживание в очень широких пределах. Почти для всех анализируемых соединений удерживание в некоторых чистых растворителях (метанол, тетрагидрофуран) пренебрежимо мало, а в чистой воде чрезвычайно велико [51, с.31-37]. Поэтому, чтобы добиться приемлемого времени удерживания, обычно

необходимо использовать смеси воды с органическим растворителем – так называемым модификатором. Зависимость фактора удерживания вещества от состава подвижной фазы описывается уравнением

$$\lg k = b + pC \quad (9), \text{ где}$$

C – концентрация органического компонента (модификатора) в подвижной фазе, b и p – константы.

При постоянных условиях хроматографирования удерживание различных сорбатов определяется следующими факторами:

- гидрофобностью сорбатов;
- дипольным моментом;
- объемом их молекул;
- поляризацией;
- уменьшением площади неполярной поверхности при сорбции.

При описании взаимосвязи удерживания и свойств сорбатов наиболее популярны уравнения, связывающие факторы удерживания, измеряемые в хроматографической системе, с коэффициентами распределения (чаще всего в системе октанол – вода). Для соединений близкой структуры наблюдается линейная зависимость между логарифмами коэффициентов распределения и факторами удерживания:

$$\lg k' = a + b \lg P_i \quad (10), \text{ где}$$

P_i – коэффициент распределения вещества между водной и органической фазами.

Во многих случаях логарифм фактора удерживания линейно связан с числом повторяющихся структурных фрагментов:

$$\lg k' = a + b n \quad (11).$$

Самым распространенным дескриптором является число атомов углерода.

Эти соотношения полезны как при подборе состава подвижной фазы как при разделении, так и для идентификации компонентов смеси.

Для решения каждой конкретной задачи состав как подвижной, так и неподвижной фазы должен быть тщательно подобран с точки зрения, как физических, так и химических свойств ее компонентов [52, с.921-927; 53, с.98-103]. Общая схема выбора варианта ВЭЖХ в зависимости от природы разделяемых веществ показана на рис. 3.

Система для проведения разделения методом ВЭЖХ состоит из нескольких блоков: насоса, дозатора, колонки, детектора и регистрирующего устройства.

Рассмотрим основные типы насосов, используемых в ВЭЖХ [54].

Шприцевые насосы. Вращение прецизионного синхронного двигателя преобразуется в перемещение поршня в цилиндре. При движении поршня подвижная фаза либо поступает в цилиндр, либо выдавливается из него. Преимущество данного типа насоса – практически полное отсутствие пульсаций потока подвижной фазы, недостаток – невозможность создания градиента с помощью одного насоса.

Пневмоусилительные насосы. Обеспечивают постоянное давление на входе в колонку. Преимущества – отсутствие пульсаций потока, высокая надежность; недостаток – невысокая воспроизводимость объемной подачи подвижной фазы.

Плунжерные возвратно-поступательные насосы. С помощью электромеханического устройства приводится в возвратно-поступательное движение плунжер, перемещающийся в рабочей головке, в результате чего насос либо набирает подвижную фазу, либо подает ее с заданной скоростью. Преимущество – постоянная объемная подача подвижной фазы, недостаток – довольно большие пульсации потока, которые являются основной причиной повышенного шума и снижения чувствительности детектора.

Для ввода пробы в жидкостной хроматографии используют следующие типы дозаторов:

- дозирующая петля;
- дозаторы с мембраной (без остановки потока и с остановкой потока).

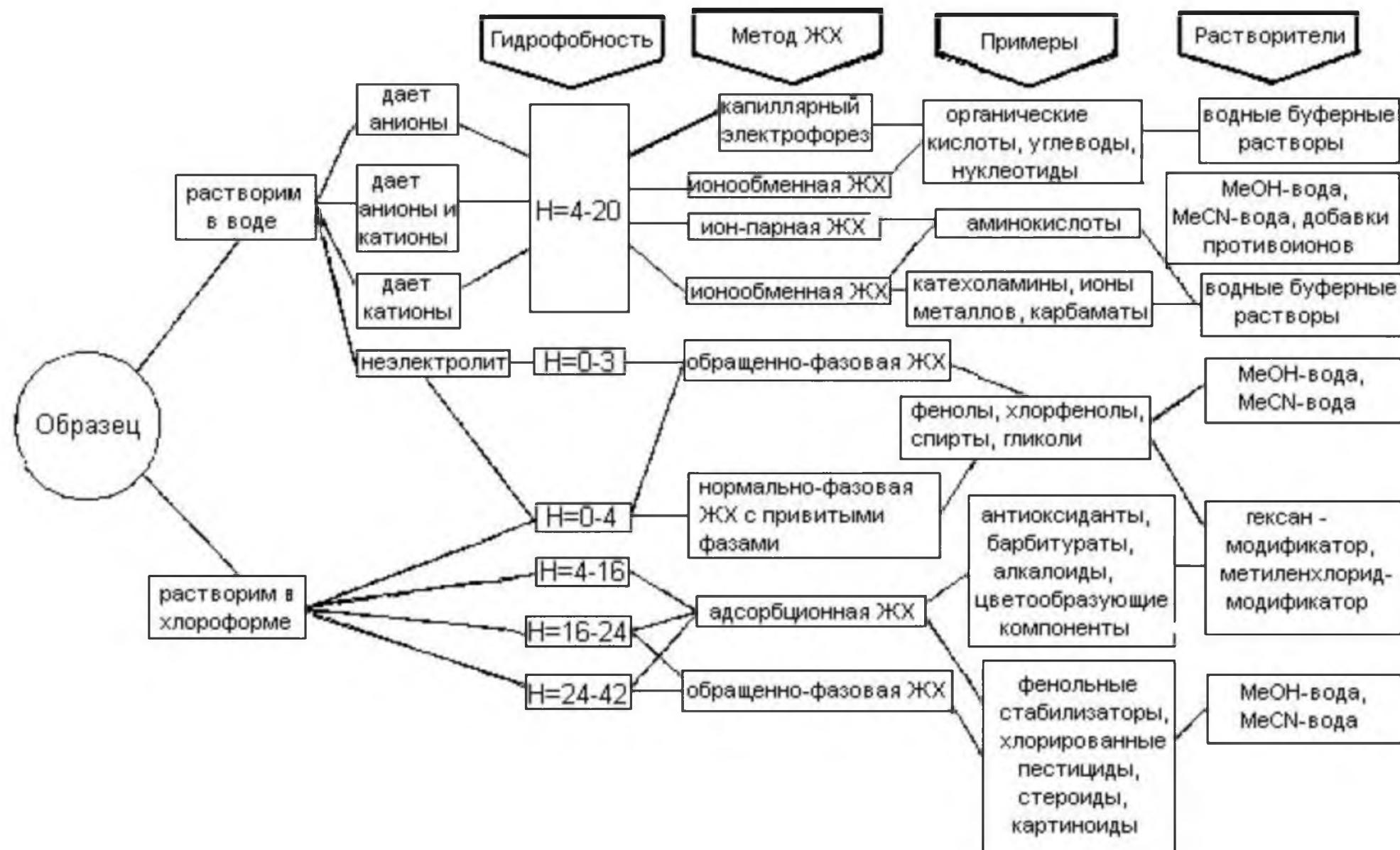


Рис. 3. Выбор условий ВЭЖХ с учетом гидрофобности разделяемых веществ.

Основные виды детекторов и их характеристики приведены в таблице 18. Наиболее распространенным детектором в адсорбционной ВЭЖХ является спектрофотометрический [55]. В процессе элюирования веществ в специально сконструированной микрокювете измеряется оптическая плотность элюата при заранее выбранной длине волны, соответствующей максимуму поглощения определяемых веществ. Такие детекторы измеряют поглощение света в ультрафиолетовой или видимой области спектра, причем первый вариант используется чаще. Это связано с тем, что большинство химических соединений имеют достаточно интенсивные полосы поглощения в диапазоне длин волн 200-360 нм. Фотометрические детекторы имеют достаточно высокую чувствительность. Чувствительность УФ-детектора может достигать 0,001 ед. оптической плотности на шкалу при 1% шума. При такой высокой чувствительности может быть зафиксировано до нескольких нг даже слабо поглощающих УФ веществ. Широкая область линейности детектора позволяет анализировать как примеси, так и основные компоненты смеси на одной хроматограмме. Возможности спектрофотометрического детектора существенно расширились после появления его современного аналога – детектора на диодной матрице (ДДМ), работающего как в УФ-, так и видимой области. В таком детекторе «матрица» фотодиодов (их более 200) постоянно регистрирует поглощение электромагнитного излучения в режиме сканирования. Это позволяет снимать при высокой чувствительности неискаженные спектры быстро проходящих через ячейку детектора компонентов. По сравнению с детектированием на одной длине волны, сравнение спектров, полученных в процессе элюирования пика, позволяет идентифицировать разделяемые компоненты с гораздо большей степенью достоверности.

Принцип действия флуориметрического детектора основан на измерении флуоресцентного излучения поглощенного света. Поглощение обычно проводят в УФ-области спектра, длины волн флуоресцентного излучения превышают длины волн поглощенного света. Флуориметрические

детекторы обладают очень высокой чувствительностью и селективностью. Наиболее важная область их применения детектирование ароматических полициклических углеводородов.

Амперометрический детектор применяют для определения органических соединений, которые могут быть окислены на поверхности твердого электрода. Аналитическим сигналом является величина тока окисления. В детекторе имеется по крайне мере два электрода – рабочий и электрод сравнения (хлоридсеребрянный или стальной), иногда устанавливают вспомогательный электрод, необходимый для подавления влияния омического падения напряжения в растворах низкой проводимости. Успех определения определяет выбор материала и потенциала рабочего электрода. В амперометрическом детекторе используют электроды из углеродных материалов, наиболее часто стеклоуглеродный, и металлические: платиновый, золотой, медный, никелевый. Потенциал рабочего электрода устанавливают в интервале 0 - +1,3 В. Можно проводить измерения либо при постоянном потенциале, либо импульсном режиме, когда задается трехступенчатая развертка потенциала, которая обеспечивает на разных стадиях – окисление вещества, очистку электрода и его регенерацию. Использование этого детектора особенно важно при определении фенолов, фенольных соединений, гидразинов, биогенных аминов и некоторых аминокислот.

Кондуктометрический детектор используют для определения неорганических анионов и катионов в ионной хроматографии. Принцип его работы основан на измерении электропроводности подвижной фазы в процессе элюирования вещества.

Исключительно информативным является *масс - спектрометрический детектор*, который обладает высокой чувствительностью и селективностью. Основная проблема, затрудняющая использование этого детектора, проблема ввода потока элюента в масс-спектрометр. Развитие микроколоночной хроматографии позволяет разработать системы прямого ввода потока элюента

в ионный источник масс-спектрометра. Используют масс-спектрометры высокого разрешения и достаточного быстродействия с химической ионизацией при атмосферном давлении или ионизацией с применением электрораспыления. Последние модели масс-спектрометров для жидкостной хроматографии работают в диапазоне масс m/z от 20 до 4000 а.е.м. Масс-спектрометрический детектор предъявляет жесткие требования к чистоте растворителей, является дорогостоящим и сложным в обращении.

Таблица 3

**Детекторы для высокоэффективной жидкостной хроматографии,
используемые в анализе объектов окружающей среды**

Вид детектора	Измеряемый параметр	Минимально определяемое количество, г	Селективность
Спектрофотометрический	Оптическая плотность	10^{-10}	Высокая
Флуориметрический	Интенсивность флуоресценции	10^{-11}	Очень высокая
Кондуктометрический	Электропроводность	10^{-9}	Низкая
Амперометрический	Величину тока	$10^{-11} - 10^{-9}$	Очень высокая
Масс-спектрометрический	Величину ионного тока	$10^{-12} - 10^{-10}$	Очень высокая

Стандартные образцы

- Цефазолин: фармакопейный стандартный образец, The United States Pharmacopeial Convention, США;
- Цефтриаксона натриевая соль: фармакопейный стандартный образец, The United States Pharmacopeial Convention, США;
- Цефотаксима натриевая соль: фармакопейный стандартный образец, The United States Pharmacopeial Convention, США;
- Цефоперазона натриевая соль: фармакопейный стандартный образец, EDQM Council of Europe, Франция;
- Цефтазидим: фармакопейный стандартный образец, EDQM Council of Europe, Франция;
- Цефепим дигидрохлорид моногидрат: фармакопейный стандартный образец, EDQM Council of Europe, Франция;
- Цефепим примесь Е: фармакопейный стандартный образец, EDQM Council of Europe, Франция.

Субстанции

- Цефазолина натриевая соль: субстанция, Harbin Pharmaceutical Group CO., LTD, Китай;
- Цефтриаксона натриевая соль: субстанция, Kyongbo Pharmaceutical Co., Ltd, Корея;
- Цефотаксима натриевая соль: субстанция, Harbin Pharmaceutical Group CO., LTD, Китай;
- Цефоперазон натриевая соль: субстанция, Zhuhai United Laboratories CO., LTD, Китай;
- Цефтазидим с карбонатом натрия: субстанция, Kyongbo Pharmaceutical Co., Ltd, Корея;
- Цефепим дигидрохлорид: субстанция, Zhuhai United Laboratories CO., LTD, Китай.

Препараты

- «Витаксон» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 г и 1,0 г, ООО «Jurabek Laboratories», Узбекистан;
- «Цефтриаксон» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 г и 1,0 г, «Борисовский Завод Медицинских Препараторов», Республика Беларусь;
- «Цефтриаксон» порошок для приготовления инъекционного раствора 0,5 г и 1,0 г, «Биосинтез ПАО», Россия;
- «Цефтриаксон-Астрафарм» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 г №5 во флаконах, ООО «Астрафарм», Украина;
- «Интралин» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 г и 1,0 г, ООО «Jurabek Laboratories», Узбекистан;
- «Рефлин» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 г и 1,0 г, ООО «Ранбакси Лабораториз», Индия;
- «Цефазолин» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 г и 1,0 г, ООО «Здоровье», Украина;
- «Цефазолин-МИП» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 г и 1,0 г, ООО «Хефасаар», Германия;
- «Цефамезин» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 г и 1,0 г, ООО «Эджзаджибаши», Турция;
- «Цеффаст» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 г и 1,0 г, ООО «Jurabek Laboratories», Узбекистан;
- «Сефотак» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 г и 1,0 г, ООО «Эджзаджибаши», Турция;
- «Такс-о-бид» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 г и 1,0 г, ООО «Орхид Фарма», Индия;
- «Цефотаксим-Лек» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 г и 1,0 г, ООО «Сандоз», Польша;

- «Экстреф» порошок для приготовления инъекционного раствора по 1,0 г и 2,0 г, ООО «Jurabek Laboratories», Узбекистан;
- «Гепацеф» порошок для приготовления инъекционного раствора по 2,0 г, ПАО «Киевмедпрепарат», Украина;
- «Сульперазон» порошок для приготовления инъекционного раствора по 1,0 г, ООО «Пфайзер Инк», Италия/США;
- «Журазидим» порошок для приготовления инъекционного раствора по 1,0 г, ООО «Jurabek Laboratories», Узбекистан;
- «Биотум» порошок для приготовления инъекционного раствора по 1,0 г, ООО «Польфарма», Польша;
- «Еврозидим» порошок для приготовления инъекционного раствора по 1,0 г, ООО «Аджио Фармасьютикалс», Индия;
- «Цефтазидим Каби» порошок для приготовления инъекционного раствора по 2,0 г, ООО «Фрэзениус Каби Дойчланд ГмбХ», Португалия/Германия.

УФ-спектрофотометрия

В работе использовали двухлучевой спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu, Япония) и однолучевой спектрофотометр «Agilent» 8453E (Agilent Technologies, Германия). Спектры получали в интервале длин волн от 200 до 760 нм. В качестве раствора сравнения использовали соответствующий растворитель.

Обработку спектров осуществляли с использованием программ «ACD/SpecViewen», Freeware Version (Advanced Chemistry Development, Канада) и «UV WinLab» (PerkinElmer).

Высоко эффективная жидкостная хроматография

Исследование проводили в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. В работе использовали градиентный ВЭЖХ хроматограф «Agilent 1280» (Agilent Technologies, США) и LC-20 (Shimadzu, Япония). Колонка Zorbax (Agilent

Technologies, США) C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм), предколонка Zorbax (Agilent Technologies, США) (14 мм x 4.6 мм, 5 мкм). Температура колонки 25°C. В таблице № 20 приведены условия хроматографирования.

Таблица 4

Условия хроматографирования для определения количественного содержание цефалоспоринов

Наименование	Скорость потока	Объем пробы	Длина волны
Цефазолина натриевая соль	1,0 мл/мин.	20 мкл	270 нм
Цефтриаксона натриевая соль	1,5 мл/мин.	10 мкл	254 нм
Цефотаксима натриевая соль	1,0 мл/мин.	10 мкл	235 нм
Цефтазидим натрия карбонат	2,0 мл/мин.	20 мкл	245 нм
Цефоперазона натриевая соль	1,0 мл/мин.	20 мкл	254 нм
Цефепим дигидрохлорид	1,0 мл/мин.	10 мкл	254 нм

Управление прибором и расчет хроматографических параметров осуществляли с использованием программы «Open-LAB» (Agilent Technologies, США) и «LAB-Solutions» (Shimadzu, Япония).

АНАЛИЗ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ.

УФ-спектрофотометрия основывается на измерении количества поглощенного веществом электромагнитного излучения в определенной узкой волновой области. Для анализа могут использоваться как газообразные, так и жидкие образцы. В настоящее время спектроскопия в УФ области является официальным методом, который принят целым рядом фармакопей.

В литературе имеется много данных о применении спектроскопии в УФ области в качестве метода идентификации фармацевтических препаратов и определения степени их чистоты [56, с.424; 57, с.704].

Спектральные наблюдения в УФ области позволяют получать необходимые сведения о характерных особенностях структуры молекулы исследуемых фармацевтических препаратов.

В фармацевтическом анализе спектрофотометрию нередко сочетают с методами разделения (ТСХ и другие виды хроматографий).

Несмотря на то, что в настоящее время ведущие зарубежные фармакопеи для идентификации субстанций и препаратов, в том числе и цефалоспоринов, обычно используют ИК-спектроскопию и хроматографические методы, метод УФ-спектрофотометрии не теряет свою ценность для фармакопейного анализа. Для веществ, обладающих хорошими хромофорами, этот метод также дает возможность проводить анализ по разделам «подлинность» и «количественное определение», а в ряде случаев может использоваться и для анализа чистоты по поглощению при определенных длинах волн. Наличие сложной сопряженной системы в структуре цефалоспоринов дает возможность широкого применения УФ-спектрофотометрии для их фармакопейного анализа.

Задачей настоящей работы являлось:

- исследование спектральных характеристик цефалоспоринов в различных растворителях и разработка методик установления подлинности субстанций и лекарственных препаратов с использованием метода УФ-спектрофотометрии и составление атласа стандартных УФ-спектров цефалоспоринов.

Разработка методик пробоподготовки.

При работе в УФ области спектра к растворителям предъявляют следующие требования:

- а) он не должен поглощать в той же области спектра, что и растворенное вещество;
- б) он не должен химически реагировать с растворенным веществом;
- в) он должен быть не токсичным, спектроскопически чистым и относительно недорогим.

Для приготовления исследуемого образца могут использоваться полярные и неполярные растворители. В качестве раствора сравнения используется растворитель.

Величина поглощения вещества прямо пропорциональна его концентрации в растворе.

Выбор растворителя для приготовления испытуемых растворов был основан на данных о растворимости изучаемых лекарственных веществ. Известно, что изучаемые лекарственные средства в основном представлены в виде солевых форм и поэтому хорошо растворимы в воде.

Пробоподготовку осуществляли следующим образом:

Раствор 10 мкг/мл.

Около 25 мг (точная навеска) испытуемой субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют около 100 мл соответствующего растворителя, перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 10

мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

Раствор 15 мкг/мл.

Около 25 мг (точная навеска) испытуемой субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют около 100 мл соответствующего растворителя, перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 7,5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

Раствор 20 мкг/мл.

Около 25 мг (точная навеска) испытуемой субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют около 100 мл соответствующего растворителя, перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 10 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают.

Результаты.

На рис. 4-10 представлены УФ-спектры лекарственных препаратов (порошки для инъекций), содержащих цефазолина натриевую соль и цефотаксима натриевую соль различных производителей.

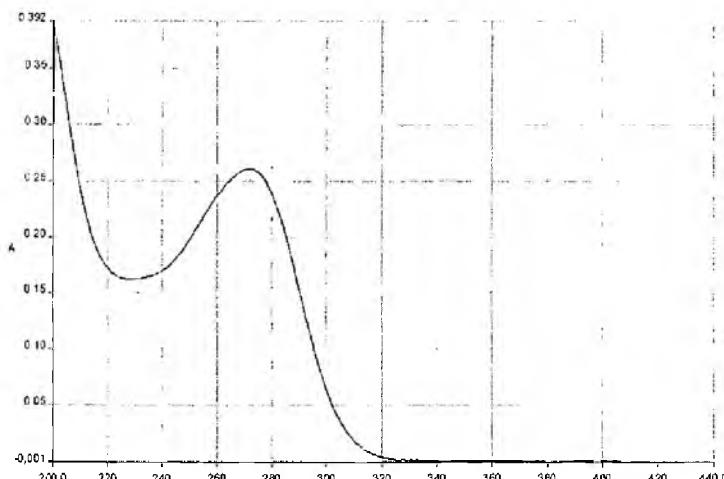


Рисунок 4. Цефазолина натриевая соль в воде 10 мкг/мл (Интралин).

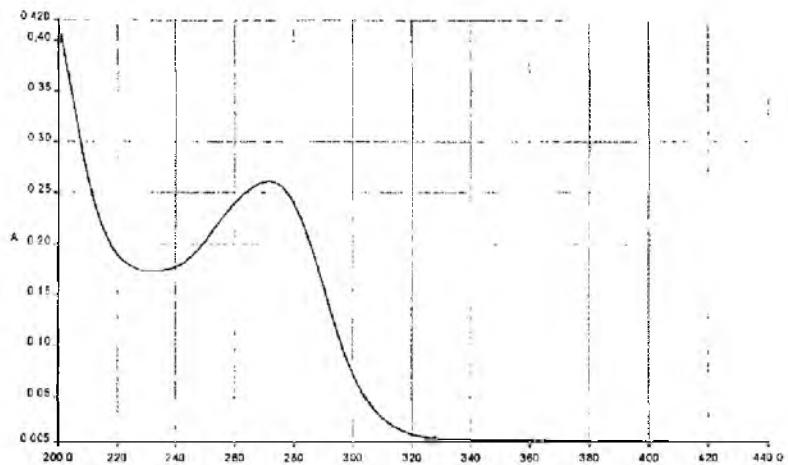


Рисунок 5. Цефазолина натриевая соль в воде 10 мкг/мл (Рефлин).

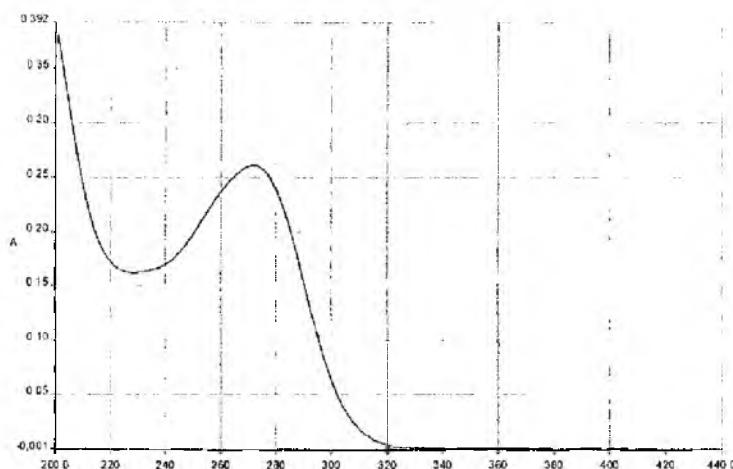


Рисунок 6. Цефазолина натриевая соль в воде 10 мкг/мл (Цефазолин).

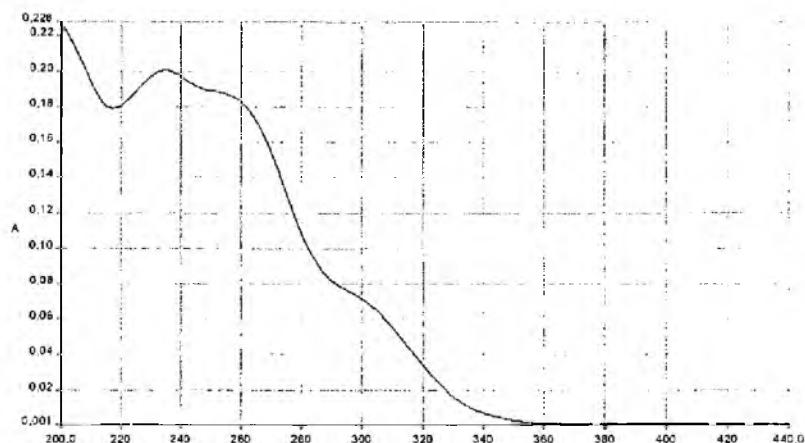


Рисунок 7. Цефотаксима натриевая соль в воде 5 мкг/мл (Цеффаст).

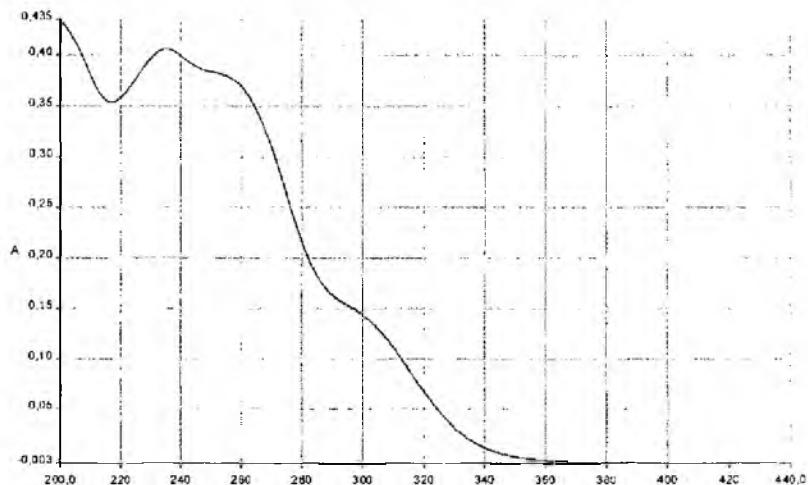


Рисунок 8. Цефотаксима натриевая соль в воде 10 мкг/мл (Цефотаксим-Лек).

Для сравнения приведены также УФ-спектры соответствующих субстанций (рис. 9 и 10).

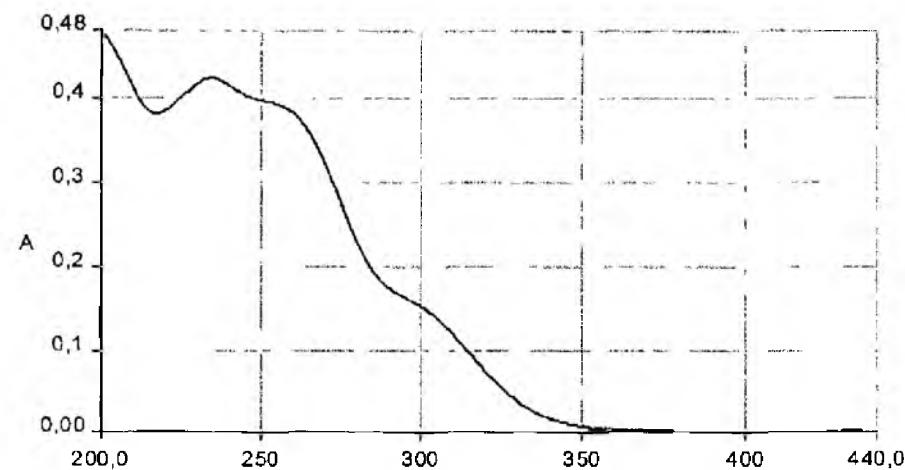


Рисунок 9. Цефотаксима натриевая соль субстанция в воде 10 мкг/мл.

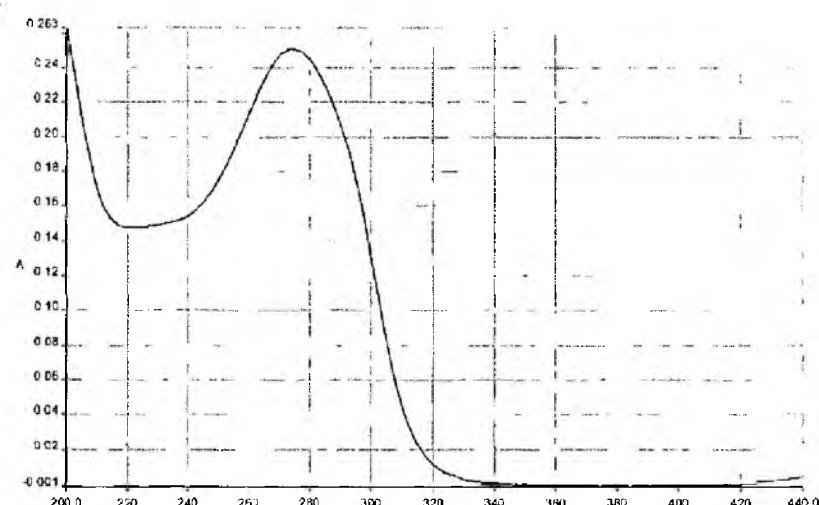


Рисунок 10. Цефазолина натриевая соль субстанция в воде 10мкг/мл.

Для сравнения приведены также УФ-спектры соответствующих стандартных образцов (рис. 11 и 12).

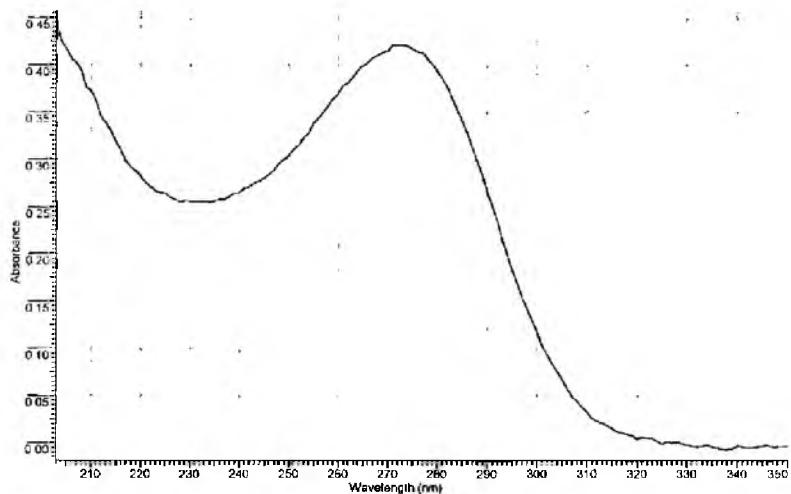


Рисунок 11. УФ спектр цефазолина натриевой соли, раствор 15 мкг/мл в воде λ_{max} 272 нм.

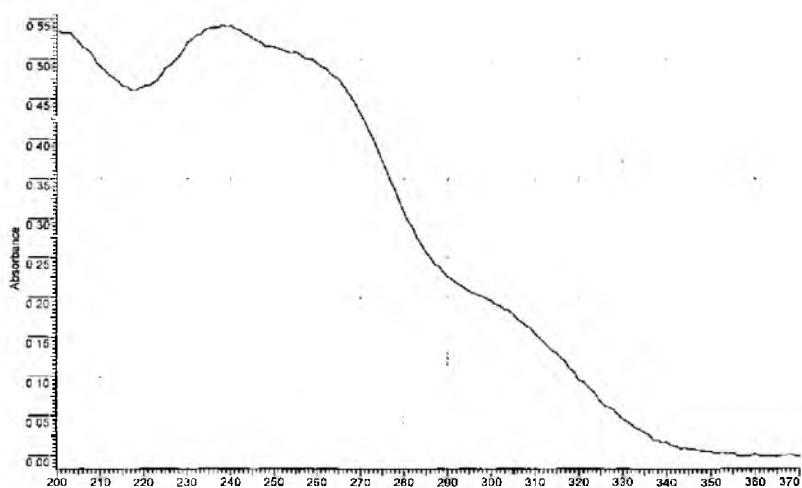


Рисунок 12. УФ спектр цефотаксима натриевой соли, раствор 15 мкг/мл в воде λ_{max} 238 нм.

Из полученных данных видно, что использование в качестве экстрагента воды способствует полному извлечению действующего вещества, что позволяет проводить установление подлинности методом УФ-спектрофотометрии [58, с.448; 59, с.82-86; 60, с.544].

Таким образом, для исследованных лекарственных веществ вода является универсальным растворителем для установления подлинности субстанций и лекарственных препаратов цефалоспоринов.

В таблице 5 представлены полученные нами спектральные характеристики цефалоспоринов. Как видно из представленных данных, главный максимум поглощения большинства цефалоспоринов находится в области примерно от 240 нм до 270 нм.

Таблица 5

Спектральные характеристики цефалоспоринов в УФ-области

Лекарственное вещество	Максимумы поглощения, нм	Удельный показатель экстинкции	Растворитель	Рекомендуемая концентрация раствора, мкг/мл
Цефазолина натриевая соль	272	279	Вода	15
Цефотаксима натриевая соль	238	351	Вода	15
Цефтриаксона натриевая соль	243 271	473 433	Вода	10
Цефоперазона натриевая соль	269	272	Вода	15

В УФ-спектрах цефалоспоринов можно выделить 3 основные области поглощения: интенсивный главный максимум, область поглощения при низких длинах волн, выступающая в виде плеча или одного, или нескольких максимумов («левое плечо») и аналогичная область поглощения при высоких длинах волн также в виде плеча или одного, или нескольких максимумов («правое плечо»).

В настоящей работе были приняты следующие условия. При получении стандартных УФ-спектров мы ориентировались на значения оптической плотности в главном максимуме от 0,2 до 0,9. Анализ спектров цефалоспоринов показал, что для получения УФ-спектров концентрация испытуемого раствора должна составлять от 10 до 20 мкг/мл. При этом условии оптическая плотность в главном максимуме находится в диапазоне от 0,4 до 0,55.

Следует отметить, что сопряжение не только отражается на характере УФ-спектра исследуемого препарата, но и на характере его ИК-спектр.

АНАЛИЗ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ.

В современном фармакопейном анализе метод ВЭЖХ находит широкое применение для установления подлинности, анализа чистоты и количественного определения лекарственных средств. Используется данный метод и при анализе субстанций и лекарственных препаратов цефалоспоринов. 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 ВЭЖХ.

Для этого решались следующие задачи:

- оптимизация методики пробоподготовки субстанций и лекарственных препаратов цефалоспоринов;
- оптимизация хроматографических условий (сорбент, состав ПФ, условия детектирования, температурный режим, объем пробы и др.), оптимальных для установления подлинности, анализа чистоты и количественного определения цефалоспоринов;
- подбор и оценка параметров пригодности хроматографической системы.

Параметры пригодности хроматографической системы.

Основные требования

В данном исследовании ориентировались на требования к параметрам пригодности хроматографической системы, указанные в таблице 25. При этом опирались на базовые требования, ряд из которых регламентируется зарубежными фармакопеями. Однако для повышения точности и

воспроизводимости анализа стремились к достижению более высоких показателей.

Таблица 6.

Требования к параметрам пригодности хроматографической системы, принятые в данной работе.

Параметр	Базовое требование	Желательное значение
Эффективность (N)	Не менее 1500 - 2000 т.т.	Не менее 4000 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%
Разрешение (R)	Не менее 1,5	Не менее 2,0
Отношение сигнал/шум (S/N) как предел детектирования	Не менее 3*	Не менее 3*
Отношение сигнал/шум (S/N) как предел количественного определения	Не менее 10*	Не менее 20 для примесей. Не менее 1000 при количественном определении.

* Общее требование ЕР

** Общее требование USP

Для расчета хроматографических параметров используются стандартные формулы, которые можно найти во множестве руководств по хроматографии [61, с.41; 62, с.264; 63, с.260; 64, с.647; 65, с.288; 66, с.216]. Однако при этом могут применяться немного разные подходы. Основное различие: использование ширины пика у основания или ширины пика на половине высоты. Если бы пики были идеальными гауссианами, разницы не было бы. Но на практике из-за размывания пиков определить ширину у основания не всегда удается корректно. Поскольку для цефалоспоринов такое размывание достаточно характерно, при расчетах хроматографических параметров лучше использовать высоту пика на половине высоты. Поэтому применяли формулы, приведенные в ЕР.

Эффективность

Требования к эффективности менялись по мере развития метода ВЭЖХ. Если 25 лет назад колонка для ВЭЖХ со значением данного параметра около 1000 т.т. считалась вполне нормальной, то значения эффективности современных колонок в несколько раз выше, что связано с более совершенной технологией их изготовления, использованием более однородных по составу привитых фаз с размером частиц сорбента около 5 мкм. Безусловно, большое влияние на этот параметр оказывает и общая стабильность работы хроматографической системы (электрических схем, насосов и т.п.).

EP и USP определяют минимальные требования к эффективности для каждого лекарственного средства в отдельности. Для цефалоспоринов в зависимости от состава ПФ и анализируемого соединения этот параметр должен быть минимально 500-2500 т.т.

В данной работе мы придерживались той позиции, что при разработке методик анализа на современных аналитических колонках следует ориентироваться на минимальное значение эффективности 1500-2000 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.

Фактор симметрии

Фактор симметрии пика иногда также обозначают как «хвостовой фактор», поскольку наиболее часто наблюдается размывание хроматографической зоны после достижения максимальной концентрации. Однако более корректно говорить именно о факторе симметрии (EP), поскольку размывание может касаться не только «хвоста», но и фронтальной части пика (что в ряде случаев наблюдалось в данной работе).

Обзор фармакопейных требований к параметрам пригодности при анализе цефалоспоринов методом ВЭЖХ демонстрирует довольно большие значения данного параметра, явно неукладывающиеся в общее требование ЕР 0,8-1,5. Настоящее исследование показало, что, действительно, пики цефалоспоринов 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.

Относительное стандартное отклонение

Данный параметр имеет первостепенное значение при количественном определении лекарственных средств.

USP в общем случае регламентирует значение RSD не более 2,0% при 5 повторных введениях (если этого достичь не удается, то USP требует оценивать RSD при 6 введениях).

В ЕР значение RSD зависит как от количества последовательных введений, так и от верхнего предела содержания, действующего вещества в субстанции или препарате, указанного в конкретной фармакопейной статье. При этом следует отметить, что ВР при анализе по статьям, не описанным в ЕР, также, как и USP, дает максимальное значение RSD 2,0%.

Согласно ЕР, при 5 последовательных введениях максимальное значение RSD будет определяться по формуле:

$$RSD_{max} = 0,366 \times B,$$

где В - значение верхнего предела содержания действующего вещества минус 100.

Верхний предел при анализе субстанций цефалоспоринов методом ВЭЖХ - 105%. Значит теоретически максимальное значение RSD должно быть в данном случае 1,83%.

Для препаратов цефалоспоринов верхняя граница при количественном определении, согласно USP, 110%. Тогда RSD_{max} должно быть 3,66%.

Однако, видимо, учитывая сложности в достижении оптимальных значений эффективности и фактора симметрии при анализе цефалоспоринов, зарубежные фармакопеи в большинстве случаев ориентируются на RSD 2%.

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

Разрешение

Этот параметр имеет основное значение при анализе примесей. Теоретически полному разделению пиков должно соответствовать значение разрешения 1,0. Но поскольку реальные пики представляют собой искаженные гауссианы, то на практике полное разделение пиков примерно одинаковой высоты обычно наблюдается при значениях R не менее 1,25 [67].

Если же высота пиков различается существенно, то полному разделению могут соответствовать и более высокие значения R. В ЕР указывается, что полному разделению пиков соответствует разрешение 1,5. Однако для сильно различающихся по высоте пиков это не всегда соответствует действительности.

Поскольку в данной работе разрешение оценивалось, в первую очередь, при анализе чистоты, то в соответствии с вышесказанным за минимально приемлемое значение разрешения было принято 1,5, а за желательное - не менее 2,0.

Пределы детектирования и количественного определения

В ЕР за предел детектирования принимают отношение сигнал/шум не менее 3, за предел количественного определения - отношение сигнал/шум не менее 10. Однако на такие значения можно ориентироваться только при практически полном отсутствии колебаний базовой линии. В реальных условиях необходимо готовить растворы с такими концентрациями, чтобы отношение S/N было выше минимальных требований.

Разработанные в данном исследовании методики анализа цефалоспоринов методом ВЭЖХ подразумевают использование ПФ с

крайними соотношениями водного и органического компонентов (15:85, 10:90). На практике при использовании двух насосов это часто приводит к колебаниям базовой линии в пределах 0,001 (по шкале оптической плотности при использовании УФ-детектора), что соответствует отношению S/N 10-15. Эти колебания приемлемы, но при анализе разбавленных растворов увеличивается ошибка как в определении действующего вещества (в меньшей степени), так и при определении содержания примесей (в большей степени) [68, с.32-35].

Поэтому в настоящей работе при разработке методик количественного определения ориентировались на минимальное отношение S/N, равное 1000.

При анализе чистоты цефалоспоринов концентрация раствора должна быть такой, чтобы получались пики примесей с S/N желательно не менее 20. При этом S/N для действующего вещества может составлять до 10000.

Пробоподготовка для анализа цефалоспоринов методом ВЭЖХ.

Выбор растворителя

Подробное обоснование выбора растворителей при анализе цефалоспоринов описано в разделе 1.4.6. настоящей работы. Поскольку при анализе методом ВЭЖХ на обращенной фазе необходимо исключить использование сильнощелочных и сильнокислотных растворов (а также растворителей, не смешивающихся с ПФ).

При анализе методом ВЭЖХ, действительно, несмотря на то, что в состав выбранной ПФ входит буфер, всё же введение растворов с очень низкими значениями pH или, наоборот, намного выше, чем pH ПФ, будет нарушать равновесие в системе и негативно сказываться на хроматографических характеристиках цефалоспоринов. Поэтому мы использовали растворитель со значением pH, близким к таковому у водного компонента ПФ.

Аналитическая область методики (концентрация раствора)

Рекомендуемая в данной работе концентрация испытуемого и стандартного растворов при установлении подлинности и количественном определении составляет от 0,3мг/мл до 1,0мг/мл. При введении 10-20 мкл это соответствует нагрузке на колонку от 3мкг до 20мкг, что является оптимальным для цефалоспоринов. Использование данной концентрации, с одной стороны, не перегружает колонку и не вызывает искажение хроматографических параметров (эффективность, симметрия). С другой стороны, концентрация 1 мг/мл значительно выше предела детектирования и предела количественного определения по ЕР и позволяет получать пики с S/N не менее 1000.

Для анализа чистоты концентрация испытуемого раствора должна быть значительно выше. Было установлено, что без «зашкаливания» детектора она может составлять в зависимости от условий хроматографирования и испытуемого соединения до 3-5 мг/мл. Это позволяет использовать метод внутренней нормализации для установления содержания примесей. При наличие стандартных образцов примесей (либо при расчете по стандартному раствору действующего вещества) можно использовать и более высокие концентрации испытуемого раствора, но необходимо принимать во внимание, что это может привести к перегрузке колонки и искажению полученных результатов.

Поскольку максимальная концентрация цефотаксима натрия в буферном растворе составляет 1,0 мг/мл, то для анализа чистоты можно использовать больший объем введения - 50 мкл.

При разработке условий анализа для объективной оценки хроматографических параметров использовали концентрации испытуемых растворов 0,1, 0,5, 2,0 мг/мл и др., то есть выше и ниже оптимального значения.

Для оценки всей аналитической области (проверка линейности) готовили растворы с концентрациями от 0,5 до 2,0 мг/мл.

Подробное приготовление растворов приведено далее для разработанной методики количественного определения, а также для анализа чистоты. Приготовление растворов других концентраций осуществлялось с использованием соответствующих навесок и разведений и отдельно не описывается.

Определение основных хроматографических условий.

Размеры колонки

В фармакопейном анализе рекомендуется использовать аналитические колонки, то есть имеющие внутренний диаметр от 2 до 4,6 мм. В данной работе была выбрана колонка со значением данного параметра 4,6 мм, хотя вполне приемлемым будет использование колонок с внутренним диаметром от 3 до 4,6 мм.

В зарубежных фармакопеях цефалоспорины анализируют на колонках длиной от 15 до 25 см. Однако «короткие колонки» (15 см и менее) не способствуют достижению высоких значений эффективности и разделению хроматографических пиков. Поэтому в данной работе использовали колонку длиной 25 см.

Неподвижная фаза

Подавляющее большинство современных анализов проводится с использованием в качестве НФ октадецилсилина, то есть сорбента C18, поскольку он обеспечивает достижение наиболее оптимальных для многих соединений хроматографических параметров (время удерживания, эффективность и селективность). Уменьшение длины углеводородной цепи может приводить к снижению коэффициента емкости, а её дальнейшее увеличение более 18 атомов обычно не улучшает хроматографические характеристики.

Другие сорбенты с привитыми фазами применяют значительно реже. А нормально-фазовая хроматография на силикагеле в настоящее время вообще

почти не используется. Обычно её применяют, если не удается добиться удовлетворительных результатов на привитых фазах.

Как было указано в главе 1, нормально-фазовая ВЭЖХ на немодифицированном силикагеле и привитых фазах NH₂ и CN практически не применяется в анализе цефалоспоринов. В зарубежных фармакопеях для анализа цефалоспоринов методом ВЭЖХ используют колонки, заполненные октадецилсиланом.

В настоящей работе также была выбрана фаза C18, имеющаяся во многих лабораториях. Таким образом, анализ проводили в обращенно-фазовом режиме.

Детектирование

Учитывая спектральные характеристики цефалоспоринов, очевидно, что наиболее оптимальным будет использование УФ-детектора (или диодно-матричного, как в данной работе). Длины волн детектирования были выбраны на основе данных УФ-спектрофотометрического анализа. Поскольку в работе использовали ПФ со слабокислыми значениями pH, то детектирование проводили при максимумах поглощения в буферном растворе (± 2 нм).

Скорость потока, объем пробы

Были приняты стандартные, наиболее оптимальные для аналитической колонки с внутренним диаметром 4,6 мм, значения. То есть скорость потока составляла 1-1,5 мл/мин, а объем введения 10-20 мкл. Как уже было указано выше, при анализе чистоты цефотаксима натрия можно использовать объем введения 50 мкл.

Температура колонки

В настоящее время ВЭЖХ-анализ всё реже проводят без терmostатирования колонки, поскольку, в первую очередь, это сказывается на стабильности хроматографических параметров и на воспроизводимости получаемых результатов. При этом температуру более 55-60 °C во избежание газообразования в ПФ практически не используют.

Зарубежные фармакопеи предусматривают при анализе цефалоспоринов терmostатирование колонки при комнатной температуре. В настоящей работе была выбрана наиболее оптимальная с точки зрения параметров хроматографирования температура: 25 °C.

Разработка состава подвижной фазы.

Органический компонент

В выбранном обращенно-фазовом режиме необходимо использовать полярные растворители. В качестве органического компонента был выбран ацетонитрил, который по сравнению с основным своим «конкурентом» - метанолом - имеет ряд преимуществ: более высокая температура кипения (при 40 °C меньше вероятность газообразования), меньше вязкость (соответственно, ниже рабочее давление и часто выше эффективность колонки). Ацетонитрил также характеризуется меньшим значением предела прозрачности в УФ-свете по сравнению с метанолом - 195 нм против 205 нм, но для анализа цефалоспоринов это имеет второстепенное значение.

Таким образом, основной параметр, который варьировался в данной работе - состав водного компонента ПФ. Его выбор был основан, в первую очередь, на кислотно-основных свойствах цефалоспоринов. Было исследовано влияние ПФ различного состава на хроматографические характеристики данных соединений. При этом соотношение ацетонитрила и буферного компонента в наиболее приемлемых для анализа цефалоспоринов элюентах составляло обычно от 50:50 до 10:90, соответственно, что говорит о высокой подвижности данных соединений на обращенной фазе. Это связано с относительно высокой полярностью молекул цефалоспоринов, наличием заряженных функциональных групп и, соответственно, их слабым удерживанием на неполярной НФ.

ПФ без стабилизации значения рН

Для получения оптимальных параметров удерживания необходимо создание такого значения рН ПФ, при котором молекулы данных веществ будут находиться преимущественно в одной ионной форме, чтобы предотвратить размывание хроматографической зоны. Так как использование ПФ с рН более 8,5 на стандартной колонке с привитой фазой исключено, то необходимо применять ПФ со слабокислыми значениями рН.

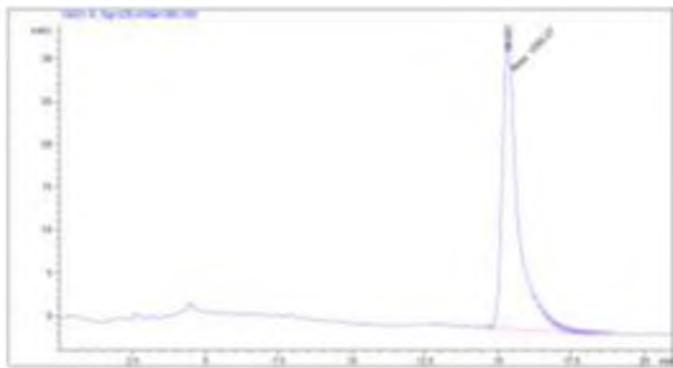


Рисунок 13. Хроматограмма раствора цефотаксима натрия в ПФ ацетонитрил – буферный раствор 50:50.

Действительно, при использовании в качестве ПФ смеси ацетонитрил – буферный раствор без стабилизации значения рН наблюдается двоение (цефтриаксон, цефазолин) либо сильное размывание пиков цефалоспоринов даже при небольших временах удерживания, то есть при высоком содержании ацетонитрила (рис. 13). Для цефотаксима при этих условиях эффективность составила около 500 т.т., фактор симметрии - 5,2, что является абсолютно неприемлемым.

ПФ с кислыми значениями рН без модификаторов

В ПФ ацетонитрил - фосфатный буфер (рН 5,0) параметры пиков значительно улучшаются (рис. 14, табл. 7).

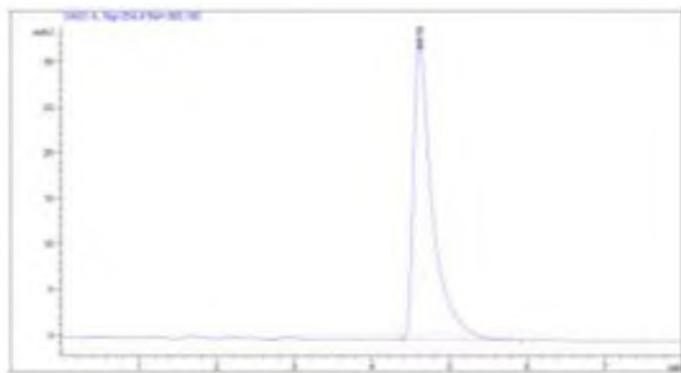


Рисунок 14. Хроматограмма раствора цефтриаксона натрия в ПФ ацетонитрил - фосфатный буфер (рН 5,0) 50:50.

При этих условиях эффективность составляла около 2000-4000 т.т., фактор симметрии – не более 2,0. Однако эти значения были получены при концентрации испытуемого раствора 10 мкг/мл (нагрузка на колонку 0,2 мкг). Известно, что при увеличении концентрации эффективность обычно падает и симметрия пиков ухудшается. Достигнутое в этих условиях значение эффективности является относительно высоким. Однако симметрия пиков всё же недостаточная. Поэтому более высокие концентрации не исследовались.

Таблица 7
Параметры пиков цефалоспоринов в ПФ ацетонитрил - фосфатный буфер (рН 5,0)

Лекарственное вещество	t_R , мин	N, т.т.	A_s
Цефтриаксон натрий	5,2	3600	1,78
Цефазолин натрий	10,1	3900	1,89
Цефотаксим натрий	15,2	3200	1,62

Приготовление буферного раствора (рН 5,0). В мерной колбе вместимостью 1000 мл растворяли в воде около 2,77 г динатрия гидрофосфата и 1,86 г лимонной кислоты. Объем раствора доводили до метки, перемешивали и доводили значение рН полученного раствора до $5,0 \pm 0,1$ кислотой ортофосфорной 85% (контроль рН осуществляли потенциометрически). Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

Очевидно, что буферный раствор оправдывает свое назначение, улучшая форму пиков анализируемых соединений. Тем не менее, значения фактора симметрии для большинства концентраций в условиях данной ПФ являются неприемлемыми.

ПФ с динамическими модификаторами

Таким образом, простое использование режима подавления ионизации карбоксильной группы (ни грубо - с помощью ортофосфорной кислоты, ни более тонко - с применением фосфатного буфера) не позволяет достичь высокой симметрии пиков цефалоспоринов.

Зарубежные фармакопеи в ряде случаев для улучшения хроматографических характеристик цефалоспоринов используют в составе ПФ ион-парные реагенты: тетрадециламмония бромид, тетрагептиламмония бромид.

Тетрадециламмония бромид и тетрагептиламмония бромид добавляют в компонент ПФ, который содержит в составе ацетонитрил, в концентрации от 1 до 4 мг/мл. В работе тетрадециламмония бромид и тетрагептиламмония бромид были использованы в концентрации 2 мг/мл.

Механизм действия ион-парных реагентов до сих пор однозначно не установлен. Считается, что ВЭЖХ с данными веществами близка к ионообменной хроматографии, поскольку модификатор может связываться неполярной частью молекулы с НФ и придавать последней определенный заряд.

Обычно тетрадециламмония бромид и тетрагептиламмония бромид, заряженный положительно, используется как ион-парный реагент при анализе отрицательно заряженных соединений, например, карбоновых кислот. Тогда образование ионной пары наиболее полно происходит в щелочной среде при pH около 8,5. Для цефалоспоринов это соответствует или находится близко к изоэлектрической точке. Следовательно, несмотря на образование ионной пары за счет карбоксильной группы, будет отсутствовать фиксация определенной формы основания. Поэтому тетрадециламмония бромид и

тетрагептиламмония бромид были добавлены в фосфатный буфер со значением pH 5,0. При этих условиях ионная пара с положительно заряженным сорбатом не образуется. Но тетрадециламмония бромид и тетрагептиламмония бромид, вероятно, связывается неполярной частью молекулы с октадецильными радикалами НФ, за счет чего последняя приобретает положительный заряд, обращенный в сторону ПФ.

Ввиду отталкивания одноименных зарядов при таком модифицировании время удерживания, положительно заряженного сорбата уменьшается, что произошло и в случае цефалоспоринов. И это особенно характерно для ПФ с тетрадециламмонием бромидом и тетрагептиламмонием бромидом. Поэтому для сохранения приемлемого времени удерживания при использовании тетрадециламмония бромида и тетрагептиламмония бромида была уменьшена элюирующая сила ПФ за счет снижения содержания в её составе ацетонитрила.

Таким образом, нами были изучены следующие ПФ:

- ацетонитрил – раствор тетрадециламмония бромида (2,0 мг/мл) и тетрагептиламмония бромида (2,0 мг/мл) – 0,067 М раствор фосфатного буфера – цитратный буферный раствор с pH 5,0 (50:44:5,5:0,5 для цефтриаксона);
- ацетонитрил – раствор тетрадециламмония бромида (2,0 мг/мл) – цитратный буферный раствор с pH 5,0 (30:60:10 для цефтриаксона);
- ацетонитрил – раствор тетрагептиламмония бромида (4,0 мг/мл) – 0,067 М раствор фосфатного буфера – цитратный буферный раствор с pH 5,0 (50:44:5,5:0,5 для цефтриаксона).

На рис. 15-17 представлены хроматограммы растворов цефтриаксона в концентрациях 300 мкг/мл при использовании трех ПФ.

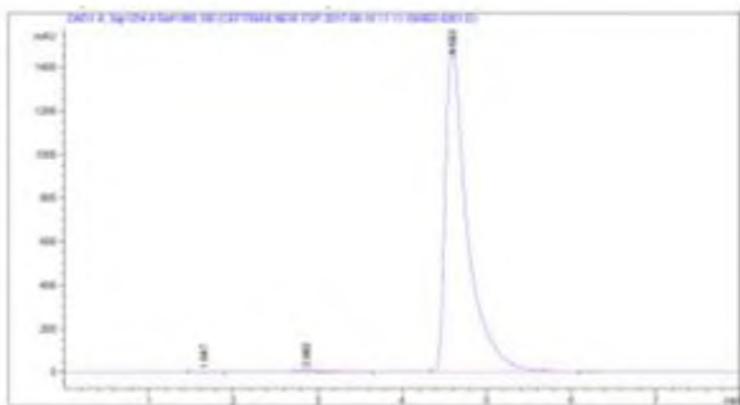


Рисунок 15. Хроматограмма раствора цефтриаксона (300 мкг/мл) в ПФ ацетонитрил – раствор тетрадециламмония бромида (2,0 мг/мл) и тетрагептиламмония бромида (2,0 мг/мл) – 0,067 М раствор фосфатного буфера – цитратный буферный раствор с pH 5,0 = 50:44:5,5:0,5.

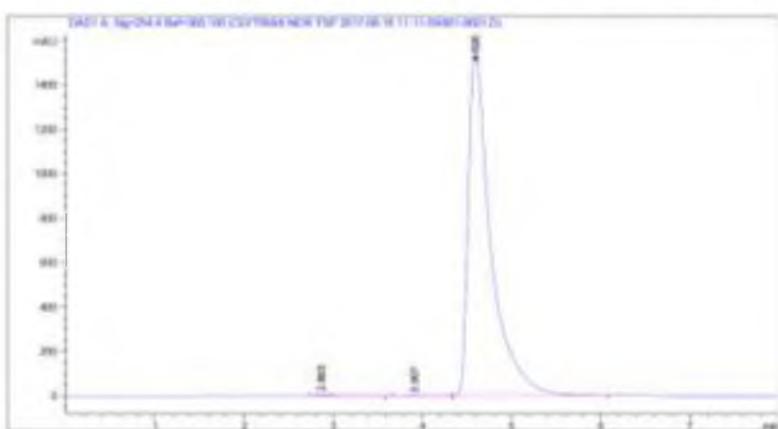


Рисунок 16. Хроматограмма раствора цефтриаксона (300 мкг/мл) в ПФ ацетонитрил – раствор тетрадециламмония бромида (2,0 мг/мл) – цитратный буферный раствор с pH 5,0 = 30:60:10.

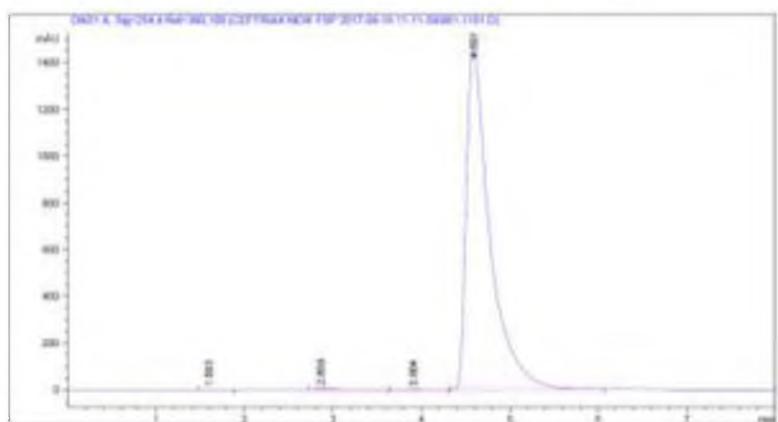


Рисунок 17. Хроматограмма раствора цефтриаксона (300 мкг/мл) в ПФ ацетонитрил – раствор тетрагептиламмония бромида (4,0 мг/мл) – 0,067 М

раствор фосфатного буфера – цитратный буферный раствор с pH 5,0 = 50:44:5,5:0,5.

Из представленных данных следует, что использование тетрадециламмония бромида и тетрагептиламмония бромида значительно улучшает симметрию пиков цефалоспоринов. Причем для большинства анализируемых соединений симметрия хотя и ухудшается при анализе более концентрированных растворов, но незначительно. Можно сказать, что ПФ с тетрадециламмонием бромидом и тетрагептиламмонием бромидом уже достаточна для анализа цефалоспоринов методом ВЭЖХ, поскольку значения эффективности составили не менее 3500 т.т., а фактор симметрии при использовании данной ПФ находится в диапазоне от 1,5 до 1,8.

Таким образом, при анализе цефтриаксона методом ВЭЖХ в целом более предпочтительной является ПФ с тетрадециламмонием бромидом и тетрагептиламмонием бромидом. Однако необходимо определиться, в какой концентрации использовать данный модификатор, поскольку от этого зависят и хроматографические параметры и стоимость анализа. Сравнение данных для ПФ с тетрадециламмонием бромидом и тетрагептиламмонием бромидом с концентрациями 1 и 3 мг/мл позволяет сделать следующие выводы.

Использование тетрадециламмония бромида и тетрагептиламмония бромида в концентрации 3 мг/мл не приводит к значительному повышению эффективности и симметрии пиков по сравнению с концентрацией 1 мг/мл для большинства исследуемых соединений. Поэтому при анализе этих соединений следует использовать ПФ с тетрадециламмонием бромидом и тетрагептиламмонием бромидом в концентрации по 2 мг/мл.

Определение количественного содержания и посторонних примесей цефалоспоринов с использованием метода ВЭЖХ.

Из существующих методов анализа цефалоспориновых антибиотиков многие исследователи отдают предпочтение высокоэффективной жидкостной

хроматографии (ВЭЖХ) с обращенными фазами (приблизительно 2/3 от общего количества методов определений).

В то же время следует отметить недостаточность знаний в области физико-химических закономерностей хроматографического поведения данного класса соединений. Закономерности сорбции цефалоспориновых антибиотиков изучены лишь фрагментарно, при этом отсутствует ясность, в какой степени общетеоретические представления обращенно-фазовой хроматографии применимы к данному классу веществ. Недостаточное развитие теории имеет также отрицательные последствия. Так, выбор условий хроматографии цефалоспориновых антибиотиков осуществляется чаще всего методом проб и ошибок. Результаты такого подхода зачастую далеки от оптимальных. Поэтому на данном этапе актуальным и закономерным является развитие полуэмпирической модели для цефалоспориновых антибиотиков, которая позволяет приблизиться к решению основной задачи теории удерживания - развитию теоретических представлений, позволяющих рассчитывать величины удерживания исследуемых соединений, исходя из их строения и условий проведения хроматографического эксперимента.

В работе произведено исследование закономерностей хроматографического поведения цефалоспориновых антибиотиков в режиме обращенно-фазовой ВЭЖХ и создание на базе этих закономерностей рациональной схемы выбора оптимальных условий их анализа.

Показатели количественного определения и посторонних примесей цефалоспоринов с использованием метода ВЭЖХ производили в следующих препаратах:

- цефтриаксона натрия в препарате Витаксон (СП ООО «Jurabek Laboratories, производства Узбекистан);
- цефазолина натрия в препарате Интралин (СП ООО «Jurabek Laboratories, производства Узбекистан);
- цефотаксима натрия в препарате Цеффаст (СП ООО «Jurabek Laboratories, производства Узбекистан).

Определение количественного содержания и посторонних примесей цефтриаксона натрия методом ВЭЖХ в препарате Витаксон.

По 10 мкл раствора препарата, раствора сравнения (а) и раствора сравнения (с) попеременно хроматографировали на жидкостном хроматографе с УФ-детектором, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов, в следующих условиях:

- колонка размером 250 x 4,6 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии с размером частиц 5 мкм;
- подвижная фаза, дегазированная;
- скорость подвижной фазы – 1,5 мл/мин;
- детектирование – при длине волны 254 нм;
- температура колонки – комнатная;
- время хроматографирования – 2-кратное время удерживания цефтриаксона.

Приготовление растворов

Приготовление раствора препарата. 30 мг препарата поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворить в 50 мл подвижной фазы, довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать. Используется свежеприготовленный раствор.

Приготовление раствора сравнения (а). 30 мг (точная навеска) РСО цефтриаксона натриевой соли поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворить в 50 мл подвижной фазы, довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать. Используется свежеприготовленный раствор.

Приготовление раствора сравнения (с). 1 мл раствора препарата поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл, довести объем раствора подвижной фазой до метки и перемешать. Используется свежеприготовленный раствор.

Приготовление раствора 0,067 М фосфатного буфера с pH 7,0. 0,908 г калия дигидрофосфата поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл,

растворить в воде для инъекций, довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать (раствор 1).

2,38 г динатрия гидрофосфата поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворить в воде для инъекций, довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать (раствор 2).

Смешать 38,9 мл раствора 1 и 61,1 мл раствора 2 (при необходимости довести pH 1M раствором натрия гидроксида или 20% раствором фосфорной кислоты).

Приготовление раствора цитратного буфера с pH 5,0. 20,17 г лимонной кислоты поместить в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворить в 800 мл воды для инъекций (довести pH натрием гидроксидом, концентрированным) довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать.

Приготовление подвижной фазы. 2 г тетрадециламмония бромида и 2 г тетрагептиламмония бромида, растворить в 500 мл смеси вода для инъекций – 0,067 М фосфатного буферного раствора с pH 7,0 - цитратный буферный раствор с pH 5,0 Р (440:55:5), прибавить 500 мл ацетонитрила, перемешать и фильтровать через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Используется свежеприготовленный раствор.

Параметры пригодности хроматографической системы.

В данном исследовании ориентировались на требования, указанные в таблице 8. 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 8.

Требования к параметрам пригодности хроматографической системы, принятые в данной работе.

Параметр	Базовое требование	Желательное значение
Эффективность (N)	Не менее 2000 т.т.	Не менее 3000 т.т.
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 2000 т.т., так как значения менее 1500-2000 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.

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 количественного содержания и посторонних примесей цефтриаксона натрия по разработанной методике и хроматографировали последовательно раствор препаратса, раствор сравнения (a) и раствор сравнения (c).

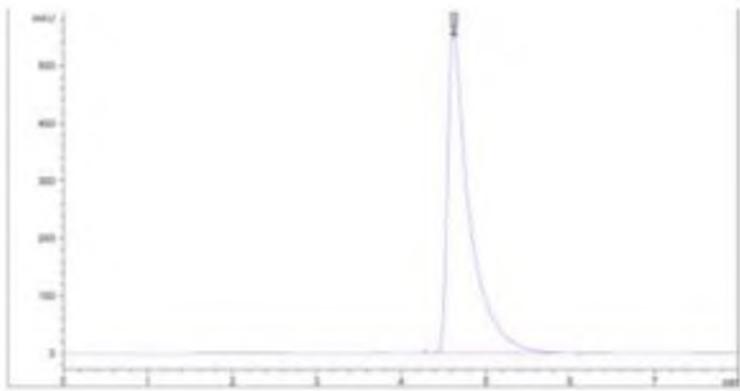


Рисунок 18. Хроматограмма раствора сравнения (а). Время удерживания пика цефтриаксона – 4,622 мин.

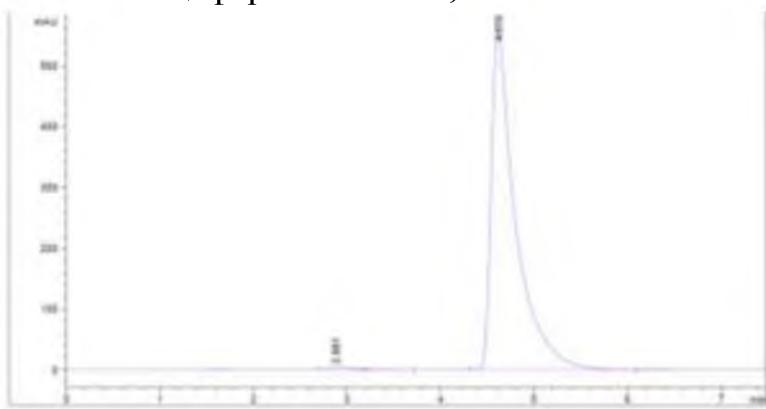


Рисунок 19. Хроматограмма раствора препарата. Время удерживания пика цефтриаксона – 4,619 мин.

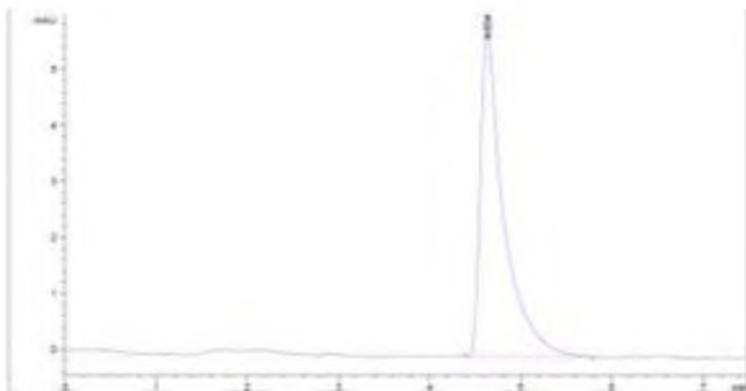


Рисунок 20. Хроматограмма раствора сравнения (с). Время удерживания пика цефтриаксона – 4,634 мин.

Определение количественного содержания и посторонних примесей цефотаксима натрия методом ВЭЖХ в препарате «Цеффаст».

По 10 мкл раствора препарата, раствора сравнения (а) и раствора сравнения (б) попаременно хроматографировали на жидкостном хроматографе

с УФ-детектором, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов, в следующих условиях:

- колонка размером 250 x 4,6 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии с размером частиц 5 мкм;
- подвижная фаза, дегазированная;
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- детектирование – при длине волны 235 нм;
- температура колонки – комнатная.

Приготовление растворов

Приготовление раствора препарата. 25,0 мг (точная навеска) препарата поместить в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворить в подвижной фазе и довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать. Используется свежеприготовленный раствор.

Приготовление раствора сравнения (а). 25,0 мг РСО цефотаксима натриевой соли поместить в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворить в подвижной фазе и довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать. Используется свежеприготовленный раствор.

Приготовление раствора сравнения (б). 1 мл раствора препарата поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл, довести объем раствора подвижной фазой до метки и перемешать. Используется свежеприготовленный раствор.

Приготовление 0,2 М раствора калия дигидрофосфата. 27,22 г калия дигидрофосфата поместить в мерную колбу вместимостью 1000 мл растворить в воде для инъекций, довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать.

Приготовление фосфатного буферного раствора pH 6,6. 250 мл 0,2 М раствора калия дигидрофосфата поместить в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавить туда же 89 мл 0,2 М раствора натрия гидроксида, довести объем раствора водой для инъекций до метки и перемешать.

Приготовление подвижной фазы. 3,5 г калия дигидрофосфата и 11,6 г натрия гидрофосфата растворить в 1000 мл воды, довести pH раствора кислотой фосфорной до 7,0, прибавить 180 мл метанола, перемешать и фильтровать через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Используется свежеприготовленный раствор.

Параметры пригодности хроматографической системы.

В данном исследовании ориентировались на требования, указанные в таблице 9. 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 9

Требования к параметрам пригодности хроматографической системы, принятые в данной работе

Параметр	Базовое требование	Желательное значение
Фактор симметрии (As)	Не более 2,0	Не более 1,8
Относительное стандартное отклонение (RSD)	Не более 2,0%	Не более 1,5%

Настоящее исследование показало, что, действительно, пики цефотаксима натрия 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 не более 1,8.

В данной 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 количественного содержания и посторонних примесей цефотаксима натрия по разработанной методике и хроматографировали последовательно раствор препарата, раствор сравнения (а) и раствор сравнения (б).

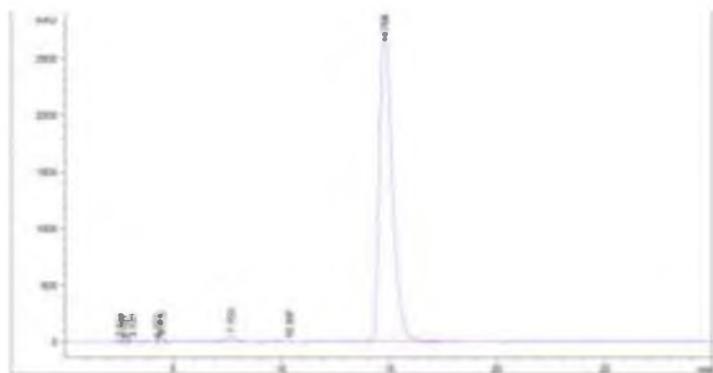


Рисунок 21. Хроматограмма раствора сравнения (а). Время удерживания пика цефотаксима – 14,798 мин.

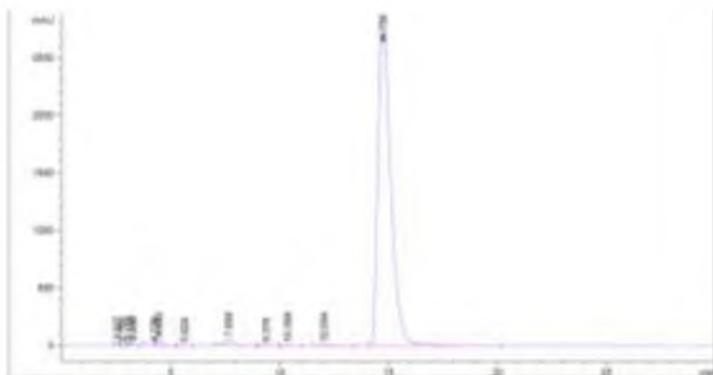


Рисунок 22. Хроматограмма раствора препарата. Время удерживания пика цефотаксима – 14,756 мин.

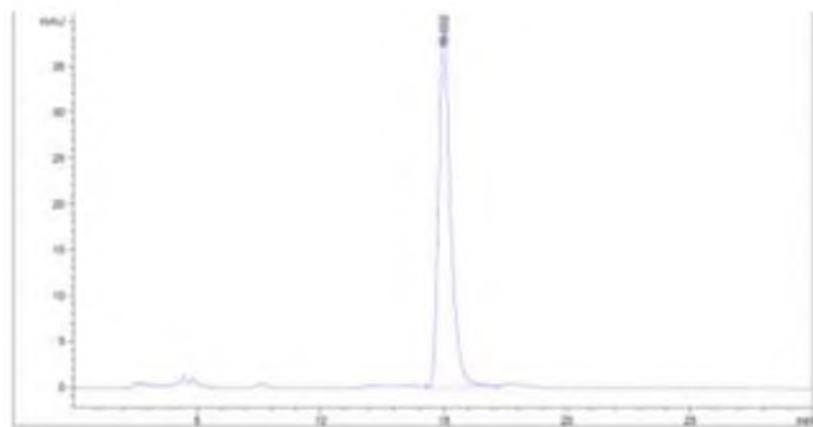


Рисунок 23. Хроматограмма раствора сравнения (б). Время удерживания пика цефотаксима – 15,002 мин.

Количественное определение цефазолина натрия методом ВЭЖХ в препарате «Интралин».

По 20 мкл раствора препарата и раствора сравнения попеременно хроматографировали на жидкостном хроматографе с УФ-детектором, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов, в следующих условиях:

- колонка размером 250 x 4,6 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии с размером частиц 5 мкм;
- подвижная фаза, дегазированная;
- соотношение подвижной фазы А:В (10:90);
- скорость подвижной фазы – 1,0 мл/мин;
- детектирование – при длине волны 270 нм;
- температура колонки – комнатная.

Приготовление растворов

Приготовление раствора препарата. 50 мг (точная навеска) препарата поместить в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворить в подвижной фазе и довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать. Используется свежеприготовленный раствор.

Приготовление раствора сравнения. 50 мг (точная навеска) РСО цефазолина поместить в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворить в подвижной фазе и довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать. Используется свежеприготовленный раствор.

Приготовление буферного раствора. 2,77 г динатрия гидрофосфата и 1,86 г лимонной кислоты поместить в мерную колбу на 1 л, растворить в 500 мл воды для инъекций и довести до метки тем же растворителем, перемешать.

Приготовление подвижной фазы. Соотношение буферного раствора и ацетонитрила для хроматографии должно быть (90:10).

Используется свежеприготовленный раствор.

Параметры пригодности хроматографической системы.

В данном исследовании ориентировались на требования, указанные в таблице 10. 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 10.

Требования к параметрам пригодности хроматографической системы, принятые в данной работе.

Параметр	Базовое требование	Желательное значение
Эффективность (N)	Не менее 2000 т.т.	Не менее 3000 т.т.
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 2000 т.т., так как значения менее 1500-2000 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.

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 количественного содержания цефазолина натрия по разработанной методике и хроматографировали последовательно раствор препарата и раствор сравнения.

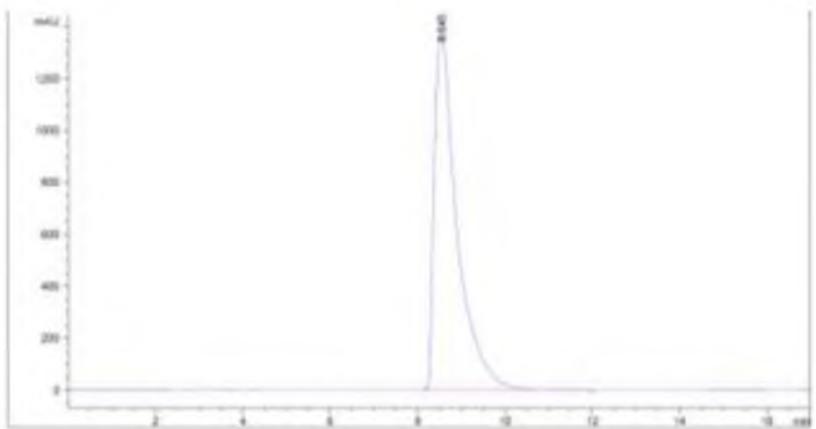


Рисунок 21. Хроматограмма раствора сравнения. Время удерживания пика цефазолина – 8,545 мин.

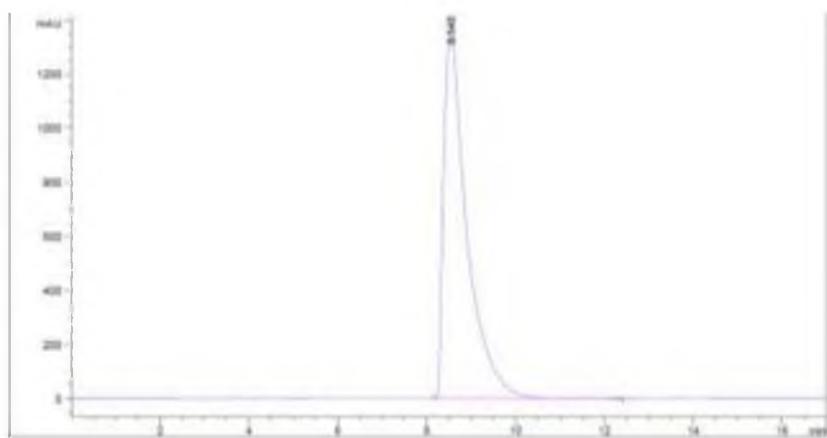


Рисунок 22. Хроматограмма раствора препарата. Время удерживания пика цефазолина – 8,548 мин.

Определение посторонних примесей цефазолина натрия методом ВЭЖХ в препарате «Интралин».

По 20 мкл раствора препарата и раствора сравнения попеременно хроматографировали на жидкостном хроматографе с УФ-детектором, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов, в следующих условиях:

- колонка размером 125 x 4,0 мм, заполненная силикагелем октадецилсилильным для хроматографии с размером частиц 3 мкм;
- подвижная фаза, дегазированная;
- скорость подвижной фазы – 1,2 мл/мин;
- детектирование – при длине волны 254 нм;
- температура колонки – 45 °C;
- соотношение подвижных фаз А:В представлены в таблице 30.

Таблица 11.

Соотношение подвижных фаз А:В.

Время (мин)	Подвижная фаза А (%, об/об)	Подвижная фаза В (%, об/об)
0-2	98	2
2-4	98→85	2→15
4-10	85→60	15→40
10-11,5	60→35	40→65
11,5-12	35	65
12-15	35→98	65→2
15-21	98	2

Приготовление растворов

Приготовление раствора препарата. 50 мг (точная навеска) препарата поместить в мерную колбу вместимостью 20 мл, растворить в подвижной фазе А и довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать. Используется свежеприготовленный раствор.

Приготовление раствора сравнения (а). 1 мл раствора препарата поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл, довести объем раствора подвижной фазой А до метки и перемешать. Используется свежеприготовленный раствор.

Приготовление раствора сравнения (б). 20 мг (точная навеска) РСО цефазолина натрия растворить в 10 мл раствора натрия гидроксида (2 г/л). Оставить на 15-30 минут. 5 мл полученного раствора поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворить в подвижной фазе А и довести объем раствора тем же растворителем до метки и перемешать. Используется свежеприготовленный раствор.

Приготовление раствора натрия гидроксида. 2,0 г натрия гидроксида поместить в мерную колбу на 1 л, растворить в 500 мл воды для инъекций и довести до метки тем же растворителем, перемешать.

Приготовление подвижной фазы А. 14,54 г динатрия гидрофосфата и 3,53г калия дигидрофосфата поместить в мерную колбу на 1 л, растворить в

500 мл воды для инъекций и довести до метки тем же растворителем, перемешать.

Приготовление подвижной фазы В. Ацетонитрил для хроматографии.

Параметры пригодности хроматографической системы.

В настоящей работе в качестве основного ориентира служил коэффициент разделения пиков, рассчитанный для пиков цефазолина и примеси L не менее 2,0, но стремились к тому, чтобы при анализе значение данного параметра было более 2,2.

Полученные результаты

Проводили анализ определения посторонних примесей в субстанции цефазолина натрия по разработанной методике и хроматографировали раствор сравнения (б).

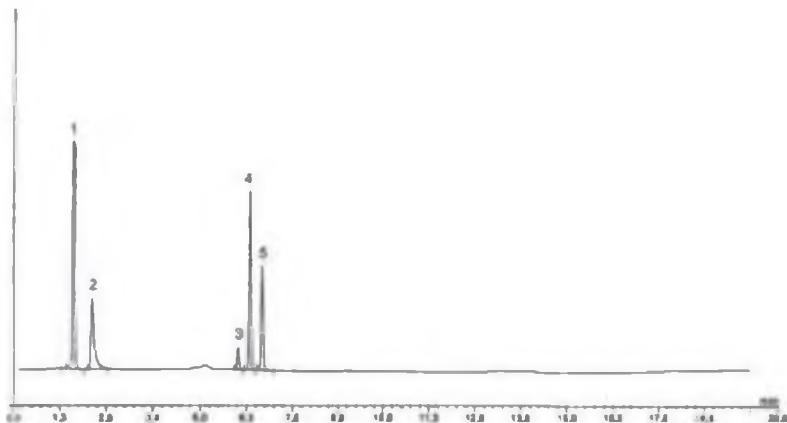


Рисунок 23. Хроматограмма раствора сравнения (б). 1 - Примесь J; 2 - Примесь E; 3 - не известная примесь; 4 - цефазолин; 5 - примесь L.

Разработка нормативной документации на субстанции «Цефтриаксон», «Цефазолин» и «Цефотаксим».

По результатам исследования разработана нормативная документация (НД) на субстанции «Цефтриаксон натрия», «Цефазолин натрия» и «Цефотаксим натрия», которая внесена в ФСП по производству лекарственных препаратов СП ООО «Jurabek Laboratories, производства Узбекистан).

НД 42 Уз-9555-2018 на субстанцию Цефтриаксон натрия. Согласно спецификации, анализ проводили по показателям, указанным в таблице 12.

Таблица 12

Спецификация проверяемых показателей субстанции цефтриаксона натрия

Название показателей	Допустимые пределы	Методы контроля	
Описание	Почти белый или желтоватый, слегка гигроскопичный, кристаллический порошок	Визуальный	
Растворимость	Легко растворим в воде, умерено растворим в метаноле, очень мало растворим в безводном этаноле	Визуальный	
Идентификация	A. Инфракрасная абсорбционная спектрофотометрия, сравнение: цефтриаксон натрия CRS. B. Он дает реакцию (a) натрия.	EP 9.0 (2.2.24)	
pH раствора	6,0 – 8,0	EP 9.0 (2.2.3)	
Специфическая оптическая ротация	-155° ~ -170°	EP 9.0 (2.2.7)	
Внешний вид раствора	Цветность: Должен быть не интенсивнее окраски эталон Y5 или BY5 Прозрачность: Должен быть прозрачным	EP 9.0 (2.2.1)	
Родственные вещества	Любая примесь	$\leq 1,0\%$	EP 9.0 (2.2.29)
	Сумма примесей	$\leq 4,0\%$	EP 9.0 (2.2.29)
Вода	8,0 ~ 11,0%	EP 9.0 (2.5.12)	
N,N-диметиланилин	$\leq 0,0020\%$	EP 9.0 (2.4.26)	
2-этилгексановая кислота	$\leq 0,8\%$	EP 9.0 (2.4.28)	
Бактериальные эндотоксины	Не более 0,08 ЕЭ/мг	EP 9.0 (2.6.14)	
Микробиологическая чистота	Общее число аэробных бактерий (в 1 г или в 1 мл) – должно быть не более 10^3	EP 9.0	

	Общее число грибов (в 1 г или в 1 мл) – должно быть не более 10^2 Escherichia coli (в 1 г или в 1 мл) должна отсутствовать	
Количественное определение	96,0% ~ 102,0% <chem>C18H16N8Na2O7S3</chem>	EP 9.0 (2.2.29)
Упаковка	В соответствии с НД	
Маркировка	В соответствии с утвержденными цветными макетами	
Хранение	Хранить в оригинальной упаковке при температуре не выше 25°C	
Срок годности	3 года	

НД 42 Уз-9590-2018 на субстанцию Цефазолин натрия. Согласно спецификации, анализ проводили по показателям, указанным в таблице 13.

Таблица 13
Спецификация проверяемых показателей субстанции цефазолина натрия

Название показателей	Допустимые пределы	Методы контроля
Описание	Порошок белого или почти белого цвета, очень гигроскопичен. Проявляет полиморфизм.	Визуально EP 8.0
Растворимость	Легко растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте	Визуально EP 8.0
Подлинность	A. Инфракрасный спектр поглощения субстанции должен соответствовать спектру СО цефазолина натрия	EP 8.0 (2.2.24)
	B. Дает положительную реакцию на натрий.	EP 8.0 (2.3.1)
Прозрачность раствора	Раствор S должен быть прозрачным	EP 8.0 (2.2.1)
Оптическая плотность раствора	Не более 0,15 при длине волны 430 нм	EP 8.0 (2.2.25)
pH	4,0 – 6,0	EP 8.0 (2.2.3)

Удельное оптическое вращение	От -15° до -24° в перерасчете на безводное вещество	EP 8.0 (2.2.7)
УФ-поглощение/удельная абсорбция	Ультрафиолетовый спектр поглощения раствора в области от 220 нм до 350 нм должен иметь максимум при длине волны 272 ± 2 нм. Удельная абсорбция раствора должна быть в максимуме от 260 до 300 в перерасчете на безводное вещество.	EP 8.0 (2.2.25)
Вода	Не более 6%	EP 8.0 (2.5.12)
Количественное определение -цефазолина натрия	Не менее 95,0 % и не более 102,0 % в перерасчете на безводное вещество	ВЭЖХ EP 8.0 (2.2.29)
Родственные соединения	На хроматограмме испытуемого раствора площадь любого пика, кроме основного, не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (а) (1,0%); сумма площадей всех пиков, кроме основного пика на хроматограмме раствора сравнения (а) (3,5%)	ВЭЖХ EP 8.0 (2.2.29)
Остаточные органические растворители - метанол - ацетон - дихлорметан - ацетонитрил	- не более 0,3% - не более 0,5% - не более 0,06% - не более 0,04%	Спецификация производителя
N,N-диметиланилин	Не более 20 ppm (0,002%)	EP 8.0 (2.4.26, метод В)
Механические включения - видимые	Видимые частицы должны отсутствовать Не более 6000 частиц	Визуально EP 8.0 (2.9.20)

- невидимые	размером ≥ 10 мкм в 1 гр в перерасчете на действующее вещество; не более 600 частиц размером ≥ 25 мкм в 1 гр в перерасчете на действующее вещество	Электронометрический метод ЕР 8.0 (2.9.19)
Бактериальные эндотоксны	Не более 0,15 IU/mg	ВР, прил. XIV, с. 349-352; ОФС 42 Уз-0001-1010-2015; EurPh 8.0 (2.6.14)
Стерильность	Препарат должен быть стерильным	Метод мембранный фильтрации. ГФ XI, вып. 2, с.187 и изм. №2 от 12.10.2005 г; EurPh 8.0 (2.6.1)
Упаковка	В соответствии с НД.	
Маркировка	В соответствии с НД.	
Хранение	В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25°C.	
Срок годности	2 года.	

НД 42 Уз-9508-2018 на субстанцию Цефотаксим натрия. Согласно спецификации, анализ проводили по показателям, указанным в таблице 14.

Таблица 14
Спецификация проверяемых показателей субстанции цефотаксима натрия.

Название показателей	Допустимые пределы	Методы контроля
Описание	Белый или слегка желтого цвета кристаллический порошок	Визуальный
Растворимость	Легко растворим в воде. Практически не растворим в органических растворителях	USP

Подлинность	Спектр образца и CRS цефотаксим натрий должен быть идентичен	ИК-спектрофотометрия
	Время удержания основного пика в ВЭЖХ, хроматограмма идентична RS	ВЭЖХ
Прозрачность раствора	Прозрачный по сравнению с водой для инъекций	USP
Оптическая плотность раствора	Не более 0,2 при длине волны 430 нм	USP
Специфическая ротация	От +58°C до +64°C	USP
pH	4,5 ~ 6,5	USP
Потеря в массе при высушивании	Не более 3,0%	USP
Посторонние примеси	Не более 1,0% Не более 3,0%	USP
Стерильность	Стерильный	USP
Бактериальные эндотоксины	не более 20 ЕЭ/мг	USP
Количественное определение	916 мкг – 964 мкг/мг в пересчете на безводное основание	USP
Упаковка	В соответствии с НД	
Маркировка	В соответствии с утвержденным цветным макетом	
Хранение	Хранить в герметичных контейнерах при температуре не выше 25°C.	
Срок годности	2 года.	

ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ.

Валидация аналитической методики – это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач.

В настоящей работе регламентируются характеристики аналитических методик, определяемые с целью их валидации, и соответствующие критерии пригодности валидируемых методик, предназначенных для контроля качества

лекарственных средств: фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов.

Валидации подлежат методики количественного определения, в том числе методики определения примесей и методики определения предела содержания. Методики проверки подлинности подвергаются валидации при необходимости подтвердить их специфичность.

При валидации проводится оценка аналитической методики по перечисленным ниже характеристикам, выбираемым с учетом типовых рекомендаций, приведенных в таблице:

- специфичности (specificity);
- пределу обнаружения (detection limit);
- пределу количественного определения (quantitation limit);
- аналитической области (range);
- линейности (linearity);
- правильности (trueness);
- прецизионности (precision);
- устойчивости (robustness).

Таблица 15
Характеристики методик, определяемых при валидации

Наименование характеристики	Основные типы методик				
	Испытание на подлинность	Посторонние примеси		Количественное определение	
		Количество нные методи-ки	Предел содержа-ния	Основного действующе-го вещества, нормируемых компонентов	Действующего вещества в teste «Растворе-ние»
Специфичность**	Да	Да	Да	Да	Да

Предел обнаружения	Нет	Нет	Да	Нет	Нет
Предел количественного определения	Нет	Да	Нет	Нет	Нет
Аналитическая область	Нет	Да	Нет	Да	Да
Линейность	Нет	Да	Нет	Да	Да
Правильность	Нет	Да	*	Да	Да
Прецизионность: – повторяемость (сходимость)	Нет	Да	Нет	Да	Да
– промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность	Нет	Да	Нет	Да	Нет
Устойчивость	Нет	*	*	*	*

* может определяться при необходимости;

** отсутствие специфичности одной аналитической методики может быть компенсировано использованием другой аналитической методики.

Ревалидацию (повторную валидацию) методик проводят при изменении:

- технологии получения объекта анализа;
- состава лекарственного средства (объекта анализа);
- ранее утвержденной методики анализа.

Специфичность

Специфичность – это способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов.

Доказательство специфичности валидируемой методики обычно основывается на рассмотрении полученных с ее использованием данных анализа модельных смесей известного состава.

Специфичность валидируемой методики может быть доказана также соответствующей статистической обработкой результатов анализов реальных объектов, выполненных с ее использованием и, параллельно, с использованием другой, заведомо специфичной, методики (методики, специфичность которой доказана).

Предел обнаружения

Предел обнаружения – это наименьшее количество (концентрация) определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено (или приближенно оценено) с использованием валидируемой методики.

Предел обнаружения в случаях, указанных в таблице, обычно выражается как концентрация определяемого вещества (в % относительных или долях на миллион – ppm).

Если имеются данные о пригодности методики для надежного определения вещества в концентрациях, лежащих как выше, так и ниже нормы его содержания, установленной спецификацией, определять реальный предел обнаружения для такой методики не требуется.

Предел количественного определения

Предел количественного определения – это наименьшее количество (концентрация) вещества в образце, которое может быть количественно оценено с использованием валидируемой методики с требуемой правильностью и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионностью.

Предел количественного определения является необходимой валидационной характеристикой методик, используемых для оценки малых количеств (концентраций) веществ в образце и, в частности, для оценки содержания примесей.

Аналитическая область методики

Аналитическая область методики – это интервал между верхним и нижним значением аналитических характеристик определяемого компонента в объекте анализа (его количества, концентрации, активности и т. п.). В этом интервале результаты, получаемые с использованием валидируемой методики,

должны иметь приемлемый уровень правильности и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности.

Методики количественного определения должны быть применимы в интервале от 80 до 120 % от номинального значения определяемой аналитической характеристики.

Линейность

Линейность методики – это наличие линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации или количества определяемого вещества в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики.

При валидации методики ее линейность в аналитической области проверяют экспериментально измерением аналитических сигналов для не менее чем 5 проб с различными количествами или концентрациями определяемого вещества.

Для некоторых методик анализа, в основу которых в принципе не может быть положена линейная зависимость между экспериментальными данными, определение концентрации или количества вещества проводят с использованием нелинейных калибровочных графиков. При этом график зависимости аналитического сигнала от количества или концентрации определяемого вещества может быть аппроксимирован подходящей нелинейной функцией с использованием метода наименьших квадратов, что выполнимо при наличии соответствующего валидированного программного обеспечения.

Правильность

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное.

Валидируемая методика признается правильной, если значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов

соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике.

Для оценки правильности методик количественного определения применимы следующие подходы:

а) анализ с использованием валидируемой методики стандартных образцов или модельных смесей с известным содержанием (концентрацией) определяемого вещества;

б) сравнение результатов, полученных с использованием валидируемой методики и образцовой методики, правильность которой ранее установлена;

в) рассмотрение результатов изучения линейности валидируемой методики: если свободный член в уравнении, приведенном в разделе 5, статистически достоверно не отличается от нуля, то использование такой методики дает результаты, свободные от систематической ошибки.

Для подходов «а» и «б» возможно представление полученных данных в виде уравнения линейной зависимости (регрессии) между экспериментально найденными и истинными величинами. Для этого уравнения проверяются гипотезы о равенстве единицы тангенса угла наклона b и о равенстве нулю свободного члена a . Как правило, если эти гипотезы признаются верными при степени надежности, равной 0,05, то использование валидируемой методики дает правильные, т. е. свободные от систематической ошибки, результаты.

Прецизионность

Прецизионность методики характеризуется рассеянием результатов, получаемых с ее использованием, относительно величины среднего результата. Мерой такого рассеяния является величина стандартного отклонения результата отдельного определения, полученная для выборки достаточно большого объема.

Прецизионность оценивается для любой методики количественного определения по результатам не менее трех определений для каждого из трех уровней определяемых величин (нижнего, среднего и верхнего), лежащих в пределах аналитической области методики. Повторяемость также может

оцениваться для любой методики количественного определения по результатам не менее шести определений для образцов с содержанием определяемого вещества, близкому к номинальному. Во многих случаях оценка прецизионности может быть проведена по результатам обработки экспериментальных данных методом наименьших квадратов, как указано в ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

Прецизионность должна исследоваться на однородных образцах и может оцениваться в трех вариантах:

- как повторяемость (сходимость);
- как внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность;
- как межлабораторная прецизионность (воспроизводимость).

Результаты оценки методики анализа по каждому из вариантов прецизионности обычно характеризуются соответствующим значением величины стандартного отклонения результата отдельного определения.

Повторяемость (сходимость). Повторяемость аналитической методики оценивают по независимым результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реагентов) в пределах короткого промежутка времени.

Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность валидируемой методики оценивается в условиях работы одной лаборатории (разные дни, разные исполнители, разное оборудование и т. д.).

Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость) валидируемой методики оценивается при проведении испытаний в разных лабораториях.

Представление результатов валидации

Протокол валидации аналитической методики должен содержать:

- ее полное описание, достаточное для воспроизведения и отражающее все условия, необходимые для выполнения анализа;
- оцениваемые характеристики;

- все первичные результаты, которые вошли в статистическую обработку данных;
- результаты статистической обработки данных, полученных экспериментально при разработке или проверке валидируемой методики;
- иллюстративные материалы, такие как копии хроматограмм, полученных методами высокоэффективной жидкостной хроматографии или газовой хроматографии; электрофореграмм, электронных и инфракрасных спектров; фотографии или рисунки хроматограмм, полученных методами тонкослойной или бумажной хроматографии; рисунки кривых титрования, калибровочные графики;
- заключение о пригодности валидируемой методики для включения в нормативный документ.

Материалы валидации отдельных аналитических методик целесообразно оформлять в виде объединенного отчета о валидации.

Валидация СФ – методов количественного определения цефалоспоринов.

Целью данной работы является разработка УФ-спектрофотометрических методик количественного определения цефалоспоринов и валидация разработанных методик с использованием предложенных в работе подходов к процедуре определения и оценке приемлемости линейности, правильности и сходимости УФ-спектрофотометрических методик количественного определения цефалоспоринов в лекарственных препаратах.

Условия проведения испытаний: температура в помещении должна быть не выше 25⁰C, влажность не более 65%.

Для определения значения pH использовали pH-метр WTW 7110, производства Германии, диапазон измерения pH: -2,000...+20,000, температура -5...+105,0⁰C (погрешность ± 0,1⁰C).

Для проведения анализов использовали двухлучевой спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu, Япония) и однолучевой спектрофотометр «Agilent» 8453E (Agilent Technologies, Германия).

Спектры получали в интервале длин волн от 200 до 760 нм. В качестве раствора сравнения использовали соответствующий растворитель.

Специфичность метода определяется путем сравнения значений действующего вещества при анализе растворителя, действующего вещества и лекарственного препарата.

Линейность метода определяется на не менее 5 разных разведениях исследуемого раствора в диапазоне применения как минимум 80 – 120% концентрации анализируемого вещества в исследуемом растворе. 2 раствора с концентрацией действующего вещества 80%, 2 раствора с концентрацией действующего вещества 90%, 2 раствора с концентрацией действующего вещества 100%, 2 раствора с концентрацией действующего вещества 110% и 2 раствора с концентрацией действующего вещества 120%.

По полученным данным строится зависимость оптической плотности от концентрации Цефалоспоринов в растворе. В программе также строится линия тренда и определяется уравнение регрессии.

Статистическая обработка полученных результатов (расчеты):

$$\text{Среднее значение: } \bar{x} = \frac{\sum_1^n x_i}{n}$$

$$\text{Коэффициент корреляции: } r_{xy} = \frac{\sum_1^n ((x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y}))}{\sqrt{\sum_1^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_1^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

$$S^2 - \text{несмещенная оценка дисперсии: } S^2 = \frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n e_i^2 = \frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

$$S - \text{стандартная ошибка регрессии: } S = \sqrt{\frac{\sum e_i^2}{n-2}}$$

S_a и S_b стандартные ошибки коэффициентов регрессии $\hat{y} = ax + b$

$$S_a = \sqrt{\bar{x}^2} S_b = \sqrt{\frac{1}{n} \sum x_i^2} S_b \quad S_b = \sqrt{\frac{S^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

n – объем выборки

Доверительный интервал для коэффициента b : $b - t_{kp} * S_b < b < b + t_{kp} * S_b$

t_{kp} – коэффициент Стьюдента

Для 95% и $n-1=9$, $t_{kp}=2,262$.

Сходимость определяется при помощи испытаний не менее 6 подготовленных проб при 100% концентрации действующего вещества в исследуемом растворе.

Среднее значение: $\bar{x} = \frac{\sum^n x_i}{n}$

Стандартное отклонение: $S_{общ} = \sqrt{\frac{\sum^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

Коэффициент вариации: $V = \frac{S_{общ}}{\bar{x}} \times 100\%$

Доверительный интервал: $\bar{x} - t_{kp} \times \frac{S_{общ}}{\sqrt{n}} < \alpha < \bar{x} + t_{kp} \times \frac{S_{общ}}{\sqrt{n}}$

$$t_p = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_p} \sqrt{\frac{N_1 N_2}{N_1 + N_2}} \quad s_p = \sqrt{\frac{\sum(x_{i1} - \bar{x}_1) + \sum(x_{i2} - \bar{x}_2)}{N-k}}$$

Определяются статистически значимые различия.

В правильности метода определяется отклик действующего вещества в плацебо. Концентрация плацебо составляет 100% навески, указанной в методике контроля. Действующее вещество добавляется в модельную смесь в соответствии с требуемым уровнем концентрации (нижняя граница – макс. 80, 100%; верхняя граница – мин. 120%).

Готовились и проводились измерения растворов препарата с концентрацией действующего вещества в интервале от 80 до 120%: 3 раствора с концентрацией действующего вещества 80%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 90%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 100%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 110% и 3 раствора с концентрацией действующего вещества 120%.

Статистическая обработка полученных результатов (расчеты):

Среднее значение: $\bar{x} = \frac{\sum^n x_i}{n}$

Стандартное отклонение: $S_{общ} = \sqrt{\frac{\sum^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

Коэффициент вариации: $V = \frac{S_{общ}}{\bar{x}} \times 100\%$

Доверительный интервал: $\bar{x} - t_{kp} \times \frac{S_{общ}}{\sqrt{n}} < \alpha < \bar{x} + t_{kp} \times \frac{S_{общ}}{\sqrt{n}}$

ткр – коэффициент Стьюдента

Для 95% и n-1=14, ткр=2,144.

Валидация метода количественного определения цефтриаксона натрия.

Количественное определение цефтриаксона натрия методом спектрофотометрии.

Для проведения процесса валидации готовили растворы цефтриаксона натрия разной концентрации.

Приготовление РСО цефтриаксона натрия. 20,0 мг (т.н.) РСО цефтриаксона натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (100%). 20,0 мг (т.н.) субстанции цефтриаксона натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (80%). 16,0 мг (т.н.) субстанции цефтриаксона натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (90%). 18,0 мг (т.н.) субстанции цефтриаксона натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (110%). 22,0 мг (т.н.) субстанции цефтриаксона натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят

объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (120%). 24,0 мг (т.н.) субстанции цефтриаксона натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре при длине волны 242 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, в качестве сравнительного раствора используется вода очищенная.

Содержание цефтриаксона натрия в препарате (Х) в % вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 200 \cdot P}{D_0 \cdot m_1 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 200} = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot P}{D_0 \cdot m_1}$$

Где:

D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора РСО цефтриаксона натрия;

m_1 – масса навески испытуемого раствора, мг;

m_0 – масса навески РСО цефтриаксона натрия, мг;

P – фактическое содержание цефтриаксона натрия в РСО, %.

Все расчеты производили в программе Microsoft Office Excel.

Специфичность

Проводилось измерение растворителя (воды), стандартного раствора и испытуемого раствора. Полученные данные приведены в таблице 16.

Таблица 16

Результаты образцов, полученные на спектрофотометре при длине волны 243 нм

Образец	Оптическая плотность, ЕА
Растворитель	0,001
Стандартный раствор	0,325
Испытуемый раствор (100%)	0,323

Линейность

Готовились и проводились измерения испытуемых растворов с различной концентрацией действующего вещества в интервале от 80 до 120%.

Таблица 17

Результаты оптической плотности, полученные в ходе анализа образцов цефтриаксона натрия разной концентрации

№	Уровень концентрации, %	X (навески Цефтриаксона натриевой соли, мг)	Y (Оптическая плотность, ЕА)
1	80	16,01	0,263
2	80	15,96	0,261
3	90	18,12	0,301
4	90	18,03	0,297
5	100	19,91	0,326
6	100	20,01	0,330
7	110	22,01	0,364
8	110	22,14	0,366
9	120	24,04	0,397
10	120	24,02	0,393

Таблица 37

Расчеты, полученные после статистической обработки результатов

Статистические характеристики	Результаты
Наклон а	0,0165
Отрезок на оси ординат b:	-0,0013
Коэффициент корреляции r.	0,9994
Уравнение прямой	$Y=0,0165x-0,0013$

параметра линейности.

По полученным данным строится зависимость оптической плотности от концентрации Цефтриаксона натриевой соли в растворе. В программе также строится линия тренда и определяется уравнение регрессии.

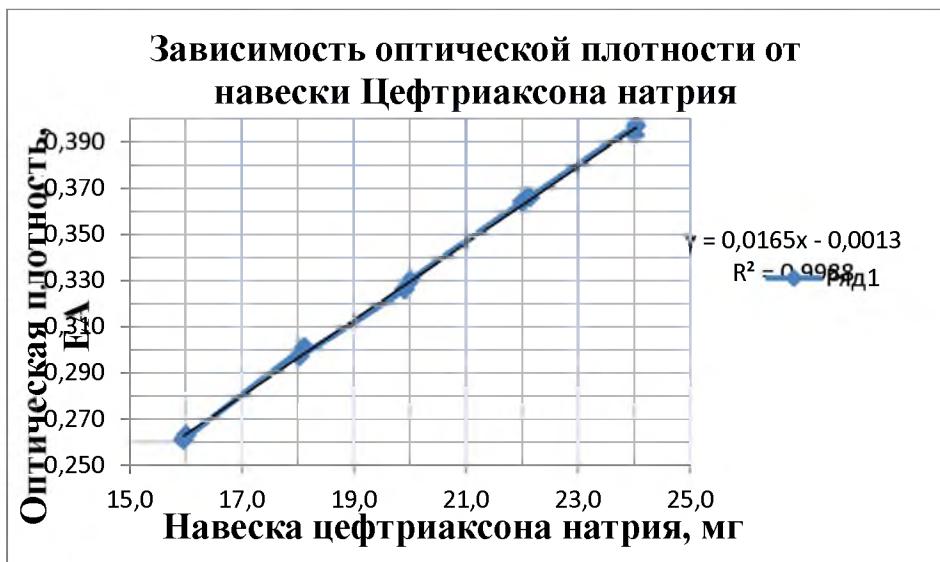


Рисунок 24. Диаграмма зависимости оптической плотности от концентрации Цефтриаксона натриевой соли в растворе.

Сходимость

Готовилось 6 растворов препарата при 100% концентрации действующего вещества. Результаты валидации по параметрам сходимости приведены в таблице 17-18.

Таблица 17

Данные и расчеты, полученные химиком-1. Навеска РСО цефтриаксона натрия – 20,12 мг, оптическая плотность раствора РСО цефтриаксона натрия – 0,331 ЕА

№	Навеска Цефтриаксона натрия, мг	Оптическая плотность, ЕА	Определенное содержание Цефтриаксона натрия, %	$X_i - X_{cp}$	$(X_i - X_{cp})^2$
1	19,91	0,326	99,34	-0,5840	0,3410
2	20,01	0,330	100,06	0,1324	0,0175
3	20,04	0,331	100,21	0,2853	0,0814
4	20,36	0,339	101,02	1,0942	1,1973
5	20,01	0,327	99,15	-0,7772	0,6041
6	20,31	0,334	99,77	-0,1507	0,0227
			99,92		

Таблица 18

Данные и расчеты, полученные химиком-2. Навеска РСО цефтриаксона натрия – 20,30 мг, оптическая плотность раствора РСО цефтриаксона натрия – 0,334 ЕА

№	Навеска Цефтриаксона натрия, мг	Оптическая плотность, ЕА	Определенное содержание Цефтриаксона натрия, %	$X_i - X_{cp}$	$(X_i - X_{cp})^2$
1	20,19	0,332	99,75	0,1918	0,0368
2	19,89	0,325	99,12	-0,4385	0,1923
3	19,19	0,319	100,84	1,2805	1,6396
4	20,01	0,326	98,83	-0,7298	0,5326
5	19,34	0,317	99,43	-0,1290	0,0166
6	19,41	0,318	99,39	-0,1750	0,0306
			99,56		

Таблица 19

Расчеты, после статистической обработки результатов параметра сходимости, полученные химиком 1 и 2

Статистические характеристики	Результаты Химик-1	Результаты Химик-2
Наименьшее значение, %	99,15	98,83
Наибольшее значение, %	101,02	100,84
Среднее значение	99,92	99,56
Стандартное отклонение	0,4622	0,6344
Коэффициент вариации	0,4625	0,6372
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)	99,44	98,90
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)	100,4	100,2
$t_{kp}(95\% \text{ и } N_1+N_2-k=10)$ 2,228	0,3960	
$F(95\% \text{ } f_1=N_1-1; f_2=N_2-1)$ 5,05	1,8844	

Правильность

Готовились и проводились измерения испытуемых растворов с концентрацией действующего вещества в интервале от 80 до 120%: 3 раствора с концентрацией действующего вещества 80%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 90%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 100%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 110% и 3 раствора с концентрацией действующего вещества 120%. Результаты валидации по параметрам правильности приведены в таблице 19. Навеска РСО цефтриаксона натрия – 20,12 мг, оптическая плотность раствора РСО цефтриаксона натрия – 0,331 ЕА.

Таблица 20

Полученные данные по параметрам правильности валидации

Уровень концентрации, %	Навеска Цефтриаксона натрия, мг	Оптическая плотность, ЕА	Определенное содержание Цефтриаксона натрия, %	Отклонение, %
80	16,01	0,263	99,66	-0,34
80	15,96	0,261	99,22	-0,78
80	15,99	0,263	99,79	-0,21
90	18,12	0,301	100,78	0,78
90	18,03	0,297	99,94	-0,06
90	18,00	0,295	99,43	-0,57
100	19,91	0,326	99,34	-0,66

100	20,01	0,330	100,06	0,06
100	20,04	0,331	100,21	0,21
110	22,01	0,364	100,34	0,34
110	22,14	0,366	100,29	0,29
110	22,09	0,361	99,15	-0,85
120	24,04	0,397	100,19	0,19
120	24,02	0,393	99,26	-0,74
120	24,01	0,396	100,06	0,06
Среднее				-0,15

Таблица 21

Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра правильности

Статистические характеристики, %	Результаты
Среднее значение	99,85
Стандартное отклонение	0,4895
Коэффициент вариации	0,4902
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)	99,58
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)	100,12

Валидация метода количественного определения цефазолина натрия.

Количественное определение цефазолина натрия методом спектрофотометрии.

Для проведения процесса валидации готовили растворы цефазолина натрия разной концентрации.

Приготовление РСО цефазолина натрия. 30,0 мг (т.н.) РСО цефазолина натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (100%). 30,0 мг (т.н.) субстанции цефазолина натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (80%). 24,0 мг (т.н.) субстанции цефазолина натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (90%). 27,0 мг (т.н.) субстанции цефазолина натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (110%). 33,0 мг (т.н.) субстанции цефазолина натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (120%). 36,0 мг (т.н.) субстанции цефазолина натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре при длине волны 272 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, в качестве сравнительного раствора используется вода очищенная.

Содержание цефазолина натрия в препарате (Х) в % вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 200 \cdot P}{D_0 \cdot m_1 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 200} = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot P}{D_0 \cdot m_1}$$

Где:

D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора РСО цефазолина натрия;

m_1 – масса навески испытуемого раствора, мг;

m_0 – масса навески РСО цефазолина натрия, мг;

P – фактическое содержание цефазолина натрия в РСО, %.

Все расчеты производили в программе Microsoft Office Excel.

Специфичность

Проводилось измерение растворителя (воды), стандартного раствора и испытуемого раствора. Полученные данные приведены в таблице 22.

Таблица 22

Результаты образцов, полученные на спектрофотометре при длине волны 272 нм

Образец	Оптическая плотность, ЕА
Растворитель	0,001
Стандартный раствор	0,427
Испытуемый раствор (100%)	0,422

Линейность

Готовились и проводились измерения испытуемых растворов с различной концентрацией действующего вещества в интервале от 80 до 120%.

Таблица 23

Результаты оптической плотности, полученные в ходе анализа образцов цефазолина натрия разной концентрации

№	Уровень концентрации, %	X (навески цефазолина натриевой соли, мг)	Y (Оптическая плотность, ЕА)
1	80	24,01	0,341
2	80	23,51	0,335
3	90	26,71	0,381
4	90	26,83	0,385
5	100	29,55	0,422
6	100	29,46	0,426
7	110	33,02	0,469
8	110	32,52	0,463
9	120	35,66	0,511
10	120	35,46	0,507

Таблица 24

Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра линейности

Статистические характеристики	Результаты
Наклон а	0,0143
Отрезок на оси ординат b:	-0,0017
Коэффициент корреляции г.	0,9994
Уравнение прямой	Y=0,0143x-0,0017

По полученным данным строится зависимость оптической плотности от концентрации Цефазолина натриевой соли в растворе. В программе также строится линия тренда и определяется уравнение регрессии.

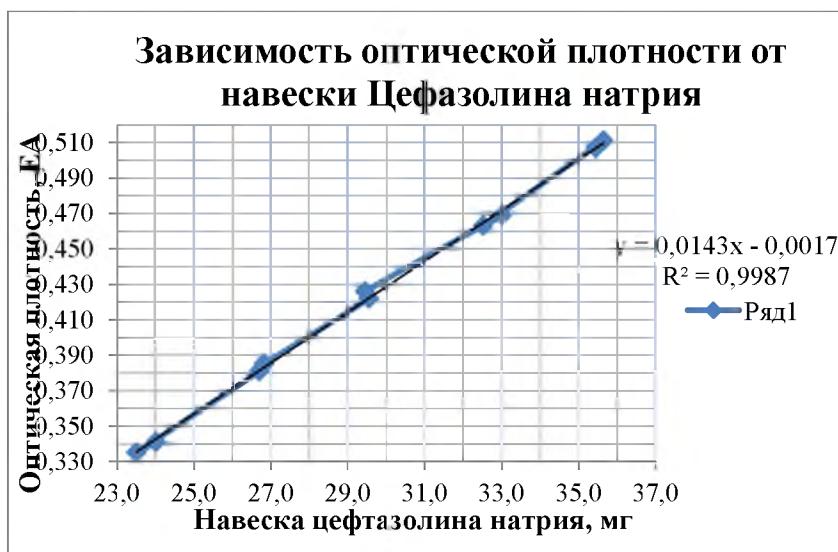


Рисунок 25. Диаграмма зависимости оптической плотности от концентрации Цефазолина натриевой соли в растворе.

Сходимость

Готовилось 6 растворов препарата при 100% концентрации Цефазолина натрия. Результаты валидации по параметрам сходимости приведены в таблице 25-26.

Таблица 25

Данные и расчеты, полученные химиком-1. Навеска РСО цефазолина натрия – 30,02 мг, оптическая плотность раствора РСО цефазолина натрия – 0,429 ЕА.

№	Навеска Цефазолина натрия, мг	Оптическая плотность, ЕА	Определенное содержание Цефазолина натрия, %	$X_i - X_{cp}$	$(X_i - X_{cp})^2$
1	29,55	0,422	99,52	-0,1632	0,0266
2	29,46	0,426	100,77	1,0871	1,1818
3	29,51	0,423	99,89	0,2079	0,0432
4	30,13	0,432	99,92	0,2340	0,0548
5	30,02	0,427	99,13	-0,5606	0,3143
6	30,94	0,439	98,88	-0,8052	0,6484
			99,69		

Таблица 26

Данные и расчеты, полученные химиком-2. Навеска РСО цефазолина натрия – 30,24 мг, оптическая плотность раствора РСО цефазолина натрия – 0,433 ЕА.

№	Навеска Цефазолина натрия, мг	Оптическая плотность, ЕА	Определенное содержание Цефазолина натрия, %	$X_i - X_{cp}$	$(X_i - X_{cp})^2$
1	29,67	0,425	99,63	0,2191	0,0480
2	29,82	0,429	100,06	0,6509	0,4236
3	29,75	0,421	98,42	-0,9840	0,9682
4	30,13	0,432	99,72	0,3139	0,0985
5	29,66	0,423	99,19	-0,2163	0,0468
6	30,43	0,435	99,43	0,0165	0,0003
			99,41		

Таблица 27

Расчеты, после статистической обработки результатов параметра сходимости, полученные химиком 1 и 2

Статистические характеристики	Результаты Химик-1	Результаты Химик-2
Наименьшее значение, %	98,88	98,42
Наибольшее значение, %	100,77	100,06
Среднее значение	99,69	99,41

Стандартное отклонение	0,4611	0,3774
Коэффициент вариации	0,4626	0,3797
Нижняя граница доверительного интервала ($P=95\%$)	99,20	99,01
Верхняя граница доверительного интервала ($P=95\%$)	100,17	99,80
$t_{kp}(95\% \text{ и } N_1+N_2-k=10)$ 2,228	0,3085	
$F(95\% f_1=N_1-1; f_2=N_2-1)$ 5,05	0,6698	

Правильность

Готовились и проводились измерения испытуемых растворов с концентрацией цефазолина натрия в интервале от 80 до 120%: 3 раствора с концентрацией действующего вещества 80%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 90%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 100%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 110% и 3 раствора с концентрацией действующего вещества 120%. Результаты валидации по параметрам правильности приведены в таблице 28. Навеска РСО цефазолина натрия – 30,02 мг, оптическая плотность раствора РСО цефазолина натрия – 0,429 ЕА.

Таблица 28

Полученные данные по параметрам правильности валидации

Уровень концентрации, %	Навеска Цефазолина натрия, мг	Оптическая плотность, ЕА	Определенное содержание Цефазолина натрия, %	Отклонение, %
80	24,01	0,341	98,98	-1,02
80	23,51	0,335	99,30	-0,70
80	23,49	0,337	99,98	-0,02
90	26,71	0,381	99,41	-0,59
90	26,83	0,385	100,00	0,00
90	26,79	0,386	100,41	0,41
100	29,55	0,422	99,52	-0,48
100	29,46	0,426	100,77	0,77
100	29,51	0,423	99,89	-0,11
110	33,02	0,469	98,98	-1,02
110	32,52	0,463	99,22	-0,78
110	32,40	0,467	100,45	0,45
120	35,66	0,511	99,86	-0,14
120	35,46	0,507	99,64	-0,36
120	35,33	0,512	100,99	0,99
Среднее				-0,17

Таблица 29

Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра правильности

Статистические характеристики, %	Результаты
Среднее значение	99,83
Стандартное отклонение	0,6225
Коэффициент вариации	0,6236
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)	99,48
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)	100,17

Валидация метода количественного определения цефотаксима натрия.

Количественное определение цефотаксима натрия методом спектрофотометрии.

Для проведения процесса валидации готовили растворы цефотаксима натрия разной концентрации.

Приготовление РСО цефотаксима натрия. 30,0 мг (т.н.) РСО цефотаксима натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (100%). 30,0 мг (т.н.) субстанции цефотаксима натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (80%). 24,0 мг (т.н.) субстанции цефотаксима натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (90%). 27,0 мг (т.н.) субстанции цефотаксима натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем

до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (110%). 33,0 мг (т.н.) субстанции цефотаксима натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Приготовление испытуемого раствора (120%). 36,0 мг (т.н.) субстанции цефотаксима натрия помещают в мерную колбу объемом 200 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают. 5 мл из этого раствора помещают в мерную колбу объемом 50 мл, доводят объем до метки очищенной водой и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре при длине волны 238 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, в качестве сравнительного раствора используется вода очищенная.

Содержание цефотаксима натрия в препарате (Х) в % вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 200 \cdot P}{D_0 \cdot m_1 \cdot 5 \cdot 50 \cdot 200} = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot P}{D_0 \cdot m_1}$$

Где:

D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора РСО цефотаксима натрия;

m_1 – масса навески испытуемого раствора, мг;

m_0 – масса навески РСО цефотаксима натрия, мг;

P – фактическое содержание цефотаксима натрия в РСО, %.

Все расчеты производили в программе Microsoft Office Excel.

Специфичность

Проводилось измерение растворителя (воды), стандартного раствора и испытуемого раствора. Полученные данные приведены в таблице 30.

Таблица 30

Результаты образцов, полученные на спектрофотометре при длине волны 238 нм

Образец	Оптическая плотность, ЕА
Растворитель	0,002
Стандартный раствор	0,551
Испытуемый раствор (100%)	0,547

Линейность

Готовились и проводились измерения испытуемых растворов с различной концентрацией действующего вещества в интервале от 80 до 120%.

Таблица 31

Результаты оптической плотности, полученные в ходе анализа образцов цефотаксима натрия разной концентрации

№	Уровень концентрации, %	X (навески цефотаксима натриевой соли, мг)	Y (Оптическая плотность, ЕА)
1	80	24,01	0,441
2	80	23,92	0,436
3	90	27,07	0,495
4	90	27,21	0,499
5	100	30,11	0,549
6	100	30,03	0,551
7	110	33,12	0,605
8	110	33,05	0,608
9	120	36,01	0,661
10	120	36,22	0,669

Таблица 32

Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра линейности.

Статистические характеристики	Результаты
Наклон а	0,0186
Отрезок на оси ординат b:	-0,0080
Коэффициент корреляции г.	0,9997
Уравнение прямой	Y=0,0186x-0,0080

По полученным данным строится зависимость оптической плотности от концентрации цефотаксима натриевой соли в растворе. В программе также строится линия тренда и определяется уравнение регрессии.

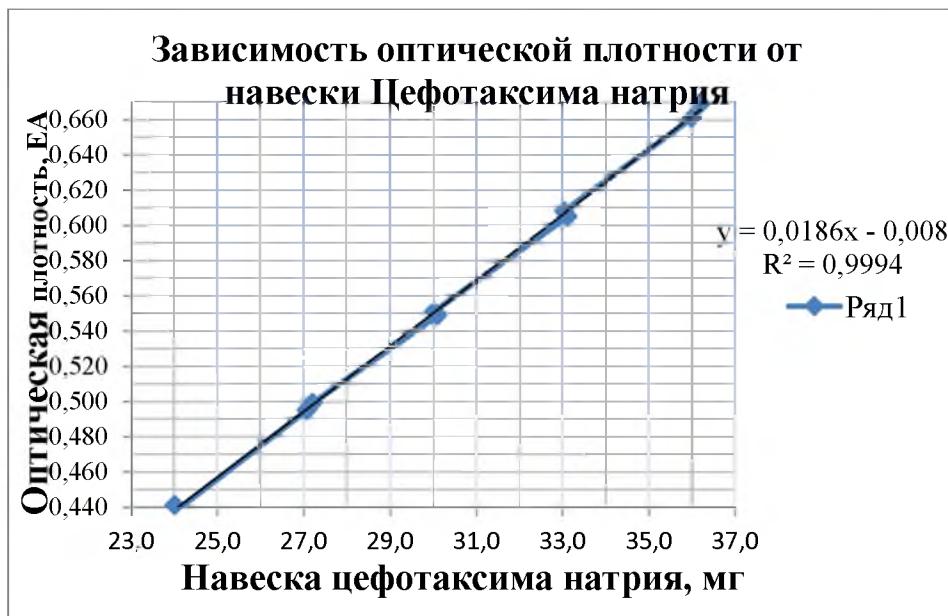


Рисунок 26. Диаграмма зависимости оптической плотности от концентрации цефотаксима натриевой соли в растворе.

Сходимость

Готовилось 6 растворов препарата при 100% концентрации цефотаксима натрия. Результаты валидации по параметрам сходимости приведены в таблице 33-34.

Таблица 33

Данные и расчеты, полученные химиком-1. Навеска РСО цефотаксима натрия – 30,09 мг, оптическая плотность раствора РСО цефотаксима натрия – 0,551 ЕА.

№	Навеска цефотаксима натрия, мг	Оптическая плотность, ЕА	Определенное содержание цефотаксима натрия, %	$X_i - X_{cp}$	$(X_i - X_{cp})^2$
1	30,11	0,549	99,32	-0,4128	0,1704
2	30,03	0,551	99,95	0,2145	0,0460
3	29,45	0,544	100,62	0,8882	0,7889
4	30,33	0,553	99,32	-0,4149	0,1721
5	29,44	0,541	100,10	0,3673	0,1349
6	29,63	0,539	99,09	-0,6423	0,4126
			99,74		

Таблица 34

Данные и расчеты, полученные химиком-2. Навеска РСО цефотаксима натрия – 29,69 мг, оптическая плотность раствора РСО цефотаксима натрия – 0,546 ЕА.

№	Навеска цефотаксима натрия, мг	Оптическая плотность, ЕА	Определенное содержание цефотаксима натрия, %	$X_i - X_{cp}$	$(X_i - X_{cp})^2$
1	30,22	0,551	98,90	-0,5117	0,2619
2	30,19	0,553	99,36	-0,0541	0,0029
3	29,56	0,544	99,82	0,4119	0,1697
4	30,76	0,561	98,93	-0,4846	0,2348
5	30,51	0,557	99,02	-0,3851	0,1483
6	29,65	0,549	100,43	1,0236	1,0478
			99,41		

Таблица 35

Расчеты, после статистической обработки результатов параметра сходимости, полученные химиком 1 и 2.

Статистические характеристики	Результаты Химик-1	Результаты Химик-2
Наименьшее значение, %	99,09	98,90
Наибольшее значение, %	100,62	100,43
Среднее значение	99,73	99,41
Стандартное отклонение	0,2741	0,3721
Коэффициент вариации	0,2748	0,3743
Нижняя граница доверительного интервала ($P=95\%$)	99,45	99,02
Верхняя граница доверительного интервала ($P=95\%$)	100,02	99,80
$t_{kp}(95\% \text{ и } N_1+N_2-k=10) 2,228$	0,4071	
$F(95\% \text{ } f_1=N_1-1; f_2=N_2-1) 5,05$		1,8433

Правильность

Готовились и проводились измерения испытуемых растворов с концентрацией цефотаксима натрия в интервале от 80 до 120%: 3 раствора с концентрацией действующего вещества 80%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 90%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 100%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 110% и 3

раствора с концентрацией действующего вещества 120%. Результаты валидации по параметрам правильности приведены в таблице 36. Навеска РСО цефотаксима натрия – 30,09 мг, оптическая плотность раствора РСО цефотаксима натрия – 0,551 ЕА.

Таблица 36

Полученные данные по параметрам правильности валидации

Уровень концентрации, %	Навеска цефотаксима натрия, мг	Оптическая плотность, ЕА	Определенное содержание цефотаксима натрия, %	Отклонение, %
80	24,01	0,441	100,05	0,05
80	23,92	0,436	99,29	-0,71
80	24,13	0,439	99,10	-0,90
90	27,07	0,495	99,61	-0,39
90	27,21	0,499	99,90	-0,10
90	26,79	0,488	99,23	-0,77
100	30,11	0,549	99,32	-0,68
100	30,03	0,551	99,95	-0,05
100	29,45	0,544	100,62	0,62
110	33,12	0,605	99,51	-0,49
110	33,05	0,608	100,21	0,21
110	32,86	0,601	99,63	-0,37
120	36,01	0,661	99,99	-0,01
120	36,22	0,669	100,61	0,61
120	35,74	0,662	100,90	0,90
Среднее				-0,14

Таблица 37.

Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра правильности

Статистические характеристики, %	Результаты
Среднее значение	99,86
Стандартное отклонение	0,5507
Коэффициент вариации	0,5514
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)	99,56
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)	100,17

Валидация ВЭЖХ – методов количественного определения цефалоспоринов.

Целью настоящей работы являлась разработка и апробация методологии процесса валидации при внедрении ВЭЖХ-методики определения количественного содержания цефалоспоринов в препаратах. Информационный поиск в научных электронных базах данных, анализ литературы и проверка на практике всех этапов процесса валидации.

Условия проведения испытаний: температура в помещении должна быть не выше 25°C , влажность не более 65%.

Для определения значения рН использовали рН-метр WTW 7110, производства Германии, диапазон измерения рН: -2,000...+20,000, температура $-5\ldots+105,0^{\circ}\text{C}$ (погрешность $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$).

В работе использовали градиентный ВЭЖХ «Agilent 1280» (Agilent Technologies, США) и LC-20 (Shimadzu, Япония). Колонка Zorbax (Agilent Technologies, США) C18 (250 мм x 4.6 мм, 5 мкм), предколонка Zorbax (Agilent Technologies, США) (14 мм x 4.6 мм, 5 мкм).

Рассчитанные параметры были удовлетворительными (отклонение не более 10–20% от заявленных производителем). При использовании колонок с высокой чувствительностью и разрешающей способностью для рутинных методик нет необходимости определять наименьшую концентрацию анализируемого вещества в образце (LOD), основным параметром, согласно требованиям Фармакопеи США, считается предел количественного определения (LOQ). При выборе методологии решался вопрос достаточной чувствительности УФ-детекции для определения минорных концентраций цефалоспоринов, имеющих низкие коэффициенты молярного поглощения в УФ-области спектра. Хроматографирование проводили в изократическом режиме.

Специфичность метода определяется путем сравнения значений действующего вещества при анализе растворителя, действующего вещества и лекарственного препарата.

Линейность метода определяется на не менее 5 разных разведениях исследуемого раствора в диапазоне применения как минимум 80 – 120% концентрации анализируемого вещества в исследуемом растворе. 2 раствора с концентрацией действующего вещества 80%, 2 раствора с концентрацией действующего вещества 90%, 2 раствора с концентрацией действующего вещества 100%, 2 раствора с концентрацией действующего вещества 110% и 2 раствора с концентрацией действующего вещества 120%.

По полученным данным строится зависимость площади пика от концентрации цефалоспоринов в растворе. В программе также строится линия тренда и определяется уравнение регрессии.

Статистическая обработка полученных результатов (расчеты):

$$\text{Среднее значение: } \bar{x} = \frac{\sum_1^n x_i}{n}$$

$$\text{Коэффициент корреляции: } r_{xy} = \frac{\sum_1^n ((x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y}))}{\sqrt{\sum_1^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_1^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

$$S^2 - \text{несмешенная оценка дисперсии: } S^2 = \frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n e_i^2 = \frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

$$S - \text{стандартная ошибка регрессии: } S = \sqrt{\frac{\sum e_i^2}{n-2}}$$

S_a и S_b стандартные ошибки коэффициентов регрессии $\hat{y}=ax+b$

$$S_a = \sqrt{\bar{x}^2} S_b = \sqrt{\frac{1}{n} \sum x_i^2} S_b \quad S_b = \sqrt{\frac{S^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}}$$

n – объем выборки

Доверительный интервал для коэффициента b: $b - t_{kp} * S_b < b < b + t_{kp} * S_b$

t_{kp} – коэффициент Стьюдента

Для 95% и n-1=9, t_{kp}=2,262.

Сходимость определяется при помощи испытаний не менее 6 подготовленных проб при 100% концентрации действующего вещества в исследуемом растворе.

$$\text{Среднее значение: } \bar{x} = \frac{\sum_1^n x_i}{n}$$

$$\text{Стандартное отклонение: } S_{общ} = \sqrt{\frac{\sum_1^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Коэффициент вариации: $V = \frac{S_{общ}}{\bar{x}} \times 100\%$

Доверительный интервал: $\bar{x} - t_{kp} \times \frac{S_{общ}}{\sqrt{n}} < \alpha < \bar{x} + t_{kp} \times \frac{S_{общ}}{\sqrt{n}}$

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_p} \sqrt{\frac{N_1 N_2}{N_1 + N_2}}$$
$$sp = \sqrt{\frac{\sum(x_{i1} - \bar{x}_1) + \sum(x_{i2} - \bar{x}_2)}{N - k}}$$

Определяются статистически значимые различия.

В правильности метода определяется отклик действующего вещества в плацебо. Концентрация плацебо составляет 100% навески, указанной в методике контроля. Действующее вещество добавляется в модельную смесь в соответствии с требуемым уровнем концентрации (нижняя граница – макс. 80, 100%; верхняя граница – мин. 120%).

Готовились и проводились измерения растворов препарата с концентрацией действующего вещества в интервале от 80 до 120%: 3 раствора с концентрацией действующего вещества 80%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 90%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 100%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 110% и 3 раствора с концентрацией действующего вещества 120%.

Статистическая обработка полученных результатов (расчеты):

Среднее значение: $\bar{x} = \frac{\sum^n x_i}{n}$

Стандартное отклонение: $S_{общ} = \sqrt{\frac{\sum^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$

Коэффициент вариации: $V = \frac{S_{общ}}{\bar{x}} \times 100\%$

Доверительный интервал: $\bar{x} - t_{kp} \times \frac{S_{общ}}{\sqrt{n}} < \alpha < \bar{x} + t_{kp} \times \frac{S_{общ}}{\sqrt{n}}$

t_{kp} – коэффициент Стьюдента

Для 95% и $n-1=14$, $t_{kp}=2,144$.

Валидация метода количественного определения цефтриаксона натрия.

Валидация метода количественного определения цефтриаксона натрия методом ВЭЖХ в препарате Витаксон.

Все расчеты производили в программе Microsoft Office Excel.

Специфичность

Проводилось измерение растворителя, стандартного раствора и испытуемого раствора. Полученные данные приведены в таблице 38.

Таблица 38

Полученные результаты образцов на ВЭЖХ УФ-детектором при длине волны 254 нм

Образец	Площадь пика
Растворитель	12
Стандартный раствор	447867
Лекарственный препарат	446281

Линейность

Готовились и проводились измерения испытуемых растворов с различной концентрацией действующего вещества в интервале от 80 до 120%.

Таблица 39

Полученные площади пиков хроматограммы образцов при разной концентрации цефтриаксона натрия.

№	Уровень концентрации, %	X (навески цефтриаксона натриевой соли, мг)	Y (площадь пика)
1	80	24,11	354789
2	80	24,02	354568
3	90	27,02	402192
4	90	26,88	401876
5	100	30,01	445982
6	100	30,12	446214
7	110	33,02	489752
8	110	33,17	489874
9	120	36,01	537056
10	120	36,24	536902

Таблица 40

Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра линейности

Статистические характеристики	Результаты
Наклон а	14939,3
Отрезок на оси ординат b:	-3155,4
Коэффициент корреляции r.	0,9996
Уравнение прямой	$Y=14939,3x-3155,4$

По полученным данным строится зависимость оптической плотности от концентрации цефтриаксона натриевой соли в растворе. В программе также строится линия тренда и определяется уравнение регрессии.

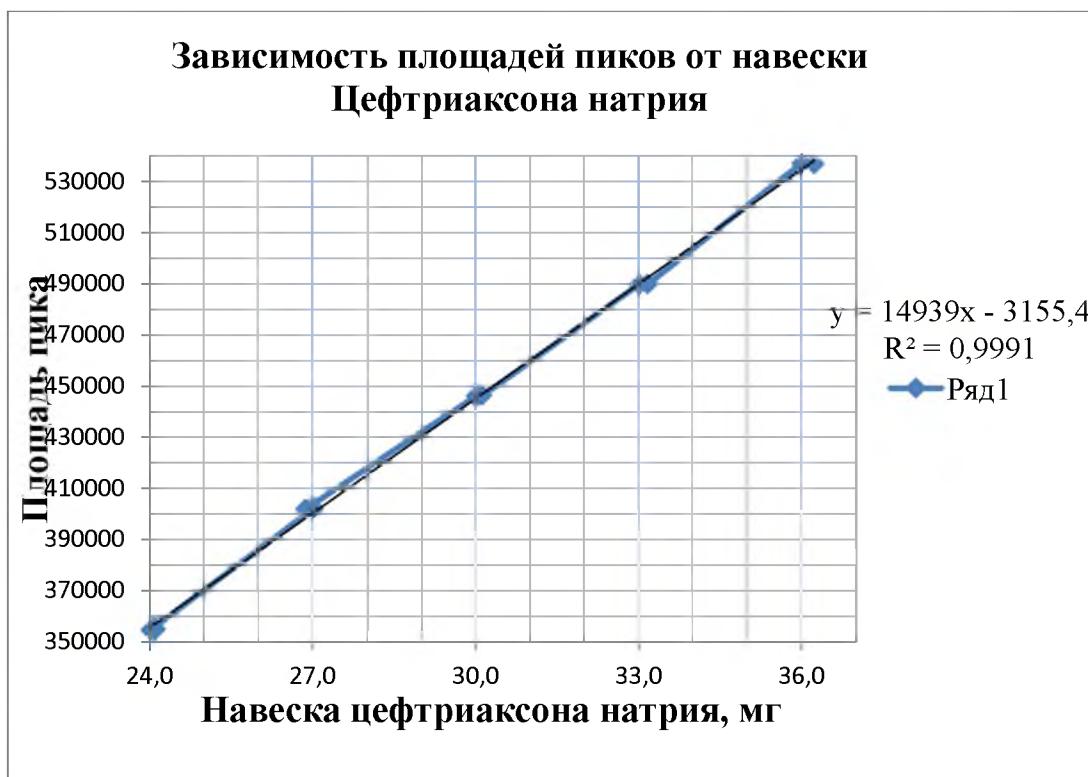


Рисунок 26. Диаграмма зависимости площадей пиков от концентрации цефтриаксона натриевой соли в растворе.

Сходимость

Готовилось 6 растворов препарата при 100% концентрации цефтриаксона натрия. Результаты валидации по параметрам сходимости приведены в таблице 41-42.

Таблица 41

**Данные и расчеты, полученные химиком-1. Навеска РСО
цефтриаксона натрия – 30,19 мг, площадь пика раствора РСО
цефтриаксона натрия – 447809**

№	Навеска цефтриаксона натрия, мг	Площадь пика	Определенное содержание цефтриаксона натрия, %	$X_i - X_{cp}$	$(X_i - X_{cp})^2$
1	30,01	445982	100,00	0,3564	0,1271
2	30,12	446214	99,69	0,0431	0,0019
3	30,24	446647	99,39	-0,2562	0,0656
4	30,12	448912	100,29	0,6458	0,4171
5	29,69	436231	98,87	-0,7757	0,6017
6	30,13	446109	99,63	-0,0135	0,0002
			99,64		

Таблица 42

**Данные и расчеты, полученные химиком-2. Навеска РСО
цефтриаксона натрия – 30,31 мг, площадь пика раствора РСО
цефтриаксона натрия – 447912**

№	Навеска цефтриаксона натрия, мг	Площадь пика	Определенное содержание цефтриаксона натрия, %	$X_i - X_{cp}$	$(X_i - X_{cp})^2$
1	30,21	447997	100,16	0,8652	0,7485
2	29,87	441143	99,75	0,4555	0,2074
3	30,09	442571	99,34	0,0467	0,0022
4	30,02	437128	98,35	-0,9463	0,8955
5	29,91	437231	98,73	-0,5613	0,3151
6	30,31	446227	99,43	0,1403	0,0197
			99,29		

Таблица 43

Расчеты, после статистической обработки результатов параметра сходимости, полученные химиком 1 и 2

Статистические характеристики	Результаты Химик-1	Результаты Химик-2
Наименьшее значение, %	98,87	98,35
Наибольшее значение, %	100,29	100,16
Среднее значение	99,64	99,29
Стандартное отклонение	0,2494	0,3759
Коэффициент вариации	0,2503	0,3786
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)	99,38	98,90
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)	99,90	99,69
$t_{kp}(95\% \text{ и } N_1+N_2-k=10)$ 2,228	0,5041	
$F(95\% \text{ } f_1=N_1-1; f_2=N_2-1)$ 5,05	2,2719	

Правильность

Готовились и проводились измерения испытуемых растворов с концентрацией цефтриаксона натрия в интервале от 80 до 120%: 3 раствора с концентрацией действующего вещества 80%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 90%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 100%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 110% и 3 раствора с концентрацией действующего вещества 120%. Результаты валидации по параметрам правильности приведены в таблице 44. Навеска РСО цефтриаксона натрия – 30,19 мг, площадь пика раствора РСО цефтриаксона натрия – 447809.

Таблица 44

Полученные данные по параметрам правильности валидации

Уровень концентрации, %	Навеска цефтриаксона натрия, мг	Площадь пика	Определенное содержание цефтриаксона натрия, %	Отклонение, %
80	24,11	354789	99,02	-0,98
80	24,02	354568	99,33	-0,67
80	23,86	354216	99,89	-0,11
90	27,02	402192	100,16	0,16
90	26,88	401876	100,60	0,60

90	27,08	402245	99,95	-0,05
100	30,01	445982	100,00	0,00
100	30,12	446214	99,69	-0,31
100	30,24	446647	99,39	-0,61
110	33,02	489752	99,80	-0,20
110	33,17	489874	99,38	-0,62
110	33,31	497601	100,52	0,52
120	36,01	537056	100,36	0,36
120	36,24	536902	99,69	-0,31
120	36,35	539972	99,96	-0,04
Среднее				-0,15

Таблица 45

Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра правильности

Статистические характеристики, %	Результаты
Среднее значение	99,85
Стандартное отклонение	0,4527
Коэффициент вариации	0,4534
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)	99,60
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)	100,1

Валидация метода количественного определения цефазолина натрия.

Валидация метода количественного определения цефазолина натрия методом ВЭЖХ в препарате Интрапарин.

Все расчеты производили в программе Microsoft Office Excel.

Специфичность

Проводилось измерение растворителя, стандартного раствора и испытуемого раствора. Полученные данные приведены в таблице 46.

Таблица 46

Полученные результаты образцов на ВЭЖХ УФ-детектором при длине волны 270 нм

Образец	Площадь пика
Растворитель	Не обнаружен
Стандартный раствор	720912
Лекарственный препарат	717991

Линейность

Готовились и проводились измерения испытуемых растворов с различной концентрацией действующего вещества в интервале от 80 до 120%.

Таблица 47

Полученные площади пиков хроматограммы образцов при разной концентрации цефазолина натрия

№	Уровень концентрации, %	X (навески цефазолина натриевой соли, мг)	Y (площадь пика)
1	80	40,24	576801
2	80	39,66	565119
3	90	45,27	644099
4	90	45,07	644773
5	100	50,11	716176
6	100	50,04	716048
7	110	55,49	787601
8	110	54,91	787088
9	120	59,27	851375
10	120	60,12	858647

Таблица 48. Расчеты, полученные после статистической обработки

Статистические характеристики	Результаты
Наклон а	14346,8
Отрезок на оси ординат b:	-2824,1
Коэффициент корреляции г.	0,9997
Уравнение прямой	Y=14346,8x-2824,1

результатов параметра линейности.

По полученным данным строится зависимость оптической плотности от концентрации цефазолина натриевой соли в растворе. В программе также строится линия тренда и определяется уравнение регрессии.

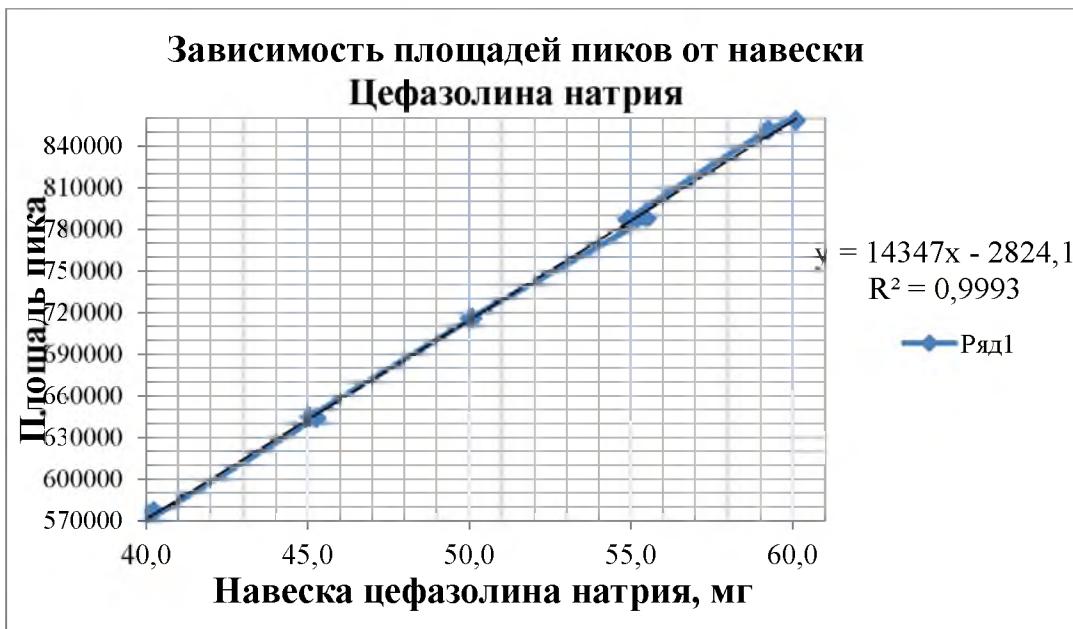


Рисунок 27. Диаграмма зависимости площадей пиков от концентрации цефазолина натриевой соли в растворе.

Сходимость

Готовилось 6 растворов препарата при 100% концентрации цефазолина натрия. Результаты валидации по параметрам сходимости приведены в таблице 49-50.

Таблица 49

Данные и расчеты, полученные химиком-1. Навеска РСО цефазолина натрия – 50,61 мг, площадь пика раствора РСО цефазолина натрия – 721459

№	Навеска цефазолина натрия, мг	Площадь пика	Определенное содержание цефазолина натрия, %	$X_i - X_{cp}$	$(X_i - X_{cp})^2$
1	50,11	716176	99,85	0,1600	0,0256
2	50,04	716048	99,97	0,2818	0,0794
3	49,58	714137	100,63	0,9400	0,8836
4	50,21	717381	99,82	0,1288	0,0166
5	50,44	717404	99,36	-0,3232	0,1045
6	49,75	701437	98,50	-1,1873	1,4096
			99,69		

Таблица 50

Данные и расчеты, полученные химиком-2. Навеска РСО цефазолина натрия – 50,06 мг, площадь пика раствора РСО цефазолина натрия – 714293

№	Навеска цефазолина натрия, мг	Площадь пика	Определенное содержание цефазолина натрия, %	$X_i - X_{cp}$	$(X_i - X_{cp})^2$
1	49,93	715367	100,02	0,6699	0,4487
2	50,15	709006	98,77	-0,5808	0,3373
3	50,42	712338	98,70	-0,6480	0,4200
4	49,78	710492	99,71	0,3619	0,1309
5	50,08	714381	99,66	0,3071	0,0943
6	50,31	714659	99,24	-0,1099	0,0121
			99,35		

Таблица 51

Расчеты, после статистической обработки результатов параметра сходимости, полученные химиком 1 и 2

Статистические характеристики	Результаты Химик-1	Результаты Химик-2
Наименьшее значение, %	98,50	98,70
Наибольшее значение, %	100,63	100,02
Среднее значение	99,69	99,35
Стандартное отклонение	0,5879	0,1847
Коэффициент вариации	0,5897	0,1859
Нижняя граница доверительного интервала ($P=95\%$)	99,07	99,16
Верхняя граница доверительного интервала ($P=95\%$)	100,3	99,54
$t_{kp}(95\% \text{ и } N_1+N_2-k=10)$ 2,228	0,3584	
$F(95\% \text{ } f_1=N_1-1; f_2=N_2-1)$ 5,05	0,0987	

Правильность

Готовились и проводились измерения испытуемых растворов с концентрацией цефазолина натрия в интервале от 80 до 120%: 3 раствора с концентрацией действующего вещества 80%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 90%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 100%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 110% и 3

раствора с концентрацией действующего вещества 120%. Результаты валидации по параметрам правильности приведены в таблице 52. Навеска РСО цефазолина натрия – 50,61 мг, площадь пика раствора РСО цефазолина натрия – 721459.

Таблица 52

Полученные данные по параметрам правильности валидации

Уровень концентрации, %	Навеска цефазолина натрия, мг	Площадь пика	Определенное содержание цефазолина натрия, %	Отклонение, %
80	40,24	576801	100,14	0,14
80	39,66	565119	99,55	-0,45
80	40,05	571247	99,65	-0,35
90	45,27	644099	99,40	-0,60
90	45,07	644773	99,94	-0,06
90	44,67	640172	100,12	0,12
100	50,11	716176	99,85	-0,15
100	50,04	716048	99,97	-0,03
100	49,58	714137	100,63	0,63
110	55,49	787601	99,16	-0,84
110	54,91	787088	100,14	0,14
110	55,07	789653	100,18	0,18
120	59,27	851375	100,35	0,35
120	60,12	858647	99,78	-0,22
120	60,01	852461	99,24	-0,76
Среднее				0,14

Таблица 53

Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра правильности

Статистические характеристики, %	Результаты
Среднее значение	99,87
Стандартное отклонение	0,4149
Коэффициент вариации	0,4154
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)	99,64
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)	100,10

Валидация метода количественного определения цефотаксима натрия.

Валидация метода количественного определения цефотаксима натрия методом ВЭЖХ в препарате Цеффаст.

Все расчеты производили в программе Microsoft Office Excel.

Специфичность

Проводилось измерение растворителя, стандартного раствора и испытуемого раствора. Полученные данные приведены в таблице 54.

Таблица 54

Полученные результаты образцов на ВЭЖХ УФ-детектором при длине волны 235 нм

Образец	Площадь пика
Растворитель	Не обнаружен
Стандартный раствор	619257
Лекарственный препарат	609904

Линейность

Готовились и проводились измерения испытуемых растворов с различной концентрацией действующего вещества в интервале от 80 до 120%.

Таблица 55

Полученные площади пиков хроматограммы образцов при разной концентрации цефотаксима натрия

№	Уровень концентрации, %	X (навески цефотаксима натриевой соли, мг)	Y (площадь пика)
1	80	19,75	493087
2	80	20,16	494583
3	90	22,68	556710
4	90	22,41	555638
5	100	25,19	618337
6	100	24,91	617299
7	110	27,11	675347
8	110	27,39	675814
9	120	30,06	741903
10	120	31,21	772607

Таблица 56

Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра линейности

Статистические характеристики	Результаты
Наклон а	24758,9
Отрезок на оси ординат b:	-993,5
Коэффициент корреляции r.	0,9994
Уравнение прямой	Y=24758,9x-993,5

По полученным данным строится зависимость оптической плотности от концентрации цефотаксима натриевой соли в растворе. В программе также строится линия тренда и определяется уравнение регрессии.

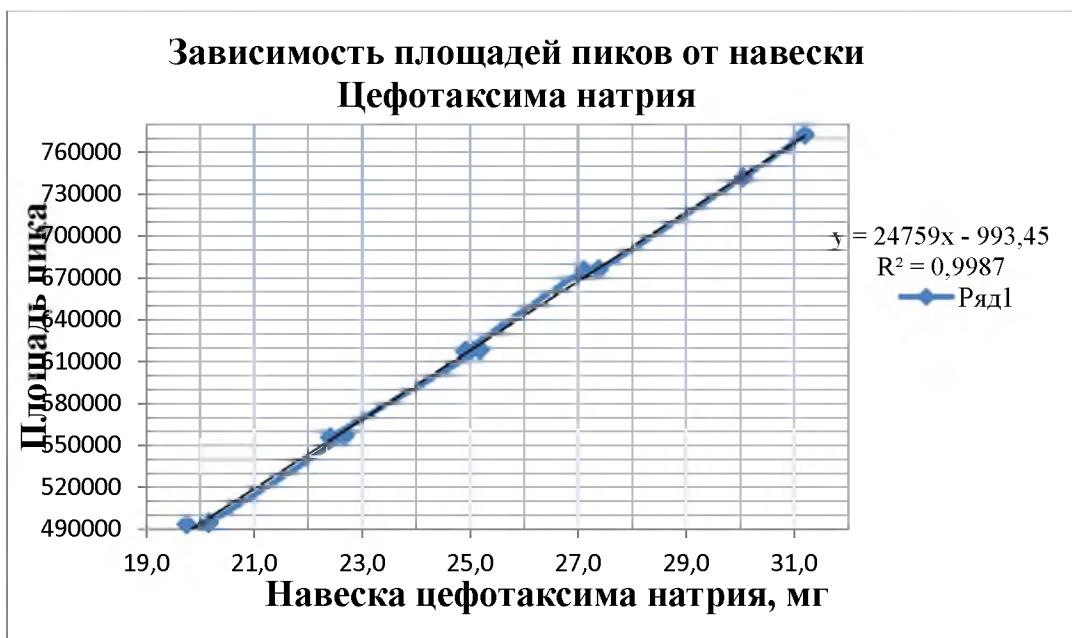


Рисунок 27. Диаграмма зависимости площадей пиков от концентрации цефотаксима натриевой соли в растворе.

Сходимость

Готовилось 6 растворов препарата при 100% концентрации цефотаксима натрия. Результаты валидации по параметрам сходимости приведены в таблице 56-57.

Таблица 56

**Данные и расчеты, полученные химиком-1. Навеска РСО
цефотаксима натрия – 25,09 мг, площадь пика раствора РСО
цефотаксима натрия – 619257**

№	Навеска цефотаксима натрия, мг	Площадь пика	Определенное содержание цефотаксима натрия, %	$X_i - X_{ср}$	$(X_i - X_{ср})^2$
1	25,19	618337	99,21	-0,4995	0,2495
2	24,91	617299	100,15	0,4472	0,2000
3	25,03	617876	99,77	0,0602	0,0036
4	25,13	618502	99,47	-0,2361	0,0557
5	25,61	624331	98,53	-1,1805	1,3937
6	24,76	619472	101,11	1,4087	1,9843
			99,71		

Таблица 57

**Данные и расчеты, полученные химиком-2. Навеска РСО
цефотаксима натрия – 24,97 мг, площадь пика раствора РСО
цефотаксима натрия – 616701**

№	Навеска цефотаксима натрия, мг	Площадь пика	Определенное содержание цефотаксима натрия, %	$X_i - X_{ср}$	$(X_i - X_{ср})^2$
1	25,11	616704	99,19	-0,3099	0,0960
2	25,04	618006	99,68	0,1774	0,0315
3	24,79	619919	101,00	1,4944	2,2331
4	25,24	615113	98,43	-1,0754	1,1564
5	24,67	612306	100,24	0,7393	0,5465
6	25,16	613472	98,48	-1,0258	1,0523
			99,50		

Таблица 58

**Расчеты, после статистической обработки результатов параметра
сходимости, полученные химиком 1 и 2**

Статистические характеристики	Результаты Химик-1	Результаты Химик-2
Наименьшее значение, %	98,53	98,43
Наибольшее значение, %	101,11	101,00
Среднее значение	99,71	99,50
Стандартное отклонение	0,8327	0,8220

Коэффициент вариации	0,8352	0,8261
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)	98,83	98,64
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)	100,58	100,37
$t_{kp}(95\% \text{ и } N_1+N_2-k=10)$ 2,228	0,1666	
$F(95\% \text{ f}_1=N_1-1; \text{f}_2=N_2-1)$ 5,05	0,9743	

Правильность

Готовились и проводились измерения испытуемых растворов с концентрацией цефотаксима натрия в интервале от 80 до 120%: 3 раствора с концентрацией действующего вещества 80%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 90%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 100%, 3 раствора с концентрацией действующего вещества 110% и 3 раствора с концентрацией действующего вещества 120%. Результаты валидации по параметрам правильности приведены в таблице 59. Навеска РСО цефотаксима натрия – 25,09 мг, площадь пика раствора РСО цефотаксима натрия – 619257.

Таблица 59
Полученные данные по параметрам правильности валидации

Уровень концентрации, %	Навеска цефотаксима натрия, мг	Площадь пика	Определенное содержание цефотаксима натрия, %	Отклонение, %
80	19,75	493087	100,90	0,90
80	20,16	494583	99,15	-0,85
80	20,02	493991	99,72	-0,28
90	22,68	556710	99,20	-0,80
90	22,41	555638	100,21	0,21
90	22,72	556917	99,07	-0,93
100	25,19	618337	99,21	-0,79
100	24,91	617299	100,15	0,15
100	25,03	617876	99,77	-0,23
110	27,11	675347	100,68	0,68
110	27,39	675814	99,72	-0,28
110	27,59	676906	99,16	-0,84
120	30,06	741903	99,75	-0,25

120	31,21	772607	100,05	0,05
120	29,99	740442	99,78	-0,22
Среднее				-0,23

Таблица 60
Расчеты, полученные после статистической обработки результатов параметра правильности

Статистические характеристики, %	Результаты
Среднее значение	99,77
Стандартное отклонение	0,5620
Коэффициент вариации	0,5634
Нижняя граница доверительного интервала (P=95%)	99,46
Верхняя граница доверительного интервала (P=95%)	100,08

ВЫВОДЫ

1. На основании полученных результатов можно считать метод аттестованным и пригодным для оценки качества лекарственных препаратов цефалоспоринного ряда.
2. Сложная сопряженная структура молекул цефалоспоринов обуславливает интенсивное поглощение в УФ области спектра.
3. Для растворения субстанций и действующих веществ из лекарственных форм целесообразно использовать воду, что делает методику пробоподготовки достаточно простой и дешевой. Рекомендуемая концентрация раствора составляет от 10 мкг/мл до 20 мкг/мл в зависимости от лекарственного вещества.
4. При контроле качества лекарственных препаратов группы цефалоспоринов и при выявлении фальсифицированных средств возможно использование стандартных УФ-спектров для установления подлинности, что упрощает анализ и значительно снижает его стоимость.
5. Подобраны оптимальные условия хроматографирования, использовалась ПФ с крайними соотношениями водного и органического компонентов (10:90). Также ориентировались на минимальное отношение S/N, равное 1000. При проведении анализа чистоты цефалоспоринов концентрация раствора была такой, что получались пики примесей с S/N не менее 20. При этом S/N для действующего вещества составляла до 10000.
6. Выбор водного компонента ПФ основан, в первую очередь, на кислотно-основных свойствах цефалоспоринов. Было исследовано, что влияние ПФ различного состава на хроматографические характеристики данных соединений. При этом соотношение ацетонитрила и буферного компонента в наиболее приемлемых для анализа цефалоспоринов элюентах составляло обычно от 50:50 до 10:90, соответственно, что

говорит о высокой подвижности данных соединений на обращенной фазе. Это связано с относительно высокой полярностью молекул цефалоспоринов, наличием заряженных функциональных групп и, соответственно, их слабым удерживанием на неполярной НФ.

7. Найдены условия ВЭЖХ методики анализа цефотаксима в лекарственном препарате «Цеффаст», которые дают возможность не только идентифицировать последнее, но и определить количественное содержание, а также дать оценку о его чистоте.

8. Было установлено, что без «зашкаливания» детектора концентрация может составлять в зависимости от условий хроматографирования и испытуемого соединения до 3-5 мг/мл. Это позволяет использовать метод внутренней нормализации для установления содержания примесей. При наличии стандартных образцов примесей (либо при расчете по стандартному раствору действующего вещества) можно использовать и более высокие концентрации испытуемого раствора, но необходимо принимать во внимание, что это может привести к перегрузке колонки и искажению полученных результатов.

9. Изучен механизм удерживания цефалоспориновых антибиотиков на алкилсиликагелях. В механизме удерживания цефалоспоринов на неполярных сорбентах преобладают гидрофобно-дисперсионные взаимодействия, участвуют водородные связи. Установлено, что их элюирование происходит главным образом в порядке увеличения гидрофобных свойств.

10. Выявлено наличие линейной связи между коэффициентами емкости цефалоспориновых антибиотиков на алкилсиликагелях в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ и их гидрофобностью.

11. На основании полученных данных разработан процесс валидации спектрофотометрических и ВЭЖХ-методик для количественного определения цефалоспоринов в лекарственных препаратах, в котором

определены и обоснованы объем, последовательность процесса и систематизированы критерии приемлемости.

12. В процессе валидации все измеряемые параметры: специфичность, линейность, сходимость, правильность соответствуют критериям приемлемости.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография): Т. 1,2. Пер. с англ. - М.: - 1999.
2. Гороновский И.Т., Назаренко Ю.П., Некряч Е.Ф. Краткий справочник по химии. - Киев: Наукова Думка, 1974.
3. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. В 2 т. — М.: Мир, 1981.
4. Лебедева Н.Н., Дорофеев В.Л., Арзамасцев А.П. Выявление фальсифицированных лекарственных средств группы цефалоспоринов методом ТСХ / Пути и формы совершенствования фарм. образования. Материалы 3-й всероссийской научно-методической конференции. — 2007.-ч.1.
5. Шеллард Э. Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое: Пер. с англ. — М.: Мир, 1971.
6. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. Пер. с нем. - М.: Мир, 1965.
7. Андерсон А.А. Жидкостная хроматография аминосоединений. - Рига: Зинатне, 1984.
8. Шаршунова М., Шварц В., Махалев Ч. Тонкослойная хроматография в фармацевтической и клинической биохимии: Пер. со словацкого. - М.: Мир, 1980.
9. Яшин Я.И. Физико-химические основы хроматографического разделения. - М.: Химия, 1976.
10. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография) / Под ред. В.Г. Березкина М.: Химия, 1999. Т. 1 и 2.
11. Дегтерев Е.В., Тяглов Б.В., Красиков В.Д., Малахова И.И., Гаевский А.В. Применение тонкослойной хроматографии в анализе биологически активных веществ / В кн. 100 лет хроматографии. М. Наука, 2003.
12. Айазов Б.В. Практическое руководство по хроматографии. - М.: Высшая школа, 1968.

13. Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. - 11-е изд., доп. - М.: Медицина, 1987.
14. Государственная фармакопея СССР: Вып.2 Общие методы анализа / МЗ СССР. - 11-е изд., доп. - М.: Медицина, 1987.
15. Дмитриев М.Т., Малышева А.Г., Растворникова Е.Г. Суд.- мед.экспертиза. Специфические органические соединения в продуктах жизнедеятельности / Космическая биология и авиакосмическая медицина. - 1987. - № 4.
16. Морозов А.А. Хроматография в неорганическом анализе. - М.: Высш. шк., 1972.
17. Фиалков Я. А. Методы исследования лекарственных веществ. - М.: Медгиз, 1946.
18. Вилков Л.В., Пентин Ю.А. Физические методы исследования в химии. Структурные методы и оптическая спектроскопия. - М.: Высш.школа, 1987.
19. Выявление фальсифицированных лекарственных средств с использованием современных аналитических методов / А.П. Арзамасцев, В.Л. Дорофеев, А.А. Коновалов и др. // Химико-фармацевтический журнал. - 2004. - № 3.
20. Использование современных методов анализа для выявления фальсифицированных лекарственных средств / А.П. Арзамасцев, В.Л. Дорофеев, А.А. Коновалов и др. // Фармацевтический вестник Узбекистана. - 2004. - № 1.
21. Экспресс-анализ с целью выявления фальсифицированных лекарственных средств. Практическое руководство. Фторхинолоны и цефалоспорины / А.П. Арзамасцев, В.Л. Дорофеев, А.А. Коновалов и др. - М.: Издательский дом Русский врач, 2003.
22. Экспресс-анализ с целью выявления фальсифицированных лекарственных средств / А.П. Арзамасцев, В.Л. Дорофеев, А.А. Коновалов и др. // Пути и формы совершенствования фарм. образования:

Матер, межрегион, научно-методич. конф. Фармобразование - 2003. - Воронеж, 2003.

23. Ahn, D. Calculation of linear and nonlinear intersubband optical absorptions in a quantum well model with an applied electric field / D. Ahn, S. L. Chuang // IEEE Journal of Quantum Electronics.— 1987.— Vol. 23.
24. Основы аналитической химии. В 2 кн. Кн.1. Общие вопросы. Методы разделения / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева и др. - М.: Высш. шк., 2002.
25. Пейсахсон И.В. Оптика спектральных приборов. - Ленинград: Машиностроение, 1975.
26. Эляшберг М.Е., Грибов Л.А., Серов В.В. Колебания молекул. - М.: Наука, 1972.
27. Юинг Г. Инструментальные методы химического анализа: Пер. с англ. - М.: Мир, 1989.
28. Ярославский Н.Г., Методика и аппаратура длинноволновой инфракрасной спектроскопии. — М.: Успехи физических наук, 1957.
29. Кросс А., Введение в практическую инфракрасную спектроскопию. Пер. с англ. - М.: Иностранная литература, 1961.
30. Методы спектрального анализа / А.А. Бабушкин, П.А. Бажулин, Ф.А. Королев и др. - М.: Изд. Моск. универс., 1962.
31. Миронов В. А., Янковский С. А. Спектроскопия в органической химии. - М.: Химия, 1985.
32. Накамото К. Инфракрасные спектры неорганических и координационных соединений. - М.: Мир, 1966.
33. Булатов М.И., Калинкин И.П. Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа. Изд-е 42-е, перераб. и доп. - Л.: Химия, 1976.
34. Верховский В.Н., Смирнов А.Д. Техника химического эксперимента. Том 1, изд-е 7-е перераб., М.: Просвещение, 1979.

35. Верховский В.Н., Смирнов А.Д. Техника химического эксперимента том 2, изд-е 6-е перераб., М.: Просвещение, 1975.
36. Bulyarskii S.V., Kozhevin A.T., Mikov S.N., Prikhcxlko V.V. Anomalous R-line behaviour in nanocrystalline Al₂O₃:Cr³⁺ // Physica Status Solidi. A. 2000. V.180.
37. Арзамасцев А.П., Яскина Д.С. Ультрафиолетовые и инфракрасные спектры лекарственных веществ: Вып.1. — М.: Медицина, 1975.
38. Бабко А.К., Пилипенко А.Т. Фотометрический анализ. Общие сведения и аппаратура. М.: Химия - 1967.
39. Берштейн И.Я., Каминский Ю.Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии. - Л.: Химия, 1975.
40. Бранд Дж., Эглинтон Г. Применение спектроскопии в органической химии: Пер. с англ. - М.: Мир, 1967.
41. Харитонов Ю.Я. Аналитическая химия (аналитика). В 2 кн. - М.: Высш.шк., 2001.
42. Чулановский В.М. Введение в молекулярный спектральный анализ. - М.: ГИТЛ, 1951.
43. Кустанович, И.М. Спектральный анализ / И.М. Кустанович. -2-е изд. М.: Высшая школа, 1967.
44. Барковский, В.Ф. Физико-химические методы анализа / В.Ф. Барковский, С.М. Горелик, Т.Б. Городенцева. — М.: Высшая школа, 1972.
45. Сильверстейн, Р. Спектрометрическая идентификация органических соединений / Р. Сильверстейн, Г. Басслер, Т. Моррил. — М.: Мир, 1977.
46. G. T. Reedy, S. Bourne, P. T. Cunningham Gas chromatography/infrared matrix isolation spectrometry//Anal. Chem. 1979. 51(2).
47. Uden P.C. Selective detectors, environmental, industrial and biochemical applications. Ed. by R.E.Sievers, New York, Wiley , 1995.
48. Дементьева Н.Н., Завражная Т.А., Пахомов В.П., Самылина И.А. Разработка проекта общей фармакопейной статьи « Газовая хроматография » // Фармация . 2007. 5.

49. Ylipahkala T.M., Jalonen J.E. Isolation of very volatile compounds from the leaves of *Ledum palustre* using the purge & trap technique // Chromatographia. 2009. 34.
50. Tabanca N., Demirci B., Kirimer N., Baser KH., Bedir E., Khan IA., Wedge DE. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella aurea*, *Pimpinella corymbosa*, *Pimpinella peregrina* and *Pimpinella puberula* gathered from Eastern and Southern Turkey // J. Chromatogr. A. 2005. 1097. 1-2.
51. Сур.С.В. Газохроматографическое определение камфоры и 1,8-цинеола в растительном сырье и настоях шалфея (*Salvia officinalis* L.) // Хим.фарм.ж. 1991. 4.
52. Buchberger W.W. Detection techniques in ion analysis: what are our choices? // J. of Chromatogr. 2000. A884.
53. Высокоэффективная газовая хроматография: пер. с англ. М.А. Кожевника / К. Хайвер и др.. М.: Мир, 1993.
54. Царев, Н.И. Практическая газовая хроматография : учеб.-метод. пособие / Н.И. Царев, В.И. Царев, И.Б. Катраков. Барнаул: изд-во. Алт. унта, 2000.
55. Использование ВЭЖХ в анализе опиатов с применением косвенного СФМ-детектирования / Л.П. Букреева, П.Е. Кузнецов, А.В. Панфилов и др.. // Хим.-фарм. журн. 2000. - № 5.
56. Высокоэффективная жидкостная хроматография в контроле качества лекарственных средств / Д.В. Рейхарт и др.. // Фарматека. 2005. -№ 2.
57. Столяров Б.В. Практическая газовая и жидкостная хроматография / Б.В. Столяров [и др.].- Санкт-Петербург: Изд-во СпбГУ, 2002.
58. Высокоэффективная газовая хроматография / Под ред. К. Хайвера. - Пер. с англ. - М.: Мир, 1993.
59. Wortman A., De Giacomo F. Gaschromatographie. Praktikum physikalische und analytische Chemie. Sommersemester 2006 / A. Wortman, F. De Giacomo. -Zürich: Institut für Chemie und angewandte Bio Wissenschaften, 2006.

60. Холмберг К., Йёнссон Б., Кромберг Б., Линдман Б. Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2007.
61. McCormick T. The effect of stationary-phase pore size on retention behavior in micellar liquid chromatography / T. McCormick, J. Foley, C. Riley, D. Lloyd // Anal. Chem. 2000. V. 72. № 2.
62. Дейнека В.И. Метиленовая селективность в условиях обращенно-фазовой хроматографии одного ряда гомологов // Сорбционные и хроматографические процессы. 2007. Т. 7. № 2.
63. Ishizuka N., Kobayashi H., Minakuchi H., Nakanishi K., Hirao K., Hosoya K., Ikegami T., Tanaka N. Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high-performance liquid chromatography. // J Chromatogr. A. 2002. V. 960.
64. Svec F. Porous monolith: the newest generation of stationary phases for HPLC and related methods. // LC-GC Europe. 2003.
65. Leinweber F.C., Tallarek U. Chromatographic performance of monolithic and particulate stationary phases. Hydrodynamics and adsorption capacity. // J. Chromatogr. A. 2003. V. 1006.
66. HPLC. High Performance liquid chromatography. Macherey-Nagel. Catalog. 2005.
67. Glaze W.H. High-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization for simultaneous determination of organic peroxides and hydrogen peroxide / W.H. Glaze, K. Wang // J. of Chromatogr. A. 1998. - V. 822. - № 2.
68. Kirschbaum J. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fermented foods after derivatization with 3, 5 dinitrobenzoyl chloride / J. Kirschbaum, K. Rebscher, H. Bruckner // J. of Chromatogr. A. - 2000. - V. 881. - № 1-2.