

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова

На правах рукописи

Толкачева Анна Валентиновна

**ПОСТАДИЙНЫЙ КОНТРОЛЬ ПРОИЗВОДСТВА
И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА КЕМАНТАН**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научные руководители:

доктор фармацевтических наук, профессор

Прокофьева Вера Ивановна;

доктор фармацевтических наук

Грушевская Любовь Николаевна

Москва – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
Введение.....	8
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	15
1.1. Физико-химические свойства адамантана и его производных.....	15
1.2. Фармакологические свойства производных адамантана.....	18
1.3. Методы анализа производных адамантана	21
1.3.1. Химические методы анализа.....	21
1.3.1.1. Химические методы в качественном анализе производных адамантана.....	21
1.3.1.2. Химические методы в количественном анализе производных адамантана.....	23
1.3.2. Спектроскопические методы анализа производных адамантана.....	24
1.3.2.1. Абсорбционная спектроскопия в инфракрасной области спектра..	25
1.3.2.2. Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра.....	28
1.3.2.3. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса.....	30
1.3.3. Хроматографические методы анализа производных адамантана.....	30
1.3.3.1. Тонкослойная хроматография.....	31
1.3.3.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	33
1.3.3.3. Газожидкостная хроматография.....	36
1.3.3.4. Применение ГЖХ для определения содержания остаточных органических растворителей в лекарственных средствах.....	41
1.4. Кемантан. Общая характеристика.....	43
1.4.1. Фармакологические свойства кемантана. Применение в клинике....	43
1.4.2. Способы получения 5-гидроксиадамантан-2-она.....	45
1.4.3. Постадийный контроль производства субстанции кемантана.....	49

1.4.4. Контроль качества субстанции кемантана.....	57
1.4.5. Контроль качества таблеток кемантана.....	59
1.4.6. Заключение.....	59
ВЫВОДЫ ИЗ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ.....	61
ГЛАВА 2. Материалы и методы.....	62
ГЛАВА 3. Постадийный контроль производства субстанции кемантана...	69
3.1. Контроль качества исходного сырья.....	69
3.1.1. Анализ адамантан-2-она.....	70
3.1.2. Анализ концентрированных кислот.....	70
3.1.2.1. Анализ азотной кислоты (определение процентного содержания).	70
3.1.2.2. Анализ серной кислоты (определение процентного содержания)...	70
3.1.2.3. Анализ смеси азотной и серной кислот.....	71
3.2. Аналитический контроль на стадии получения кемантана.....	71
3.2.1. Анализ реакционной массы на конец реакции.....	71
3.2.2. Определение конца отгонки адамантанона из кислой водной массы	71
3.2.3. Определение полноты экстракции кемантана из «водного слоя».....	71
3.2.4. Анализ технического кемантана.....	72
3.2.4.1. Метод тонкослойной хроматографии.....	72
3.2.4.2. Нитриты / нитраты.....	73
3.3. Анализ субстанции кемантана после кристаллизации из четырёххлористого углерода.....	73
3.3.1. Внешний вид.....	74
3.3.2. Растворимость.....	74
3.3.3. Определение прозрачности и цветности растворов субстанции кемантана.....	76
3.3.4. Определение pH растворов субстанции кемантана	76
3.3.5. Спектральные характеристики субстанции кемантана.....	77
3.3.5.1. Спектроскопия в инфракрасной области.....	77
3.3.5.1.1. ИК-спектроскопия в средней области спектра.....	77
3.3.5.1.2. ИК-спектроскопия в ближней области спектра.....	79

3.3.5.2. Спектроскопия в УФ-области спектра.....	84
3.3.6. Посторонние примеси. Контроль чистоты субстанции кемантана.....	86
3.3.6.1. Определение посторонних примесей в технической субстанции кемантана методом ТСХ.....	86
3.3.6.2. Разработка и валидация методики количественного определения посторонних примесей в субстанции кемантана методом ГЖХ-ПВД.....	90
3.3.6.3. Разработка и валидация методики определения остаточных органических растворителей в субстанции кемантана.....	103
3.3.7. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции кемантана.....	118
3.4. Нормы качества технической субстанции кемантана.....	129
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3.....	131
ГЛАВА 4. Контроль качества и стандартизация фармацевтической субстанции кемантан.....	132
4.1. Фармакопейные показатели качества.....	132
4.1.1. Внешний вид.....	132
4.1.2. Растворимость.....	135
4.1.3. Подлинность.....	136
4.1.3.1. ИК-спектроскопия.....	136
4.1.3.2. УФ-спектроскопия.....	137
4.1.3.3. ЯМР ¹ H - спектроскопия.....	137
4.1.4. Определение цветности, прозрачности и степени мутности, рН растворов фармацевтической субстанции кемантана.....	138
4.1.5. Определение показателя «Температура плавления».....	139
4.1.6. Определение летучих веществ и воды.....	139
4.1.7. Определение посторонних примесей.....	141
4.1.8. Количественное определение содержания кемантана в фармацевтической субстанции.....	141
4.1.9. Установление норм качества стандартного образца субстанции	

кемантана.....	142
4.2. Изучение стабильности субстанции кемантана при хранении, установление сроков годности.....	144
4.3. Установление норм качества фармацевтической субстанции кемантана.....	147
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4.....	149
ГЛАВА 5. Разработка методик анализа и стандартизация твердой дозированной лекарственной формы - таблетки кемантана 100 мг.....	150
5.1. Основные фармакопейные показатели качества таблеток кемантана...	150
5.1.1. Внешний вид.....	150
5.1.2. Средняя масса таблеток.....	151
5.1.3. Определение распадаемости таблеток.....	151
5.1.4. Разработка методики определения посторонних примесей и идентификации кемантана в таблетках.....	152
5.1.5. Определение содержания действующего вещества в таблетках кемантана.....	155
5.1.6. Разработка теста «Растворение» для таблеток кемантана.....	169
5.1.7. Изучение стабильности таблеток кемантана 100 мг при хранении, установление срока годности.....	183
5.2. Установление норм качества таблеток кемантана.....	188
ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5.....	190
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	191
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	193
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	212
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	213
БЛАГОДАРНОСТИ.....	214

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия в ближней области спектра
- ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГЖХ – газожидкостная хроматография
- ГФ – Государственная фармакопея
- ГХ – газовый хроматограф
- ЖЖЭ – жидкостно-жидкостная экстракция
- ИЮПАК (IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry) -
Международный союз теоретической и прикладной химии
- КТТ – конечная точка титрования
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛФ – лекарственная форма
- ЛС – лекарственное средство
- МНПВО – метод нарушенного полного внутреннего отражения
- МС – масс-спектрометрия
- НФ – неподвижная фаза
- НФ ВЭЖХ – нормально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
- ООР – остаточные органические растворители
- ОТО – опытно-технологический отдел (в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени
В.В. Закусова»)
- ОФ ВЭЖХ – обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
- ПДК – предельно допустимая концентрация
- ПИД - пламенно-ионизационный детектор
- ПМР – протонный магнитный резонанс
- ПП – пробоподготовка
- ППХС - проверка пригодности хроматографической системы
- ПФ – подвижная фаза
- РСО - рабочий стандартный образец

СФМ – спектрофотометрия

ТСХ - тонкослойная хроматография (хроматография в тонком слое сорбента)

ТФЭ – твердофазная экстракция

УЗВ – ультразвуковая ванна

УФ – ультрафиолетовая область

УФ-СФМ – УФ-спектрофотометрия

ФС – фармацевтическая субстанция

ФСП - фармакопейная статья предприятия

ХОЗАНК – хроническое облитерирующее заболевание артерий нижних конечностей

ЦНС – центральная нервная система

ЧХУ – четыреххлористый углерод

ЭЗД – электронно-захватный детектор

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

BP (British Pharmacopoeia) - Британская Фармакопея

EP (European Pharmacopoeia) - Европейская Фармакопея

FDA (Food and Drug Administration) - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США)

GMP (Good Manufacturing Practice) – Надлежащая производственная практика

ICH (International Conference on Harmonisation) – Международная конференция по гармонизации

JP (Japan Pharmacopoeia) – Японская Фармакопея

NF (National formular) - Национальный Форумляр

PTFE - политетрафторэтилен или тефлон

RSD (relative standard deviation) - относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации)

Sil (Silicone) - Силикон

USP (The United States Pharmacopoeia) - Фармакопея США

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Работа по синтезу и изучению фармакологических свойств производных адамантана осуществляется в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» с 60-х годов прошлого века. В результате скрининга соединений ряда адамантана было выявлено вещество с иммуотропной активностью – 5-гидроксиадамантан-2-он (син.: 1-гидроксиадамантан-4-он), получившее название «кемантан».

Экспериментально установлено, что кемантан влияет как на клеточный, так и на гуморальный иммунитет: он активизирует выработку В-лимфоцитами иммуноглобулинов, стимулирует Т-клеточные иммунные реакции, а также миграцию стволовых клеток, способствует образованию интерлейкинов 1 и 2 [9].

Помимо иммуномодулирующей активности, препарат обладает противопаркинсоническим и стрессопротекторным действием. Он способен улучшать состояние ишемизированного мозга путем усиления кровотока.

Доказана эффективность кемантана в терапии заболеваний смешанной этиологии, ассоциированных нервно-психических и иммунных расстройств с сопутствующей вирусной и бактериальной патологией. В частности, прием кемантана рекомендуется при лечении заболеваний сосудистой системы конечностей аутоиммунного генеза, хроническом бронхите, бронхиальной астме, афтозном стоматите, герпесе и т.д. Своевременный прием кемантана способствует нормализации иммунологических показателей, более быстрому восстановлению физической и умственной работоспособности.

В связи с вышеизложенным актуальна разработка иммуностимулирующего препарата кемантан с последующим внедрением его в медицинскую практику.

Синтез кемантана проводится в несколько стадий, при этом в субстанции в виде примесей может присутствовать как исходный продукт синтеза, адамантан-2-он, так и промежуточные и побочные продукты реакции – производные адамантана. Присутствие данных примесей может негативно сказаться на

качестве получаемой субстанции, а в дальнейшем – на качестве лекарственного препарата. В связи с этим важной задачей является разработка методов идентификации и количественного определения различных технологических примесей на каждой из стадий синтеза лекарственного вещества.

Таким образом, помимо проведения фармакологических испытаний, для внедрения препарата в медицинскую практику требуется разработка комплекса методик для постадийного контроля производства, а также стандартизации субстанции и нового лекарственного препарата - таблеток кемантана 100 мг, создание соответствующей нормативной документации.

Степень разработанности темы исследования

Ранее в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова проводились исследования по разработке метода синтеза субстанции и созданию лекарственной формы кемантана. Для контроля качества субстанции и лекарственной формы были разработаны соответствующие методики: подлинность субстанции оценивали с помощью качественной реакции на кето-группу, идентификацию примесей проводили методом ТСХ, количественное определение – методом оксимирования, для постадийного контроля были разработаны методики ТСХ и газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на набивных колонках с низкой эффективностью разделения. Содержание остаточных органических растворителей (ООР) в субстанции не нормировалось. Для контроля качества таблеток применяли метод УФ-СФМ (количественное определение) [34] и качественную реакцию на кето-группу (идентификация), определение посторонних примесей в таблетках не проводилось.

Технологический процесс получения кемантана из адамантан-2-она впоследствии был усовершенствован, что потребовало дополнительных исследований с целью разработки комплекса методик контроля производства субстанции и качества готового продукта. Был предложен новый состав вспомогательных веществ таблеток. Все это привело к необходимости совершенствования методик анализа кемантана на промежуточных и конечных

этапах синтеза, а также методик контроля качества лекарственного препарата – таблетки кемантана 100 мг.

Цель и задачи настоящего исследования

Цель исследования: разработать комплекс методик для контроля производства, качества субстанции и таблеток кемантана, а также провести их стандартизацию в соответствии с современными требованиями.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

- 1) разработать комплекс методик постадийного контроля производства субстанции кемантана;
- 2) изучить физико-химические свойства, спектральные характеристики субстанции кемантана методами ИК-, УФ-, ЯМР-спектроскопии, а также хроматографические характеристики методом ГЖХ, разработать методики анализа субстанции;
- 3) определить фармакопейные показатели качества таблеток кемантана 100 мг и разработать методики их определения;
- 4) изучить стабильность субстанции и таблеток кемантана, определить условия хранения и сроки годности;
- 5) установить экспериментально обоснованные нормы качества субстанции и таблеток кемантана, оформить соответствующие проекты фармакопейных статей предприятия.

Научная новизна работы

Впервые проведен комплексный анализ физико-химических и спектральных характеристик фармацевтической субстанции кемантана.

Изучено хроматографическое поведение кемантана и его технологических примесей методом ГЖХ с пламенно-ионизационным детектором. Показана возможность разделения кемантана и других кислородсодержащих производных адамантана на среднеполярных и полярных неподвижных фазах. Предложены методики количественного определения примесей (адамантан-2-она, адамантан-2,6-диола) и действующего вещества в субстанции и таблетках кемантана 100 мг.

Установлены оптимальные параметры для парофазного способа пробоподготовки, а также подобраны хроматографические условия разделения для контроля ООР в субстанции кемантана.

Изучена стабильность субстанции и таблеток кемантана 100 мг при хранении методом «ускоренного старения». Экспериментально доказано, что как субстанция, так и таблетки кемантана 100 мг стабильны в течение срока, эквивалентного 2 годам хранения в естественных условиях.

Теоретическая значимость работы

В работе представлены подходы для обоснования методов стандартизации кислородсодержащих производных адамантана как потенциальных лекарственных средств на основе современных достижений фармакопейного анализа.

В целях обеспечения надлежащего качества фармацевтической субстанции показана необходимость определения содержания ООР при ее очистке.

Практическая значимость работы и внедрение в практику

Разработан новый комплекс методик постадийного контроля производства субстанции кемантана. Установлены научно обоснованные показатели и нормы качества субстанции и таблеток кемантана. Разработаны методики стандартизации субстанции и таблеток кемантана 100 мг.

По результатам исследований оформлены проекты ФСП на субстанцию и таблетки кемантана 100 мг.

Новые методики включены в лабораторный регламент на производство субстанции кемантана в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», в нормативную документацию на субстанцию и таблетки кемантана 100 мг, предназначенную для использования промышленными предприятиями (Акт внедрения от 12 февраля 2015г.).

Методология и методы исследования

В работе использованы методы фармакопейного анализа, представленные в зарубежных и отечественных источниках: в Европейской Фармакопее, Фармакопее США, Государственной Фармакопее СССР XI издания,

Государственной Фармакопее РФ XII издания. Также были учтены требования и рекомендации, представленные в руководствах ICH и GMP, руководствах под редакцией В.В. Береговых: «Валидация аналитических методик для производителей лекарств» и под ред. Н.В. Юргеля и др.: «Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств», в отраслевом стандарте 91500.05.001-00 "Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения", в инструкции «Временная инструкция по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода «ускоренного старения» при повышенной температуре» И 42-8-82. Статистическая обработка полученных результатов проведена в соответствии с требованиями ГФ XI изд., вып. 1, с.199 и с применением программы обсчета данных Microsoft Office Excel.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 5 в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Степень достоверности результатов

Для проведения экспериментальных работ использовано современное сертифицированное оборудование; проведена валидация аналитических методик; анализ полученных результатов с применением методов статистической обработки позволяет считать их достоверными.

Апробация работы

Основные результаты работы доложены и обсуждены на Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2012, 2014), на IV Всероссийском научно-практическом семинаре молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств» (Волгоград, 2012), на IV Съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012).

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выполнении экспериментальных

исследований, разработке и валидации методик, анализе и обобщении полученных результатов, проведении аналитической и статистической обработки результатов, написании публикаций и нормативных документов. Диссертация и автореферат написаны лично автором.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2 и 3 паспорта фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной темы кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (№ государственной регистрации 01201261653).

Основные положения, выносимые на защиту:

- обоснование выбора комплекса методик постадийного контроля производства субстанции кемантана;
- результаты изучения физико-химических, спектральных и хроматографических характеристик субстанции кемантана;
- комплекс испытаний для обеспечения надлежащего уровня качества субстанции и таблеток кемантана;
- результаты изучения стабильности субстанции и таблеток кемантана при хранении методом «ускоренного старения»;
- результаты исследований по установлению экспериментально обоснованных норм качества субстанции и таблеток кемантана.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 214 страницах машинописного текста, содержит 73

таблицы, 58 рисунков, приложения А, Б. Диссертационная работа состоит из содержания, списка используемых сокращений, введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», трех глав описания экспериментальных исследований, библиографии. Список цитированной литературы включает 153 источника, в том числе 50 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Физико-химические свойства адамантана и его производных

Последние 50-60 лет наблюдается рост числа исследований, связанных с полициклическими насыщенными углеводородами ряда адамантана. Такое внимание объясняется как широкими возможностями получения, так и большим спектром их практического применения.

Родоначальник всего ряда - трицикло[3.3.1.1]декан общей формулой $C_{10}H_{16}$ представлен 3 сконденсированными кольцами циклогексана в конформации «кресло» (Рисунок 1) [10, 112, 132]. Из трициклических углеводородов данное соединение наиболее устойчиво, что связано с тетраэдрической направленностью связей и фиксированным положением атомов углерода в молекуле [10, 44].

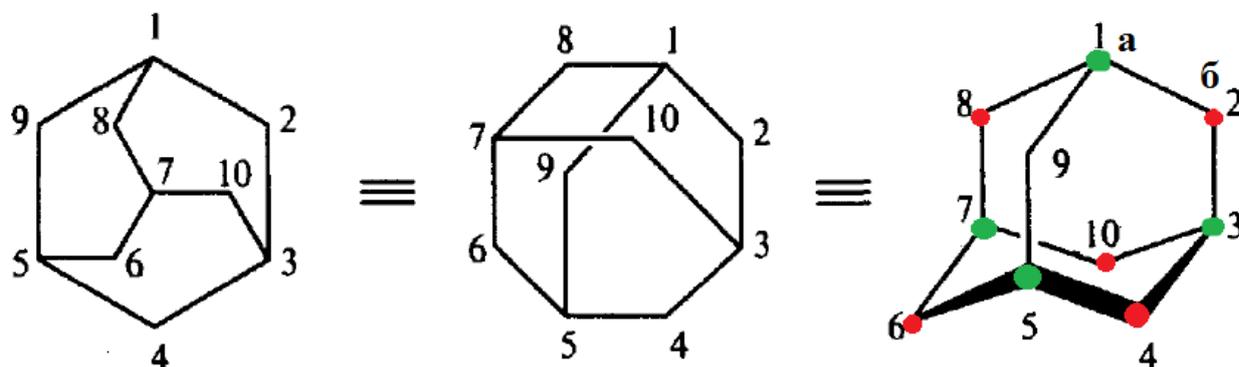


Рисунок 1 - Варианты графического изображения молекулы адамантана [12].

Номенклатура ИЮПАК рекомендует для трицикло[3.3.1.1]декана применять тривиальное название – «адамантан» [138], происходящее от греческого «adamas» (род. падеж «adamantos») – твердый металл, алмаз [10, 112]. Название отражает особенность структуры соединения: расположение атомов углерода в молекуле адамантана идентично их последовательности в кристаллической решетке алмаза (Рисунок 2) [10, 69, 112, 132].

Специфичность строения объясняет уникальность физико-химических свойств, проявляемых адамантаном и его производными. По внешнему виду адамантан представляет собой белое кристаллическое вещество с камфарным запахом [10]. Трехмерная модель адамантана представлена сферической

топологией с диаметром около 6,4 Å. Коэффициент распределения в бинарной системе н-октанол – вода ($\log P$) для адамантана составляет +5.2, что свидетельствует о высокой степени липофильности соединения [129].

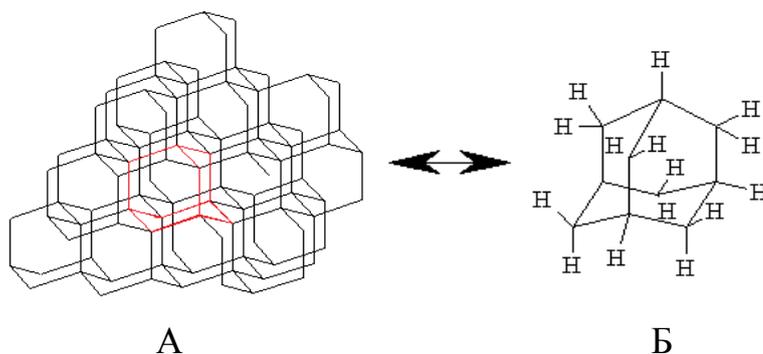


Рисунок 2 - Кристаллическая решетка алмаза (А) и адамантана (Б).

Являясь насыщенным углеводородом с относительно небольшой молекулярной массой - 136,23, адамантан отличается нехарактерно высокой температурой плавления (269°C в запаянном капилляре), обусловленной высокой степенью симметрии молекулы [10, 132]. Здесь можно провести аналогию с гексаметилентетрамином (уротропином): обладая схожей с адамантаном структурой, уротропин также имеет значительную температуру плавления – около 280°C [149].

Как видно из рисунка 1, в молекуле адамантана можно выделить два типа положения атомов: узловое (а) и мостиковое (б). В отсутствие заместителей все четыре третичных (узловых), а также все шесть вторичных (мостиковых) атомов углерода эквивалентны между собой. Молекула полностью симметрична.

Вследствие высокой степени симметрии молекулы, стереоизомерия наблюдается у производных адамантана, имеющих заместители в мостиковых положениях или одновременно четыре разных заместителя в узловых положениях, причем фактическое число пространственных изомеров меньше теоретически возможного количества [10].

Адамантан и его производные легко сублимируются. Адамантан подвергается возгонке даже при атмосферном давлении и частично уже при комнатной температуре. Это свойство объясняется наличием слабых межмолекулярных связей в молекулах соединений адамантанового ряда [10, 132].

Характерной особенностью, отличающей адамантан и его производные от других насыщенных углеводородов, является специфическое распределение электронной плотности в молекуле. Как известно, связь третичного атома углерода с водородом способна к заметной поляризации под действием сильных поляризующих агентов, как следствие – возникают частичные электрические заряды на атомах, образующих связь [44]. Явление поглощения электронной плотности адамантильным ядром за счет перекрывания «тыльных» сторон орбиталей узловых атомов углерода в литературе обозначается как «эффект клетки» или «каркасный эффект» (Рисунок 3) [10, 38, 44, 45, 99]. В результате данного явления снижается эффективный электрический заряд на атоме углерода, что приводит к еще большей поляризации связи С-Н. Это объясняет значительно большую реакционную способность узловых атомов углерода по сравнению с мостиковыми в адамантановом цикле: реакции гетеролитического замещения протекают преимущественно по третичным атомам углерода [44].

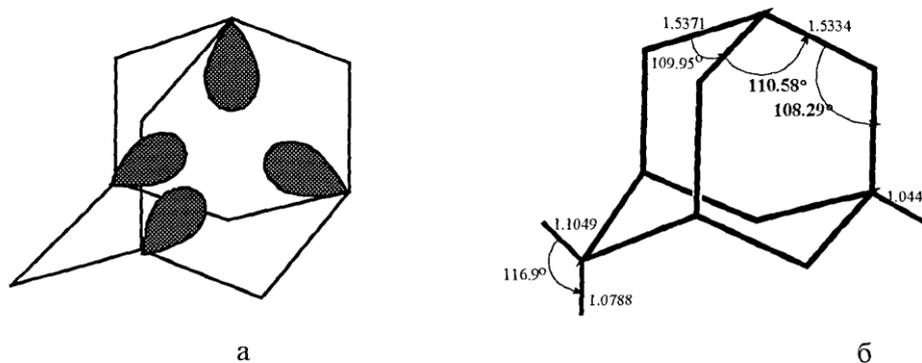


Рисунок 3 - Эффект клетки в молекуле адамантана и параметры его молекулярной структуры [44].

Мостиковые положения менее реакционноспособны, чем узловые, в связи с этим производные адамантана данного типа менее доступны. Одной из важнейших реакций получения лекарственных средств на основе адамантана является реакция его окисления концентрированными кислотами по мостиковому положению с образованием адамантан-2-она (Рисунок 4).

В дальнейшем проводят модификацию по карбонильной группе посредством взаимодействия с нуклеофильными агентами [141].

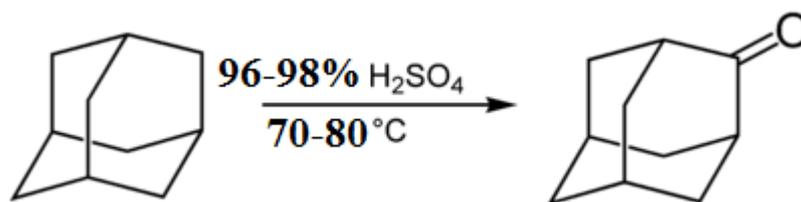


Рисунок 4 - Схема синтеза адамантан-2-она из адамантана.

Целый ряд работ посвящен изучению взаимосвязи между структурой каркасных соединений ряда адамантана и их физико-химическими свойствами, в том числе величинами хроматографического удерживания [10, 38, 39, 43-47, 91, 98, 99, 132].

Таким образом, молекула адамантана и его производных, вследствие уникального пространственного расположения и связи атомов в молекуле, обладает специфическими физико-химическими свойствами. Данные особенности находят отражение в проявляемой ими биологической активности.

1.2. Фармакологические свойства производных адамантана

Производные адамантана применяются в различных областях медицины как самостоятельные лекарственные средства, так и в качестве реактивов при проведении лабораторных исследований [55, 72].

По мнению специалистов, биологическая активность производных адамантана, обусловлена рядом факторов:

- прочностью, химической стабильностью молекулы адамантана;
- стерическими параметрами молекулы адамантана;
- липофильностью адамантанового фрагмента;
- абиогенностью происхождения [10, 55, 72, 129].

С начала 60-х годов XX века ведется активный синтез новых и модификация уже имеющихся соединений для получения фармакологически эффективных и безопасных препаратов – производных адамантана [111, 117]. В работе [129] представлен подробный, но не исчерпывающий, обзор патентной литературы, демонстрирующий широкий спектр применения производных адамантана. Основные фармакологические параметры и свойства производных

адамантана подробно рассмотрены также в ряде научных работ [15, 50, 54, 55, 72, 129].

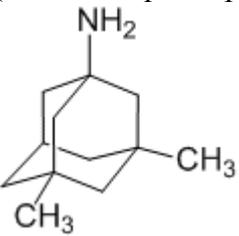
Применение адамантановой структуры в дизайне и модификации лекарственных препаратов идет по нескольким направлениям:

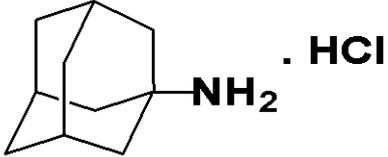
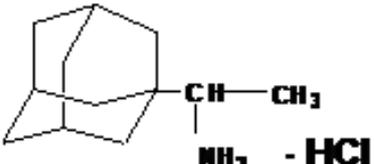
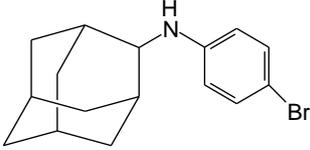
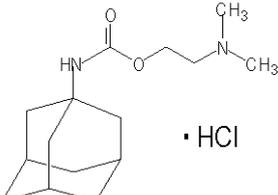
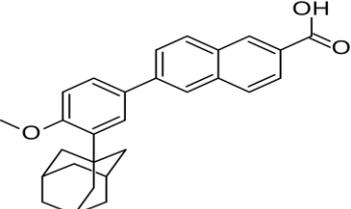
- 1) с целью изменения фармакокинетических параметров всасывания, распределения, метаболизма и экскреции лекарственных препаратов;
- 2) для связывания с гидрофобным участком в ферментах и действия в качестве ингибитора;
- 3) с целью воздействия на ионные каналы посредством нарушения трансмембранного переноса;
- 4) для обеспечения жесткой (устойчивой) структуры, которая образована 2, 3 или 4 группами [55, 69, 129].

В Таблице 1 приведен перечень зарегистрированных лекарственных препаратов - производных адамантана, применение которых разрешено на территории РФ.

Таблица 1

Зарегистрированные на территории РФ лекарственные препараты - производные адамантана [52, 151, 152, 153]

Название действующего вещества, химическая формула	Примеры торговых наименований	I - фармакологическая группа; II - фармакологическое действие
мемантин (Memantinum) 3,5-диметил-1-адамантанамин (в виде гидрохлорида)  *HCl	Акатинол Мемантин Алзейм Марукса Меманейрин Меманталь Мемантин Канон Мемантин-ТЛ Мемантина гидрохлорид Мемантинол Мемикар Меморель Нооджерон	I: -нейротропное средство; II: 1)нейропротективное, 2)антиспастическое, 3)противопаркинсоническое
амантадин (Amantadinum) трицикло [3.3.1,1 ^{3,7}] декан-1-амин (в виде глюкуронида, гидрохлорида или сульфата)	Мидантан Неомидантан ПК-Мерц	I: 1)дофаминомиметик 2)противовирусное (за исключением ВИЧ) 3)противопаркинсоническое средство

Название действующего вещества, химическая формула	Примеры торговых наименований	I - фармакологическая группа; II - фармакологическое действие
		II: - противопаркинсоническое, - противовирусное
римантадин (Rimantadine) α-метилтрицикло[3.3.1,1 ^{3,7}]декан-1-метанамин (в виде гидрохлорида) 	Орвирем Ремантадин Римантадин Римантадин Актитаб Римантадин-СТИ Римантадина гидрохлорид	I: противовирусные (за исключением ВИЧ) средства II: - противовирусное
адамантилбромфениламин (Adamanthylbromphenylaminum) N-(адамант-2-ил)-N-(п-бромфенил)-амин 	Адамантилфениламин Ладастен	I: α- и β-адреноблоктор / общетонизирующие средства и адаптогены II: применяется при астенических состояниях, положительно влияет на показатели физической и умственной работоспособности.
тромантадин (Tromantadinum) 2-[2-(диметиламино)этоксиг]-N-трицикло[3.3.1,1 ^{3,7}]-децил-1-ацетамид (в виде гидрохлорида) 	Виру-Мерц серол	I: противовирусные (за исключением ВИЧ) средства для местного применения II: - противовирусное, - противогерпетическое
адапален (Adapalenum) 6-(4-метокси-3-трицикло[3.3.1,1 ^{3,7}]-децил-1-илфенил)-2-нафталинкарбоновая кислота 	Адаклин Адапален Адолен Дифферин Клензит В составе многокомпонентных ЛП: Клензит-С Эффезел	I: дерматотропные средства II: - комедонолитическое, - противовоспалительное

Вышеперечисленные характеристики свидетельствуют о перспективности развития химии адамантанов в медицинском аспекте: продолжении исследований по поиску, разработке и направленному синтезу соединений с конкретной фармакологической активностью, обладающих минимальным побочным действием.

1.3. Методы анализа производных адамантана

Для создания качественного, эффективного и безопасного препарата необходимо иметь комплекс методов, гарантирующих безошибочность получаемых с их помощью результатов. С целью выбора наиболее оптимальных аналитических методов контроля качества кемамантана нами был проведен обзор литературы по методам и условиям проведения анализа производных адамантана.

1.3.1. Химические методы анализа

Химические реакции относятся к «классическим» методам анализа. Несмотря на тенденции в современной аналитической практике к инструментализации, химический метод не утратил своего значения. Химические реакции применяются как для качественного, так и для количественного анализа [4,22,31,33,58,68,95,101,105,109,110,147,148].

1.3.1.1. Химические методы в качественном анализе производных адамантана

Химические реакции на производные адамантана можно разделить на несколько типов. Первый тип, общегрупповые, проводится на адамантановый фрагмент; второй тип, специфические, - реакции на функциональные группы, а также реакции на анионы в случае, если соединение по структуре является солью.

К первому типу относятся реакции взаимодействия адамантанового фрагмента с концентрированными кислотами. В литературе описана общегрупповая реакция окисления производных адамантана под действием концентрированной серной кислоты при нагревании. Целый ряд соединений в

данной реакции образует окрашенные продукты, флуоресцирующие в УФ-свете. Обнаружено, что 5-гидроксиадамantan-2-он в данной реакции дает очень слабую зеленую флуоресценцию [95].

Кроме того, известна реакция взаимодействия ладастена с концентрированной серной кислотой в присутствии нескольких капель концентрированной азотной кислоты при комнатной температуре с образованием синего окрашивания [95].

Второй тип реакций, специфические, - на функциональные группы и анионы. С такими препаратами, как амантадина гидрохлорид, римантадина гидрохлорид, гимантан (в виде соли) для подтверждения наличия хлорид-ионов проводится фармакопейная реакция с серебра нитратом [22, 31, 33, 68, 95, 105, 109, 110, 147].

Присутствие сульфат-ионов в лекарственном средстве амантадина сульфат устанавливают реакцией с раствором бария хлорида по образованию белого осадка [68].

В Европейской фармакопее 8.0 издания и в Фармакопее Республики Беларусь, в отличие от остальных фармакопей, в частной статье подлинность амантадина гидрохлорида проверяется по реакции с натрия нитритом в солянокислой среде, в результате которой образуется белый осадок [22, 110].

В работах Каравановой Д. Е., Цветковой Е. А. приводится реакция на римантадин с нитропруссидом натрия в присутствии раствора натрия карбоната и ацетона (реакция на аминогруппу), результатом которой становится фиолетовая окраска раствора [33, 95].

Для аминадамантанов также характерна реакция взаимодействия с кислотными индикаторами. В работе [95] на примере гимантана было показано, что за счет третичного атома азота аминадамантаны реагируют с кислотными индикаторами с образованием окрашенных ионных ассоциатов, извлекаемых в органический растворитель.

1.3.1.2. Химические методы в количественном анализе производных адамантана

В основном, в зарубежных фармакопеях и фармакопеях стран СНГ в качестве химического метода количественного определения производных адамантана предлагается кислотно-основное титрование в неводной среде [22, 105, 109, 110, 147]. Данный способ актуален в случае анализа слабых кислот, слабых оснований, либо солей органических оснований, титриметрическое определение которых в воде затруднено либо невозможно ввиду слабых кислотно-основных свойств. Конечная точка титрования (КТТ) при этом определяется индикаторным или потенциометрическим способом [2, 22, 27, 34, 105, 109, 110, 147].

Амантадина гидрохлорид – соль слабого основания и сильной кислоты. Для усиления основных свойств титрование проводится в среде протогенного (муравьиная, ледяная уксусная кислота) или амфипротного (одно- и многоосновные спирты) растворителей. Добавление уксусного ангидрида существенно улучшают условия титрования в среде ледяной уксусной кислоты за счет увеличения кислотности и диэлектрической проницаемости среды [2, 27]. Кроме того, уксусный ангидрид и ртути (II) ацетат применяют для связывания галогенид-ионов в случае титрования солей [2, 22, 27, 105, 109, 110, 147, 148].

В частной статье на субстанцию амантадина гидрохлорида в Европейской, Британской, Белорусской фармакопеях количественное определение проводится в смеси из 0,01 М хлористоводородной кислоты и 96 % спирта (1:10). Титрант - 0,1 М раствор натрия гидроксида. КТТ определяют потенциометрически. Методика определения амантадина гидрохлорида по Японской фармакопее несколько отличается от приведенной выше: предварительно высушенную субстанцию растворяют в 2 мл муравьиной кислоты, добавляют точно 15 мл 0,1 моль/л хлорной кислоты, нагревают на водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения прибавляют уксусную кислоту до 70 мл и титруют избыток хлорной кислоты 0,1 моль/л натрия ацетатом. Проводят контрольный опыт. КТТ определяют потенциометрически [22, 105, 109, 146].

Согласно рекомендациям Фармакопеи США субстанцию амантадина гидрохлорида титруют 0,1 н хлорной кислотой в среде ледяной уксусной кислоты и в присутствии ртути ацетата. Проводят контрольный опыт. КТТ определяют потенциометрически [147, 148].

В работе [33] в качестве количественного определения субстанции ладастена (N-(адамантил)-N-(п-бромфенил)-амин) указано неводное титрование в среде ледяной уксусной кислоты. Титрант – 0,1 М раствор кислоты хлорной. КТТ фиксируют потенциометрически или по переходу окраски индикатора (кристаллический фиолетовый). Параллельно проводят контрольный опыт [31, 33].

В работе [95] на субстанцию и таблетки гимантана в качестве количественного метода определения было предложено титрование 0,1 М раствором хлорной кислоты в среде муравьиной кислоты в присутствии уксусного ангидрида. КТТ фиксировали потенциометрически или по изменению окраски индикатора, кристаллического фиолетового, от зеленой до желтой [68, 95].

Другим методом титрования, допустимым для анализа производных адамантанов – солей галогеноводородных кислот, выступает аргентометрическое титрование по Фольгарду. В частности, данный метод используется в тесте «Растворение» для таблеток ремантадина дозировкой 0,05 г [95].

1.3.2. Спектроскопические методы анализа производных адамантана

В связи с расширением ассортимента лекарственных препаратов, появлением огромного количества дженериков на фармацевтическом рынке, а также учащением случаев выявления фальсифицированной и недоброкачественной продукции и, как следствие, ужесточением требований к качеству лекарственных субстанций и готовых лекарственных форм, наиболее актуальной задачей является внедрение в практику экспресс-методов контроля качества продукции [4]. В данном аспекте стоит выделить группу спектроскопических методов исследования. К основным методам спектроскопии,

наиболее часто упоминаемым в литературе для анализа производных адамантана, относятся: ЯМР-, ИК-, БИК- спектроскопия, СФМ в УФ- и видимой областях спектра [10,22,31,33,34,44,68,95,100,105,109,110,128,131,143,144,147]. В основе всех перечисленных методов лежит взаимодействие анализируемого вещества и электромагнитной энергии [13, 58, 96].

1.3.2.1. Абсорбционная спектроскопия в инфракрасной области спектра

ИК-спектроскопия - фармакопейный метод анализа, в котором установлены четкие эмпирические закономерности, связывающие параметры спектра со структурой вещества. В фармацевтическом анализе выделяют следующие области исследования ИК-спектра: ближнюю - от 780 до 2500 нм (от 0,78 до 2,5 мкм), среднюю - от 2,5 до 25 мкм (от 4000 до 400 см⁻¹) и дальнюю - от 25 до 400 мкм [21, 30].

Во многих фармакопеях мира отмечается тенденция применения ИК-спектроскопии в средней области в качестве экспресс-метода установления подлинности субстанции и лекарственных препаратов на их основе. Это обусловлено высокой специфичностью и информативностью получаемых спектров [6, 21, 22, 105, 109, 110, 147].

В классическом варианте подготовку твердофазной пробы проводят путем прессования дисков с инертным наполнителем - калия бромидом (реже калия хлоридом), либо путем приготовления суспензии с индифферентными жидкостями (вазелиновым маслом и др.) [21].

Применение специальных приставок для снятия ИК-спектра по методу нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО) не требует существенной подготовки образца, что значительно упрощает проведение исследования [6, 21].

В целях облегчения процесса идентификации веществ созданы целые библиотеки данных по ИК-спектрам [3, 144], а в ведущих фармакопеях в приложениях приводятся ИК-спектры стандартных образцов [21,105,109,110,147].

В молекуле адамантана, в связи с высокой степенью симметрии, активны лишь трижды вырожденные колебания [10].

В Таблице 2 представлены основные полосы поглощения в ИК-спектре адамантана, снятого в таблетках KBr [10, 95].

Таблица 2

Полосы поглощения в ИК-спектре адамантана [10, 95]

Частота колебания см ⁻¹	Форма колебания
444	деформационные (ССС)
638	деформационные (ССС)
798	валентные (С-С)
970	- внеплоскостные деформационные колебания СН ₂ группы; - валентные (С-С); -деформационные (НСС)
1103	деформационные (НСС)
1312	- валентные (С-С); - внеплоскостные деформационные колебания СН ₂ группы
1356	- деформационные (НСС) (симметричные); - внеплоскостные деформационные колебания СН ₂ группы
1458	деформационные (НСН) (асимметричные)
2850	валентные (С-Н) в СН ₂ группах (симметричные)
2910	валентные (С-Н) в СН ₂ группах (асимметричные)
2930	валентные (С-Н) в СН ₂ группах (асимметричные)

Введение заместителей в адамантановый цикл приводит к нарушению симметрии. Как следствие - происходит изменение ряда колебаний, появляются новые полосы, обусловленные структурой заместителя [10].

В фармакопейном анализе ИК-спектроскопия в средней области введена в раздел «идентификация» на субстанции и лекарственные формы амантадина гидрохлорида, римантадина и адапалена [22, 105, 109, 110, 147]. Также имеются данные о применении данного метода в контроле качества субстанций и соответствующих лекарственных форм ладастена, гимантана, мемантина [31, 33, 68, 95, 130].

Относительно недавно в фармацевтической практике стал применяться метод спектроскопии в ближней ИК-области. БИК-спектрометрия - это инструментальный метод количественного и качественного анализа, сочетающий спектроскопию и статистические подходы при исследовании многофакторных зависимостей [11, 13, 30, 32, 77, 96]. Перспективность использования данного

метода обусловлена рядом преимуществ БИК-спектроскопии в сравнении с другими аналитическими методами.

Основные преимущества БИК-спектроскопии [6, 11, 13, 30, 58, 96]: простая и быстрая пробоподготовка, отсутствие химической пробоподготовки, возможность одновременно определять сразу несколько компонентов, а благодаря применению хемометрических методов - проводить контроль большого количества образцов; зачастую не требуется нарушение первичной упаковки; в отличие от других «спектральных» методов можно оценить «неспектральные» параметры образцов, такие как: размер гранул, pH, содержание воды и остаточных растворителей, содержание NaCl и т.д. [96].

В БИК-спектрометрии применяются специальные программы, осуществляющие классификационную и/или количественную обработку спектров. Классификационные методы позволяют определить особенности спектра образца. Как правило, их используют в целях контроля подлинности, чистоты или для предварительного анализа образцов перед проведением количественного анализа. С помощью данных методов можно идентифицировать неизвестное вещество или определить степень его очистки. К применяемым классификационным методам относятся: Similarity Match, Distance Match, Discriminant Analysis, QC Compare и т.д.

С помощью количественных методов можно оценить содержание одного или нескольких компонентов в смеси. К ним относятся: Classical Least Squares (CLS), Stepwise Multiple Linear Regression (SMLR), Partial Least Squares (PLS), Principal Component Regression (PCR) и т.д. [56]

Необходимо отметить, что перед применением БИК-спектрометрии в рамках анализа производственных процессов для получения надежных результатов рекомендуется создание библиотеки спектров подлежащих контролю продуктов [13].

В литературе имеются данные о возможности применения БИК-спектрометрии в контроле качества порошка и таблеток, содержащих одновременно амантадина гидрохлорид и парацетамол [108], а также в анализе

подлинности субстанции римантадина гидрохлорида, установления производителей субстанции и таблеток римантадина [79].

1.3.2.2. Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра

Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра широко используется в фармацевтическом анализе. Метод представлен в ведущих фармакопеях мира, в том числе и в ГФ XII изд. ч. 1 [21, 22, 105, 109, 110, 147]. Основные направления практического применения метода: идентификация органических соединений, изучение пространственного строения, изучение кинетики и контроль за ходом реакций, количественный анализ, исследование равновесий в растворе [7, 13, 58, 96, 145].

Как известно, избирательное поглощение в УФ- и видимой областях спектра обусловлено присутствием групп-хромофоров (кратных связей, ароматических фрагментов и т.д.). Также на положение полос поглощения влияет наличие p, π -сопряжения хромофоров с электронодонорными (ауксохромами) и электроноакцепторными (антиауксохромами) группировками [7, 58].

Адамантан, ввиду отсутствия в его структуре хромофоров, не поглощает электромагнитное излучение в УФ- и видимой областях спектра [31, 33, 68]. Следовательно, поглощение производных адамантана происходит за счет заместителей.

Согласно данным ведущих зарубежных фармакопей мира, метод УФ-спектрофотометрии не применяется в анализе субстанций и лекарственных форм производных адамантана [22, 105, 109, 110, 147]. Из-за более низкой специфичности данный метод уступает в качественном анализе методам ИК- и ЯМР-спектроскопии.

Тем не менее, метод СФМ, как наиболее простой и доступный экспресс-метод, предложен для идентификации субстанции и таблеток ладастена, а также для проведения теста «Растворение» в контроле таблеток ладастена [31, 33].

Отдельным пунктом можно выделить экстракционную спектрофотометрию. Как уже рассматривалось ранее, некоторые производные адамантана, в частности аминадамантаны, способны образовывать ионные ассоциаты с кислотными индикаторами, которые далее экстрагируют в органическую фазу. В работе [95] была рассмотрена возможность применения экстракционно-фотометрического метода в количественном анализе таблеток гимантана. Определение проводили по реакции взаимодействия гимантана с индикатором (бромкрезоловый пурпуровый) в уксуснокислой среде ($\text{pH}=2,6$) с образованием окрашенного комплекса и дальнейшей экстракцией комплекса в хлороформ [95]. Другим примером применения экстракционной СФМ служит исследование, проведенное Agnieszka Sobczak и коллегами [143] на субстанциях и готовых лекарственных формах амантадина гидрохлорида, римантадина гидрохлорида и мемантина гидрохлорида. Данные соединения, являясь по химической структуре трициклическими аминами, вступали в реакцию взаимодействия с реактивом бромфеноловый синий в ацетатном буфере (0,1 М) pH 3,5 с образованием оранжевых ассоциатов, которые далее извлекали в дихлорметан ($\lambda_{\text{max}}=408$ нм).

Еще один вариант определения производных адамантана методом СФМ – получение окрашенных дериватов, поглощающих в видимой области спектра. В статье Karim Michail и др. [133] описано несколько способов дериватизации и СФМ количественного определения содержания мемантина в субстанции и лекарственной форме. Первый способ основан на проведении реакции с 4-хлор-7-нитро-2,1,3-бензоксадиазолом в щелочном буферном растворе ($\lambda_{\text{max}}=476$ нм). Другой способ – на реакции дериватизации с о-фталальдегид-N-ацетил-L-цистеином ($\lambda_{\text{max}} = 340$ нм).

В ряде работ [128, 131] описывается способ СФМ-определения амантадина в капсулах и плазме, а также мемантина в субстанции и таблетках посредством проведения реакции дериватизации - конденсации с реактивом 1,2-нафтохинон-4-сульфонатом в щелочной среде. В результате данной реакции образуются оранжево-окрашенные продукты ($\lambda_{\text{max}}=460$ нм). Как показано в работе V. Jagathi и др. [128], при восстановлении реактива Фолина-Чокальтеу мемантином

происходит образование продуктов восстановления (оксидов) интенсивно синего цвета ($\lambda_{\text{max}}=760$ нм).

В работе Hany A. Omara [139] представлена методика СФМ-микроопределения амантадина гидрохлорида в субстанции и в лекарственных формах по окислительно-восстановительной реакции образования окрашенного ферроинового комплекса с железа (III)-о-фенантролином в ацетатном буфере.

1.3.2.3. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса, или сокращенно ЯМР, – физический метод анализа. Метод представлен в ведущих фармакопеях мира, в том числе и в ГФ XI изд., вып. 1 [24, 105, 109, 110, 146 - 148].

ЯМР занимает одно из лидирующих положений среди методов установления точной структуры веществ, поскольку получаемый спектр является характеристическим для каждого вещества и служит его однозначным идентификатором [7, 13, 58]. Помимо структурного анализа, метод находит применение в количественном определении лекарственных веществ, определении оптической чистоты и примесей, в том числе в анализе содержания ООР [107, 121, 126]. Наиболее часто в анализе фармацевтической продукции используют ЯМР¹H-спектроскопию (ПМР-спектроскопию) и ЯМР¹³C-спектроскопию.

ПМР-спектр адамантана представлен двумя слабо разрешенными сигналами, соответствующим узловым и мостиковым протонам ядра [10].

В литературных источниках описано использование ЯМР¹H-спектроскопии в анализе гимантана, ладастена, римантадина и мемантина [33, 95, 104, 130].

1.3.3. Хроматографические методы анализа производных адамантана

Хроматографические методы анализа занимают одно из лидирующих положений в стандартизации и контроле качества фармацевтических препаратов [65]. В данном разделе мы рассмотрим основные фармакопейные методы хроматографии (ТСХ, ВЭЖХ, ГЖХ), на долю которых приходится большая часть разрабатываемых методик анализа производных адамантана.

1.3.3.1. Тонкослойная хроматография

Хроматографический метод разделения смесей в тонком слое сорбента, нанесенного на инертный носитель, в результате переноса веществ подвижной фазой, представленной системой органических растворителей, носит название тонкослойной (планарной) хроматографии, сокращенно ТСХ [14, 24, 58]. Метод описан во всех ведущих фармакопеях мира, в том числе в ГФ XI изд. вып.1. [24, 105, 109, 110, 146 - 148].

Планарную хроматографию от других методов хроматографии отличает ряд достоинств: возможность проведения полного анализа смеси, использование простого и относительно дешевого оборудования, высокая селективность, а также возможность ее коррекции посредством подбора состава подвижной фазы и/или способа детектирования, в отличие от ВЭЖХ нет ограничений в выборе растворителей, относительная быстрота и простота манипуляций при выполнении соответствующих методик.

Среди недостатков метода в качестве основных можно выделить: более низкую, в сравнении с ГЖХ и ВЭЖХ, чувствительность, ограничения по использованию метода в анализе высоколетучих, нестабильных (чувствительных к действию кислорода воздуха или света) соединений, значительное влияние параметров окружающей среды на результаты анализа (температуры, относительной влажности воздуха, наличия загрязняющих веществ в воздухе и т.д.) [14, 24, 58].

Обзор литературы по данному методу показал, что основными направлениями применения ТСХ в контроле качества производных адамантана являются: контроль подлинности и оценка содержания посторонних примесей, контроль протекания реакций синтеза [31, 33, 68, 95, 101]. В качестве фармакопейного метод ТСХ рекомендован в Фармакопее США для определения примесей в субстанции и для идентификации таблеток римантадина [148]. Реже метод ТСХ применяется в количественном анализе производных адамантана, поскольку для этих целей требуется специальное оборудование [102]. Примеры условий проведения испытаний приведены в Таблице 3.

**Основные параметры методик проведения ТСХ в анализе производных
адамантиана**

Препарат (форма)/ цели применения метода	Условия проведения ТСХ	Ссылки
<p>Гимантан: -субстанция, - таблетки, - раствор для инъекций;</p> <p>для определения посторонних примесей в субстанции и таблетках; подлинность и посторонние примеси в растворе для инъекций</p>	<p>ПП: растворитель – хлороформ; НФ: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merk), 12x12см; ПФ: 1,4-диоксан – метанол – аммиака раствор концентрированный (4 : 40 : 1); Детектирование: 1) пары йода (для анализа субстанции, таблеток, раствора для инъекций), 2) раствор 2,4-динитрофениламин (для контроля примеси адамантиан-2-она в субстанции)</p>	<p>-субстанция и таблетки [95];</p> <p>-раствор для инъекций [68]</p>
<p>Ладастен: -субстанция;</p> <p>для определения посторонних примесей в субстанции</p>	<p>ПП: растворитель – ацетон; НФ: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merk), 10x15см; ПФ: гексан – ацетон (6:1); Детектирование: 1) УФ-свет (254 нм), 2) камера с парами окислов азота, затем, после высушивания, опрыскивают 0,5% раствором β-нафтола в 95% спирте, высушивают при 100 – 105°С</p>	<p>[33]</p>
<p>Римантадин: -субстанция римантадина гидрохлорида; -таблетки;</p> <p>для определения посторонних примесей в субстанции и таблетках</p>	<p>ПП: растворитель - спирт этиловый; НФ: пластинки «Силуфол»; ПФ: хлороформ – эфир (25:5), Детектирование: 0,5% спиртовым раствором нингидрина.</p> <p>Методика ТСХ по Фармакопее США (после выделения основания римантадина): ПП: растворитель – хлороформ; НФ: силикагель; ПФ: этилацетат – метанол - гидроксид аммония (80:10:4); Детектирование: первоначально - пары хлора (1,5% раствора калия перманганата и хлористоводородной кислоты разведенной (1:1)) в течение 90 мин. После высушивания - раствор о-толуидина в ледяной уксусной кислоте с добавлением калия йодида.</p>	<p>[95, 148]</p>
<p>Мидантан (син.: амантадин): -субстанция;</p>	<p>НФ: пластинки «Силуфол»; ПФ: спирт изопропиловый - 25% раствор аммиака (14:4); Детектирование: пары йода</p>	<p>[95]</p>

Препарат (форма)/ цели применения метода	Условия проведения ТСХ	Ссылки
для определения посторонних примесей в субстанции	Альтернативная методика: НФ: силикагель; ПФ: изопропанол - гидроксид аммония (7:2); Детектирование: пары йода.	
Амантадин: - капсулы; количественное определение амантадина в субстанции и капсулах	ПП: растворитель – метанол; НФ: Silicagel 60 F ₂₅₄ ; ПФ: н-гексан – ацетон – диэтиламин (80:40:5; v:v:v); Детектирование: денситометрия с применением планшетного сканнера и программного обеспечения	[102]

1.3.3.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ – инструментальный метод анализа, посредством которого происходит разделение смеси веществ, переносимых под давлением с помощью подвижной фазы (жидкости) по колонке, заполненной неподвижной фазой – сорбентом [14, 24, 58, 74, 76, 92]. ВЭЖХ, наряду с ГЖХ, занимает лидирующие позиции как высокоточный метод качественного и количественного анализа фармацевтической продукции. Согласно данным наукометрического анализа, проведенного Рудаковой и коллегами, доля методик с применением ВЭЖХ в Фармакопее РФ XII изд. составляет 51,9%, ГЖХ - 1,3%, ТСХ – 46,8% [65]. Основным преимуществом применения ВЭЖХ по сравнению с ГЖХ является возможность анализировать термолабильные и нелетучие соединения. Единственным принципиальным условием проведения ВЭЖХ является растворимость образца в каком-либо растворителе [76, 92, 134].

Общие фармакопейные статьи по ВЭЖХ представлены во всех ведущих фармакопеех мира, в том числе и в ГФ XI изд., вып. 1 [24, 105, 109, 110, 146 - 148]. В фармакопейном анализе производных адамантана метод ВЭЖХ фигурирует только в анализе субстанции адапалена. Несмотря на это, в литературе описаны многочисленные методики качественного и количественного определения лекарственных средств, имеющих в структуре адамантановый фрагмент, с применением различных вариантов ВЭЖХ: обращенно-фазовой,

нормально-фазовой и адсорбционной ВЭЖХ на углеродных адсорбентах [31, 47 – 49, 63, 97, 113, 136, 137, 150].

В ряде обзоров и статей рассматриваются основные закономерности «структура – хроматографическое удерживание» отдельных производных адамантана [39, 40, 47, 63, 100]. В работах Яшкина С. Н., Курбатовой С. В. и Шумской Н. Ю. [47, 97, 100] было показано, что в условиях ОФ ВЭЖХ удерживание производных адамантана происходит благодаря дисперсионному взаимодействию объемного гидрофобного адамантанового каркаса с неполярной фазой. При этом различие в величинах характеристик удерживания будет обуславливаться числом, расположением и природой заместителя в ядре адамантана, а также природой элюента. Экспериментально доказано, что увеличение числа полярных групп приводит к уменьшению удерживания. В вышеупомянутых работах показано, что в соответствии с сольвофобной теорией Хорвата, наблюдается симбатность в изменении липофильности, поляризуемости и хроматографического удерживания производных адамантана.

В случае НФ ВЭЖХ в работе Яшкина С.Н. [100] сделано предположение о влиянии на параметры удерживания производных адамантан на полярных фазах электронного фактора, связанного с реализацией «эффекта клетки». Также как и в случае ОФ ВЭЖХ, в НФ ВЭЖХ отмечается роль в параметрах удерживания числа и природы заместителей в адамантановом фрагменте.

Обзор литературы показал, что основными направлениями применения ВЭЖХ в контроле качества производных адамантана являются: качественный и количественный анализ субстанций и лекарственных форм на основе производных адамантана, а также проведение фармакокинетических исследований [48, 49, 113, 150]. Примеры условий проведения испытаний приведены в Таблице 4.

Таблица 4

Основные параметры методик проведения ВЭЖХ в анализе производных адамантана

Препарат (форма) / цели применения метода	Условия ВЭЖХ	Ссылки
---	--------------	--------

Препарат (форма) / цели применения метода	Условия ВЭЖХ	Ссылки
Ладастен (таблетки 50мг)/ -однородность дозирования, -количественное определение, -тест «Растворение»	НФ: колонка - Ultra C ₁₈ 5 мкм, 250 мм x 4,6 мм, предколонка Ultra C ₁₈ 5 мкм, 30 мм x 4,6 мм либо аналогичная; ПФ: ацетонитрил – метанол – вода очищенная, доведенная до pH 2,50 ± 0,05 фосфорной кислотой (7:2:2); Детектор: УФ-СФМ, 245 нм	[31]
Амантадина гидрохлорид/ -определение амантадина в плазме крови	ПП: ЖЖЭ, дериватизация с помощью реактива - 3,4-дигидро-6,7-диметокси-4-метил-3-оксо-хиноксалин-2-карбонил хлорида НФ: ОФ-колонка (УМС-Pack C8) ПФ: метанол–ацетонитрил-вода (35:35:30, v/v) Детектор: флуоресцентный	[113]
Римантадин/ -количественное определение в моче	ПП: постколоночная дериватизация, ТФЭ ПФ: метанол - фосфатный буфер (25 ммоль/л, pH = 3.0) в объемном соотношении- 50:50. НФ: ОФ-монолитная неподвижная фаза (100×4,6мм) Детектор: СФМ $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 340/455$ нм постколоночная дериватизация: реактив - о-фталальдегид (20 ммоль/л) и N-ацетил-цистеин (5 ммоль/л) в щелочной среде (100 ммоль/л боратный буфер pH = 11.0)	[150]
Адапален субстанция / -определение посторонних примесей, - количественное определение	I) ПП: растворитель – смесь органических растворителей: тетрагидрофуран R, ацетронитрил R, вода R (20:37:43 V/V/V). НФ: эндкэпированная фенилсилилсиликагельная для хроматографии R (5 мкм) с углеродной загрузкой - 7.5%; ПФ А: ледяная уксусная кислота R, вода R (0,1:100 V/V); ПФ В: тетрагидрофуран R, ацетронитрил R (35:65 V/V); Детектор: СФМ при 270 нм. II) ПП: растворитель – смесь органических растворителей (см. ПФ) НФ: 4.6 мм × 25 см; 5 мкм сорбент L1 (по классификации USP) ПФ: ацетронитрил, тетрагидрофуран, трифторуксусная кислота, вода (21: 16: 0.01: 13) Детектор: УФ при 235 нм (количественное определение), (для определения органических примесей методика в USP аналогична EP 8.0)	I) - [147] II) - [148]
Адапален (гель) / -качественный и количественный анализ адапалена в ЛФ	ПП: растворитель – смесь ацетонитрила - тетрагидрофурана (60:40) НФ: Кромасил C18 (100x4,6мм) 5 мкм ПФ: буферный раствор и смесь органических растворителей (ацетонитрил : тетрагидрофуран- 30:40) в соотношении – 30: 70 (pH-2,5). Детектирование: СФМ 272 нм	[136]

Препарат (форма) / цели применения метода	Условия ВЭЖХ	Ссылки
Гимантан/ -фармакокинетические исследования (количественное определение гимантана в биологических образцах)	НФ: «Zorbax 300SB» («Agilent», США) C18 – 150×2,1 мм, диаметр частиц - 5 мкм. ПФ: растворы А и В - соотношение 1:1. Раствор А: 0,1 М раствор аммония ацетата и концентрированная муравьиная кислота, разведенные в воде; раствор В: 0,1М раствор аммония ацетата и концентрированная муравьиная кислота, разведенные в ацетонитриле. Детектор: масс-спектрометрический	[48, 49]
Мемантина гидрохлорид (субстанция)/ -количественное определение	ПП: дериватизация реактивом 0,015М 9-фторенилметил хлороформат и 0,5 М боратный буферный раствор; НФ: Кромасил C18 (150x 4,6мм) 5мкм; ПФ: 80% ацетонитрил и 20% фосфатный буферный раствор. Детектирование: фотодиодный матричный детектор	[137]

1.3.3.3. Газожидкостная хроматография

В основе метода газожидкостной хроматографии лежит принцип разделения летучих соединений посредством распределения веществ между двумя фазами: подвижной - инертным газом или паром и неподвижной – высокомолекулярной жидкостью, закрепленной на пористый носитель либо на стенки капиллярной трубки [14, 24, 58, 60, 94, 135].

К основным достоинствам метода ГЖХ можно отнести: высокую разделительную способность газохроматографических колонок, благодаря которой за приемлемое время можно разделить и проанализировать сложные многокомпонентные смеси, универсальность метода: анализ веществ любого агрегатного состояния (газы, летучие жидкости и твердые вещества с температурой кипения до 600°C и выше), низкий предел обнаружения, надежность аппаратного оформления, малую погрешность анализа, малый размер анализируемой пробы, возможность автоматизации анализа, экспрессность анализа [58, 60, 94, 98, 135].

Как и у любого другого аналитического метода у ГЖХ есть и слабые стороны. К основным недостаткам ГЖХ можно отнести:

- прерывистость анализа [98];
- ограничения по анализу ряда соединений (термолабильных, нелетучих и т.д.) [58, 94, 98, 135].

Высокая летучесть и термостабильность производных адамантана стали основными предпосылками активного внедрения метода ГЖХ в анализ данных соединений. ГЖХ используется в решении широкого круга задач: для идентификации соединений [68], для контроля посторонних примесей, для количественного анализа [68,130,142], в том числе для проведения теста «Растворение», для оценки содержания ООР [95,126], для контроля концентрации в биожидкостях при проведении фармакокинетических исследований [15,48,49,59,121], в рамках постадийного контроля синтеза [95] и т.д.

Примеры условий проведения испытаний лекарственных средств - производных адамантана приведены в Таблице 5.

Таблица 5

Основные параметры методик проведения ГЖХ в анализе производных адамантана

Препарат (форма) / цели применения метода	Условия ГЖХ	Ссылки
Мемантина гидрохлорид (субстанция и таблетки) / -количественное определение	НФ: кварцевая капиллярная колонка DB-624 (30 м x 0,32 мм x 1,8 мкм). ПФ: азот, 40 мл/мин Детектор: ПИД Т терм.= 300°C, Т инж. = 270°C, Т дет. = 300°C Внутренний стандарт: Габапентин (Gabapentin)	[142]
Гимантан (раствор для инъекций) / -подлинность, -количественный анализ	НФ: стеклянная колонка (набивная) 1,2 м x 3 мм, сорбент – Хромосорб WAW (80/100 меш) с нанесенным 10% Ariszon L, 2% KOH; ПФ: азот, 50 мл/мин Детектор: ПИД Т терм.= 190°C, Т инж. = 210°C, Т дет. = 210°C Внутренний стандарт: N-(1-адамантил) ацетамида	[68]
Гимантан: -фармакокинетические исследования (изучение продуктов биотрансформации гимантана в моче)	НФ: капиллярная колонка HP-1, 25 м x 0,25 мм, неподвижная фаза - диметилполисилоксан, толщина нанесения 25 мкм; ПФ: гелий, 20 см/сек; Детектор: масс-спектрометр FINNIGAN SSQ 7000; э.у. 70 э/в. Т терм. (градиентный режим): исходная температура - 50 °C, затем подъем до 280°C со скоростью 8 °/мин, конечная температура - 280°C, изотерма при 280°C в течение 5 мин; Т инж. = 270°C	[59]
Амантадина гидрохлорид 1)субстанция [22,109,110,148]/ -посторонние примеси;	посторонние примеси [22, 109]: НФ: стеклянная колонка 1,8 м x 2 мм, заполненная диатомитом силанизированным для газовой хроматографии Р, калия гидроксидом Р в метаноле Р, углеводородами с низким давлением паров (тип L) Р в	[22, 109, 147, 148]

Препарат (форма) / цели применения метода	Условия ГЖХ	Ссылки
<p>2)капсулы, раствор для приема внутрь [147]/ - количественное определение, - тест «Растворение»</p>	<p>толуоле Р ПФ: азот для хроматографии Р; 30 мл/мин; Детектор: ПИД; Т терм. градиентное повышение: - от 100°C в течение 16,7 мин. до 200°C; Т инж. = 220°C; Т дет. = 300°C Внутренний стандарт: нафталин;</p> <p>посторонние примеси [148]: НФ: кварцевая капиллярная колонка 0.53 мм × 30 м, покрытая 1,0 мкм фазы G27; ПФ: гелий, 4 мл/мин; Общий поток: 200 мл/мин; Деление потока: 50:1; Детектор: ПИД; Т терм. градиентное повышение: изотерма при 70°C в течение 5 мин., далее повышение от 70°C до 250°C со скоростью 10°C/мин; Т инж. = 220°C; Т дет. = 300°C. Внутренний стандарт: адамантан;</p> <p>посторонние примеси [148, 110]: НФ: кварцевая капиллярная колонка 0.53 мм × 30 м, покрытая 1.0 мкм фазы G27 [148] (или деактивированная щелочью фаза – поли (диметил)(дифенил)силоксан R [110]); ПФ: гелий, 4 мл/мин Общий поток: 200 мл/мин Деление потока: 50:1 Детектор: ПИД Т терм. градиентное повышение: изотерма при 70°C в течение 5 мин., далее повышение от 70°C до 250°C со скоростью 10°C/мин [148] или изотерма при 70°C в течение 5 мин., далее повышение от 70°C до 250°C с 5 по 23 мин, изотерма при 250°C с 23 по 40 мин; Т инж. = 220°C; Т дет. = 300°C. Внутренний стандарт: адамантан;</p> <p>количественное определение [147]: НФ: набивная стеклянная колонка 1,2 м × 2 мм, G1* на носителе S1A с размером 100-120 меш; Детектор: ПИД Т терм. = 115°C; Т инж. = 250°C; Т дет. = 250°C Внутренний стандарт: нафталин</p> <p>для теста «Растворение» [147]: НФ: колонка 30 м × 0,32 мм, пленка фазы G1 толщиной 0,25 мкм; ПФ: гелий, 1,4 мл/мин Детектор: ПИД Т терм. градиентное повышение: - 100°C в течение 3</p>	

Препарат (форма) / цели применения метода	Условия ГЖХ	Ссылки
	мин, до 200°C в течение 2 мин; Т инж. = 250°C; Т дет. = 300°C. Внутренний стандарт: нафталин	
Римантандина гидрохлорид/ -субстанция, -таблетки (количественное определение)	НФ: колонка 2 м × 2 мм, пленка фазы G1 толщиной 0,25 мкм, 80-100 меш, носитель S1A; ПФ: гелий, 1,4 мл/мин Детектор: ПИД Т терм: 200°C; Т инж. = 250°C; Т дет. = 300°C Внутренний стандарт: толуол	[147]
Кемантан (количественное определение кемантана и метаболита в крови)	НФ: металлическая колонка 1 м × 2 мм, носитель Хроматон, промытый кислотой, жидкая фаза – 5% Апиэзон L + 5% Версамид; ПФ: азот, 30 мл/мин; Детектор: ПИД; Т терм.: 175°C; Т инж. = 200°C; Т дет. - не указана. Внутренний стандарт: нафталин	[15]

Газожидкостная хроматография (ГЖХ) имеет большие аналитические возможности в определении значительной группы органических веществ, благодаря широкому спектру используемых сорбентов (Таблица 6). Согласно данным литературы, в анализе лекарственных производных адамантана методом ГЖХ используются колонки различной полярности в зависимости от физико-химических свойств целевых веществ, а также способа пробоподготовки.

Таблица 6

Наиболее часто применяемые в капиллярных колонках фазы для разделения веществ методом ГЖХ [94]

Химический состав фазы	Полярность	Температурный режим
100% диметилполисилоксан	неполярные	от -60°C до 360/370°C
5% фенил 95% диметилполисилоксан	неполярные	от -60°C до 360/370°C
35% фенил 65% диметилполисилоксан	низко-/среднеполярные	от 50°C до 340/360°C
50% фенил 50% диметилполисилоксан	среднеполярные	от 40°C до 320/340°C
6% цианопропилфенил 94% метилполисилоксан	среднеполярные	от -20°C до 260°C
14% цианопропилфенил 86% метилполисилоксан	полярные	от -20°C до 280/300°C
Полиэтиленгликоль	полярные	от 20°C до 250/260°C
Полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталатом	полярные	от 40°C до 250/260°C

В качестве пробоподготовки наиболее часто используются методы ЖЖЭ и ТФЭ [71, 75, 121]. Кроме того, для анализа ООР в лекарственных средствах

активно применяется способ парофазной экстракции (статический и динамический варианты) [75, 121, 122, 135].

Селективность и эффективность разделения в условиях ГЖХ обусловлена особенностями взаимодействий между молекулами сорбатов и различными по химической природе молекулами сорбентов. Целый ряд научных работ посвящен изучению закономерностей взаимодействия производных адамантана с сорбентами различной полярности в условиях газовой хроматографии, а также исследованию корреляционной зависимости между структурой и свойствами производных адамантана с целью прогнозирования хроматографического удерживания соединений [39, 43 - 46, 91, 100]. Было показано, что, в основном, хроматографическое удерживание производных адамантана в условиях ГЖХ обусловлено наличием объемного адамантильного фрагмента, а также положением заместителей в адамантильном каркасе [44].

В работах [41,42] по изучению хроматографического поведения производных адамантана на неполярном сорбенте OV-101 было установлено, что вклад узловых заместителей в параметры удерживания заметно ниже вклада мостиковых заместителей, которые по свойствам оказываются близки к соответствующим производным алканов.

В работе [44] приведен подробный хроматографический анализ алкил-, amino-, галоген-, гетерил- и кислородосодержащих производных адамантана, разработаны методики качественного и количественного анализа промежуточных продуктов синтеза мидантана и римантадина, рассмотрена и детально изучена взаимосвязь сорбционных характеристик производных адамантана с электронными, топологическими и прочими физико-химическими показателями.

В работе [100] на примере производных адамантана также подробно изучено влияние структуры сорбатов на параметры хроматографического исследования, описаны основные механизмы и закономерности взаимодействия соединений с неподвижной фазой.

1.3.3.4. Применение ГЖХ для определения содержания остаточных органических растворителей в лекарственных средствах

Одним из основных практических приложений метода ГЖХ является анализ остаточных органических растворителей (ООР) в ЛС. Поскольку данные растворители не обладают терапевтическим действием, скорее наоборот, могут оказывать канцерогенное, тератогенное, генотоксическое воздействие на организм человека, а их завышенное содержание может негативно сказаться на качестве готовой продукции: физико-химических показателях, сроках годности и т.д., то представляется целесообразным проведение строгого контроля содержания ООР в фармацевтической продукции.

ГФ допускает определение содержания ООР любыми валидированными методами. Согласно литературным данным, для этих целей используются: термогравиметрический анализ, дифференциальный термоанализ (ДТА) и дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), ИК-спектроскопия с Фурье–преобразованием, ЯМР-спектроскопия и др. [107, 121]. Однако, благодаря высокой чувствительности и специфичности, предпочтение, в основном, отдается методу ГЖХ [106, 107, 121, 140]. В ГФ XII изд. ч.1 приведена классификация ООР, а также оговорено предельно допустимое содержание ООР в фармацевтической продукции, но отсутствует информация по конкретной процедуре проведения анализа. Примеры методик с детальным алгоритмом определения приведены в иностранных фармакопеях: статья <467> в Фармакопее США [147, 148], статья <2.4.24> в Европейской Фармакопее [109, 110], общая статья в Японской Фармакопее [146] и в Британской Фармакопее [105]. Во всех перечисленных документах принята единая система классификации ООР. В соответствии с критерием, степенью их возможного риска для здоровья человека, все ООР подразделяются на несколько классов: 1 класс – высокотоксичные растворители (генотоксичные канцерогены), 2 класс – негенотоксичные растворители и 3 класс – растворители низкой токсичности. Также в Руководстве ИСН [119, 120] и в Фармакопее Республики Беларусь [22] выделяют 4 класс ООР, куда относятся растворители с неустановленной токсичностью.

В методиках анализа ООР методом ГЖХ чаще всего применяются детекторы: ПИД, МС, ЭЗД [17, 105 - 107, 109, 110, 121, 127, 140, 147, 148].

Наиболее предпочтительные варианты пробоподготовки: статический вариант парофазной экстракции (син.: «хэд-спейс») [17, 140], твердофазная микроэкстракция [71, 107, 121]. В качестве растворителей проб, главным образом, применяют: воду, диметилсульфоксид, N,N-диметилформамид, 1,3-диметил-2-имидазолидинон, изредка – бензиловый спирт и N,N-диметилацетамид [105, 106, 109, 110, 121, 122, 147, 148].

В монографии Фармакопеи США [148] на субстанцию адапалена приведена отличная от общих рекомендаций статьи <467> методика определения триэтиламина (ООР). В качестве растворителя для пробоподготовки используется диметилсульфоксид. Для извлечения ООР из субстанции применяется парофазный способ экстракции («хэд-спейс»). Детектор – ПИД. НФ: кварцевая капиллярная колонка 30 м × 0,53 мм, покрытая фазой G27, толщиной слоя – 3,0 мкм. Температурный режим инжектора – 250°C, детектора - 300°C, градиентный режим работы термостата: изотерма при 40°C в течение 5 мин, затем повышение от 40 °C до 240 °C со скоростью 40 °C /мин. ПФ: азот, скорость - 4,8 мл/мин.

В работе [95] представлена методика определения содержания изопропилового спирта и ацетона в субстанции гимантана методом ГЖХ. Исследование проводили на хроматографе «Chrome-5» с ПИД. Использовали стеклянную набивную колонку с сорбентом Separon CHN 0,063 – 0,122 мкм. Температурный режим: термостата - 175°C, инжектора - 190°C, детектора - 190°C. Скорость потока азота (газ-носитель) – 30 мл/мин; водорода - 30 мл/мин; воздуха – 300 мл/мин. Содержание ООР определяли методом внутреннего стандарта; стандарт - этиловый эфир уксусной кислоты (х.ч. для хроматографии).

Таким образом, при разработке методик анализа субстанции и лекарственной формы кемамантана можно основываться на имеющиеся в литературе данные по анализу иных лекарственных средств – производных адамантана, в контроле которых применяются, главным образом, следующие аналитические методы: титриметрические (преимущественно титрование в

неводной среде), качественные реакции (как на адамантановый фрагмент, так и на функциональные группы), спектральные (ИК- и УФ-спектрофотометрия, ЯМР-спектроскопия), хроматографические (ТСХ, ВЭЖХ, ГЖХ).

1.4. Кемантан. Общая характеристика

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в ходе скрининга производных адамантана и целенаправленного синтеза был получен препарат с выраженной иммуностропной активностью – 5-гидроксиадамантан-2-он, получивший название «кемантан» [35].

1.4.1. Фармакологические свойства кемантана. Применение в клинике

Кемантан обладает широким спектром биологической активности. Первоначально у этого вещества была обнаружена заметная антикаталептическая активность, но клинические испытания показали, что препарат уступает по противопаркинсоническому действию мидантану (амантадину). Однако, в сравнении с мидантаном, кемантан не оказывает существенного влияния на артериальное давление, ритм сердечных сокращений и дыхание, имеет значительно меньшую острую и хроническую токсичность.

Экспериментально установлено, что кемантан влияет как на клеточный, так и на гуморальный иммунитет: он активизирует выработку В-лимфоцитами иммуноглобулинов, стимулирует Т-клеточные иммунные реакции, а также миграцию стволовых клеток, способствует образованию интерлейкинов 1 и 2 [9].

В 90-е годы проводились клинические испытания препарата. Терапевтический эффект кемантана изучался на больных с легочной патологией (туберкулез легких, бронхиты, инфекционно-легочная форма бронхиальной астмы) [64]. Кроме того, данный препарат успешно применялся в стоматологической практике: в комплексной терапии больных с афтозным стоматитом, с переломами нижней челюсти, осложненными воспалением [78]. Было показано, что в результате терапии кемантаном увеличивались показатели клеточного иммунитета, повышался уровень В-лимфоцитов и иммуноглобулинов,

снижались процессы активационного апоптоза. В частности, у больных с афтозным стоматитом при лечении кемантаном наблюдалось сокращение сроков эпителизации, удлинились сроки ремиссии.

В работе Ковалева И.В. и др. [37] рассмотрен механизм действия кемантана в качестве модулятора цитохром Р450-зависимых биохимических процессов, показана эффективность терапии кемантаном больных с ХОЗАНК. Изучение механизма действия кемантана на систему кровеносных сосудов также приведено в работе Мирзояна Р.С. и др. [53]. В эксперименте на крысах было установлено, что 5-гидроксиадамantan-2-он в дозе 100 мг/кг увеличивал кровоснабжение мозга после глобальной преходящей ишемии; проявляя проивоишемическое действие, препарат повышал выживаемость крыс при гравитационных перегрузках [53].

Отдельно стоит отметить роль кемантана в терапии болезней дезадаптации, в частности, при синдроме хронической усталости (СХУ). Исследования на пациентах с СХУ были проведены в ГНЦ РФ – Институте иммунологии и Специализированной клинической больнице им. З.П. Соловьева – Клинике неврозов. Было показано, что своевременный прием кемантана снижал риск возникновения нейроиммунных нарушений при СХУ, приводил к скорейшему восстановлению физической и умственной работоспособности, нормализации иммунологических показателей, способствовал лечению фарингита, а также уменьшению других нейромиоастенических симптомов, опосредованных реактивацией герпес-вируса. Было установлено, что кемантан способствовал нормализации нейроиммунного гомеостаза, усиливал резистентность больных СХУ к большинству факторов, обуславливающих развитие данного синдрома [8].

В литературе имеются упоминания о проявлении кемантаном анти-ВИЧ-активности. В эксперименте на ВИЧ-инфицированных человеческих МТ-4 лимфобластомных клетках было показано, что применение кемантана в концентрации 500 мкг/мл приводит к ингибированию экспрессии вирусных протеинов на поверхности инфицированных клеток на 50%, а также способствует снижению уровня выхода растворимых ВИЧ-антигенов в культуральную среду [36].

Кемантан относится к низкотоксичным лекарственным средствам. По результатам клинических исследований, проведенных в 90-е годы XX века, не было выявлено серьезных побочных эффектов со стороны печени, почек и сердца. Наблюдались единичные случаи диспепсических расстройств на фоне обострения хронических заболеваний со стороны желудочно-кишечного тракта, редко - аллергические реакции. При применении кемантана в средних дозах изредка отмечалась повышенная возбудимость, при использовании в больших дозах – вялость, сонливость [51, 64].

Фармакокинетические исследования, показали, что основной путь метаболизма кемантана – образование 1,4-адамандиола, протекающее, в основном, за счет ферментов крови. В ряде работ [15, 50, 55] была отмечена разница в интенсивности метаболизма препарата у крыс и человека, а также показаны различия в фармакокинетических параметрах по гендерному типу: у мужчин наблюдался более длительный срок достижения максимальной концентрации препарата в крови, а также более длительный период выведения препарата ($C_{max} = 1,975$, время полного выведения - 24 часа) в сравнении с аналогичными параметрами у женщин ($C_{max} = 1,105$, время полного выведения - 10 часов). Проведенное исследование биодоступности показало лучшие результаты в случае применения кемантана в виде таблеток в сравнении с капсулами [50].

1.4.2. Способы получения 5-гидроксиадамантан-2-она

Ввиду перспективности применения кемантана в качестве лекарственного средства на протяжении вот уже нескольких десятилетий проводится поиск и разработка наиболее оптимальных способов его синтеза.

В 1968 году Гелук и Шлатман предложили способ получения 1-гидроксиадамантан-4-она (син.: 5-гидроксиадамантан-2-он, кемантан) из 2-гидроксиадамантана путем добавления последнего в 70 % серную кислоту и нагреванием в реакторе при 90°C с непрерывным перемешиванием. Далее проводилась многократная экстракция продуктов реакции с последующим

окислением смеси продуктов хромовым ангидридом. Очистку целевого продукта осуществляли путем кристаллизации из четыреххлористого углерода (степень извлечения - 76 %). Выход кемантана составлял ~25% [115].

С целью повышения выхода целевого вещества Гелуком был предложен иной способ синтеза: адамантан-2-он окисляли 12-кратным избытком 100% азотной кислоты при комнатной температуре, массу нагревали 1,5 часа при температуре 60°C. Целевой продукт экстрагировали хлороформом. Выход кемантана составлял ~70% [116]. Данный способ оказался непригоден для получения кемантана в масштабах производства из-за применения в больших количествах пожаро- и взрывоопасного реагента – 100%-ной азотной кислоты. Кроме того, была установлена способность кислородсодержащих производных адамантана образовывать устойчивые комплексы с азотной кислотой [114]. Данные комплексы невозможно разрушить в вышеуказанных условиях выделения целевого продукта, а также затруднительно освободиться от их примеси посредством кристаллизации [35].

Hlavaty L., Vodicka L. с сотрудниками [123] получили 5-гидроксиадамантан-2-он из адамантанона путем окисления его хромовым ангидридом в уксусной кислоте. Нейтрализацию реакционной массы осуществляли раствором щелочи, а целевой продукт получали посредством последовательной экстракции сначала смесью петролейный эфир-эфир, затем хлороформом (загрузка адамантанона 1 г, выход 80%) [123]. Экспериментально было установлено, что воспроизводимость данного метода в отношении выхода и степени чистоты получаемого продукта низкая.

Новаков И.А., Орлинсон Б.С., Савельев Е.Н. [57] предложили усовершенствовать способ синтеза 5-гидроксиадамантан-2-она путем обработки адамантан-2-она с помощью комплекса окислительно-активирующей системы, включающей серную, азотную и уксусную кислоты; молярное соотношение адамантан-2-он - серная кислота - азотная кислота - уксусная кислота составляет: 1 : (1,75) : (8,43-12,62) : (0,25-1). Очистка целевого продукта проводилась путем перекристаллизации из четыреххлористого углерода [57].

В 2007 году Джемилев У.Х., Хуснутдинов Р.И. с сотрудниками [29] предложили для синтеза 1-гидроксиадамантан-4-она (син.: 5-гидроксиадамантан-2-он, кемантан) в качестве окисляющего агента использовать бромноватистую кислоту, получаемую непосредственно в реакционной среде из четырехбромистого углерода и воды. Окисление адамантан-2-она проводили в присутствии катализаторов - соединений молибдена $\text{Mo}(\text{CO})_6$ или вольфрама $\text{W}(\text{CO})_6$, при мольном соотношении $[\text{Mo}(\text{CO})_6 \text{ или } \text{W}(\text{CO})_6] : [\text{адамантан-2-он}] : [\text{CBr}_4] : [\text{H}_2\text{O}] = 1 : 100 : 100 : 1000 - 4000$ при температуре $140-160^\circ\text{C}$ в течение 6-10 ч [29] (Рисунок 5) [29].

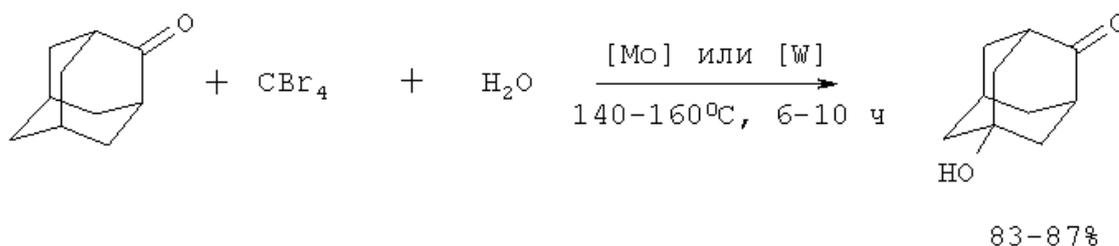


Рисунок 5 - Схема синтеза кемантана из адамантан-2-она [29]

В 2011 году Хуснутдиновым Р.И. с коллегами [93] был предложен альтернативный способ синтеза кемантана путем глубокого окисления адамантана посредством применения окислительной системы, в состав которой входят: катализатор – гексакарбонил вольфрама, четыреххлористый углерод, вода и промотирующий агент – амид пропионовой кислоты. Условия: 150°C , 5ч. В результате получают 5-гидроксиадамантан-2-он с выходом 50-52%. Второй продукт реакции - 1-хлорадамантан-4-он, который легко может быть гидролизован до 5-гидроксиадамантан-2-она. Суммарный выход кемантана по данному методу составляет не менее 90% [93] (Рисунок 6).

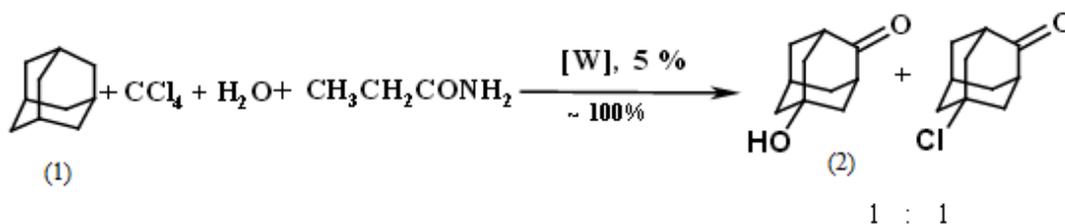


Рисунок 6 - Схема синтеза кемантана (2) из адамантана (1) [93].

Помимо химических методов синтеза, известны разработки биотехнологического способа получения 5-гидроксиадамантан-2-она [69, 103].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» был разработан и запатентован новый способ получения кемантана, позволяющий повысить на порядок скорость реакции, увеличить выход и получать лекарственное средство достаточной степени чистоты [1, 35]. Ниже приведены основные этапы синтеза и контроля производства кемантана.

Согласно предложенной схеме, синтез 5-гидроксиадамантан-2-она (кемантана) осуществляется в результате реакции окисления адамантан-2-она смесью концентрированных серной и азотной кислот при температуре 40-50°C и выдержкой в течение 10-11 часов. Процесс окисления ведут в присутствии катализаторов: оксидов металлов переменной валентности, калия или натрия нитритов.

Перед началом синтеза в соответствии с технологическим лабораторным регламентом проводят *проверку исходных продуктов: концентрированных кислот (азотной и серной, а также их смеси), адамантан-2-она.*

В процессе получения кемантана проводят *анализ реакционной массы на конец реакции методом ГЖХ. Время окончания реакции определяют по содержанию кемантана в реакционной массе.*

По окончании реакции массу выливают на лед, а затем, для полного разложения комплексов с азотной кислотой, кипятят с активированным углем и алюминия оксидом или силикагелем с одновременной отгонкой с острым паром исходного адамантан-2-она. Отгонку проводят до полного отсутствия в кубе адамантан-2-она и прекращения выделения окислов азота.

В результате реакции окисления в этих условиях помимо кемантана образуется побочный продукт синтеза – адамантан-2,6-дион (Рисунок 7).

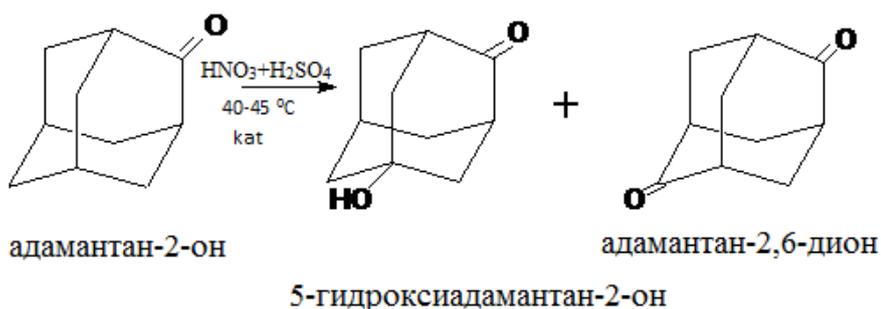


Рисунок 7 - Схема синтеза кемантана

Кислую реакционную массу после отгонки с паром фильтруют, а затем, из фильтрата экстрагируют кемантан с помощью хлороформа. На данном этапе осуществляют контроль полноты экстракции кемантана из «водного слоя» хлороформом методом ТСХ.

Далее растворитель упаривают. К остатку прибавляют гексан и отфильтровывают. Проводят очистку субстанции от адамантан-2,6-диона путем ее кристаллизации из четыреххлористого углерода. Полученный кемантан высушивают до постоянной массы и *проводят аналитический контроль*.

1.4.3. Постадийный контроль производства субстанции кемантана

В 80-90-х годах в группе химического синтеза ОТО проводились многочисленные исследования для решения следующих задач:

- 1) изучения факторов, влияющих на образование побочного продукта синтеза - адамантан-2,6-диона;
- 2) определения наиболее благоприятных условий для образования преимущественно кемантана;
- 3) разработки методов очистки от адамантан-2,6-диона кемантана с максимальным выходом последнего.

В связи с этим в химико-технологической лаборатории ОТО был поставлен ряд опытов по изучению влияния соотношения серной и азотной кислот в применяемой смеси, а также температуры и времени выдержки на скорость и полноту протекания реакции и процесса образования кемантана и адамантан-2,6-диона. Для успешного решения этих задач были разработаны методики постадийного контроля качества. Основные этапы контроля производства отражены далее.

1 стадия. Получение кемантана (5-гидроксиадамантан-2-она)

Контроль качества исходных и вспомогательных веществ

1.1. Анализ адамантан-2-она

1.1.1. Определение температуры плавления

Проводят на Клинском электрическом приборе (метод 1, в запаянном капилляре, ГФ X, стр. 766 [23]). На следующей стадии применяют вещество с температурой плавления от 281 °С до 288 °С.

1.1.2. Определение потери в массе при высушивании

Около 0,5 г препарата (точная навеска) сушат над концентрированной серной кислотой до постоянной массы. Потеря в массе не должна превышать 0,5%.

1.1.3. Количественное определение

Приготовление раствора гидроксиламина гидрохлорида: 7,0 г гидроксиламина гидрохлорида растворяют в 20 мл воды в мерной колбе вместимостью 200 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 95% до метки, перемешивают.

Приготовление 0,05М раствора дифенилгуанидина: 5,3 г дифенилгуанидина (ч. МРТУ 6-09-4811-67) растворяют в 200 мл спирта этилового 95% в мерной колбе вместимостью 500 мл, доводят объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивают.

Приготовление раствора бромфенолового синего: 0,1 г бромфенолового синего растворяют в 100 мл спирта этилового 95%.

Приготовление 0,2 М спиртового раствора хлорной кислоты: 23,4 мл 57% или 36,2 мл 42% водного раствора хлорной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора спиртом этиловым 95 % до метки, перемешивают.

Установление титра 0,2 М спиртового раствора хлорной кислоты: около 0,4 г (точная навеска) дифенилгуанидина (ч. МРТУ 6-09-4811-67), высушенного при температуре 100 – 105°С до постоянной массы, растворяют в 25 мл спирта этилового 95 % и титруют приготовленным раствором хлорной кислоты в присутствии 5 капель спиртового раствора бромфенолового синего до перехода фиолетовой окраски в желтую.

Поправочный коэффициент вычисляют по формуле:

$$K = \frac{a}{0,04226 \times V}, \quad (1)$$

где: a – навеска дифенилгуанидина, в граммах;

V – количество 0,2 М раствора хлорной кислоты, пошедшее на титрование, в миллилитрах.

Определение содержания адамантан-2-она: 0,15 г (точная навеска) вещества растворяют в 8 мл раствора гидроксиламина гидрохлорида в колбе с притертой пробкой. Добавляют точно 40 мл 0,05 М раствора дифенилгуанидина, перемешивают и оставляют стоять на сутки. Затем добавляют 5 капель раствора бромфенолового синего и титруют 0,2 М спиртовым раствором хлорной кислоты до перехода окраски индикатора от фиолетовой до желтой (до цвета слепого опыта, состоящего из 8 мл раствора гидроксиламина гидрохлорида, 40 мл спирта этилового 95 % и 5 капель раствора бромфенолового синего).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,2 М спиртового раствора хлорной кислоты соответствует 0,03004 г адамантан-2-она. Содержание адамантан-2-она в % (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V_0 - V_1) \times 0,03004 \times 100}{a}, \quad (2)$$

где V_0 – количество точно 0,2 М раствора хлорной кислоты, пошедшее на титрование контрольного опыта, в миллилитрах;

V_1 – количество точно 0,2 М раствора хлорной кислоты, пошедшее на титрование испытуемого раствора, в миллилитрах;

a – навеска субстанции, в граммах.

На следующей стадии применяют продукт с содержанием адамантан-2-она не менее 97,0 %.

1.2. Анализ концентрированных кислот

1.2.1. Анализ азотной кислоты (определение процентного содержания)

Около 1 г (0,8 мл) (точная навеска) препарата быстро помещают во взвешенную колбу вместимостью 100 мл с притертой пробкой, содержащую 15 мл воды. Колбу закрывают пробкой, перемешивают и снова взвешивают. По

разности результатов взвешиваний определяют массу введенного препарата. Содержимое колбы титруют 0,5 М раствором натрия гидроксида (индикатор метиловый оранжевый).

1 мл 0,5 М раствора натрия гидроксида соответствует 0,03151 г кислоты азотной. На следующей стадии применяют кислоту с содержанием от 67% до 73%.

1.2.2. Анализ серной кислоты

Около 1,0 г (точная навеска) серной кислоты взвешивают в конической колбе вместимостью 100 мл с притертой пробкой и прибавляют 30 мл воды: раствор тщательно перемешивают и титруют 0,5 М раствором натрия гидроксида (индикатор – метиловый оранжевый).

1 мл 0,5 М раствора натрия гидроксида соответствует 0,02452 г H_2SO_4 .

На следующей стадии применяют кислоту с содержанием от 93,5% до 95,6%.

1.2.3. Анализ смеси азотной и серной кислот.

1.2.3.1. Определение массовой доли серной кислоты

Приготовление смешанного индикатора: 0,12 г метилового красного по ГОСТ 5853-51 и 0,082 г метилового голубого растворяют каждый в 100 мл спирта этилового 95%, растворы смешивают.

Подготовка пробы и проведение анализа: около 1 г (точная навеска) смеси кислот взвешивают в колбе с притертой пробкой вместимостью 200-250 мл и упаривают на водяной бане (в течение одного часа) до маслянистого остатка. После охлаждения к содержимому колбы прибавляют 50 мл воды, 2 капли смешанного индикатора и титруют 0,5 М раствором натрия гидроксида до появления зеленой окраски.

Массовую долю серной кислоты X_1 (%) вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{V \times 0,0245 \times 100}{m}, \quad (3)$$

где V – объем точно 0,5 М раствора натрия гидроксида, израсходованного на титрование, в миллилитрах;

0,0245 – масса серной кислоты, соответствующая точно 0,5 М раствору натрия гидроксида, в граммах;

m – навеска анализируемой пробы, в граммах.

На следующей стадии применяют смесь кислот с содержанием серной кислоты от 79% до 85%.

1.2.3.2. Определение массовой доли азотной кислоты

Приготовление раствора индикатора: 0,12 г метилового красного по ГОСТ 5853-51 растворяют при нагревании в 100 мл спирта этилового 95%.

Подготовка пробы и проведение анализа: около 1 г (точная навеска) смеси кислот взвешивают в бюксе с закрытой крышкой. В коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 200-250 мл, содержащую 150-200 мл воды, переносят бюкс, снимают с него крышку, колбу быстро закрывают пробкой, перемешивают. К содержимому колбы прибавляют 2-3-капли метилового красного и титруют 0,5 М раствором натрия гидроксида до перехода окраски раствора от красной в желтую.

Массовую долю азотной кислоты (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \times 0,031503 \times 100}{m} - 1,285 \times X_1, \quad (4)$$

где V – объем точно 0,5 М раствора натрия гидроксида, израсходованного на титрование, в миллилитрах;

m – навеска анализируемой пробы, в граммах;

X_1 – массовая доля серной кислоты, определяемая по п. 1.2.3.1., в процентах;

0,031503 – масса азотной кислоты, соответствующая 1 мл точно 0,5 М раствору натрия гидроксида, в граммах;

1,285 – коэффициент пересчета серной кислоты на азотную кислоту.

На следующей стадии применяют смесь кислот с содержанием азотной кислоты от 6,5% до 12%.

Аналитический контроль на стадии получения кемантана

1.3. Анализ реакционной массы на конец реакции

Анализ проводят на хроматографе типа «Chrom-5» с пламенно-ионизационным детектором. Условия хроматографирования: набивная стеклянная колонка длиной 1,2 м, внутренним диаметром - 3 мм, сорбент – Хромосорб WAW (80/100 меш), неподвижная фаза 10% Apiezon L, 2% КОН; температура колонки - 175 °С, инжектора - 190 °С, детектора - 210 °С; скорость газа-носителя (азот) - 40 мл/мин, воздуха - 400 мл/мин, водорода - 40 мл/мин; объём вводимой пробы - 1 мкл.

Подготовка пробы: 1 мл реакционной массы выливают на 5 мл воды и проводят нейтрализацию 25% раствором аммиака. После охлаждения массу переносят в делительную воронку и экстрагируют хлороформом 3 раза по 2 мл. Хлороформные извлечения фильтруют через сухой бумажный фильтр и собирают в одну емкость. 1 мкл хлороформного экстракта вводят в испаритель хроматографа.

Идентификацию выходящих пиков проводят методом сравнения со временем удерживания пиков эталонных веществ (свидетелей).

Время удерживания адамантан-2-она, адамантан-2,6-диона и кемантана составляет соответственно: 1 мин 30 сек, 3 мин и 5 мин. Относительное процентное содержание продуктов реакции рассчитывают по площадям пиков методом внутренней нормализации.

Концом реакции считается такой состав реакционной массы, при котором относительное содержание кемантана составляет не менее 80 %.

1.4. Определение конца отгонки адамантан-2-она из кислой водной массы

Анализ проводят методом ТСХ. 10 мл кубового остатка помещают в делительную воронку и экстрагируют 3 раза по 4, 3 и 3 мл. Хлороформные извлечения фильтруют через сухой бумажный фильтр в одну емкость. На хроматографическую пластинку, предварительно промытую системой растворителей: гексан – диоксан (5:2), в точки 1 и 2 наносят 0,001 и 0,01 мл экстракта. Пластинку помещают в камеру с вышеуказанной системой растворителей и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет расстояние 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе 5 минут и опрыскивают смесью раствора 2,4-

динитрофенилгидразина и спирта (1:1). Через 1-2 минуты в точке 2 может появиться пятно адамантан-2-она. В точке 1 пятна не должно быть.

Допустимое содержание адамантан-2-она не должно превышать 0,05 мг/мл.

1.5. Определение полноты экстракции кемантана из «водного слоя»

Анализ проводят методом ТСХ. На хроматографическую пластинку, предварительно промытую системой: гексан – диоксан (5:2), в точку I наносят 0,001 мл «водного слоя», а в точку 2 – 0,002 мл 0,1% хлороформного раствора кемантана (2 мкг).

Пятна высушивают на воздухе в течение 5 мин и пластинку помещают в камеру с вышеуказанной системой. Когда фронт растворителя пройдет расстояние 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе 5 мин и опрыскивают смесью растворов 2,4-динитрофенилгидразина (ГФ X, стр. 877) и спирта (1:1).

Минимальное определяемое количество кемантана – 0,05 мкг.

На хроматограмме в точке I не должно быть пятна на уровне кемантана. На старте допускается пятно солевого остатка «водного слоя».

Содержание кемантана в «водном слое» составляет менее 0,05 мг/мл.

1.6. Анализ технического кемантана

1.6.1. Метод газожидкостной хроматографии.

0,01 г кемантана технического растворяют в 1 мл хлороформа, 1 мкл полученного раствора вводят в испаритель хроматографа «Chrom-5» и проводят разделение в режиме работы прибора по п. 1.3.

На следующей стадии применяют технический продукт с относительным содержанием кемантана 88-95%.

1.6.2. Метод тонкослойной хроматографии

0,01 г кемантана технического растворяют в 10 мл хлороформа. На хроматографическую пластинку, предварительно промытую системой растворителей: гексан – диоксан (5:2), в точки 1 и 2 наносят соответственно 0,0005 мл (0,5 мкг) и 0,0002 мл (0,2 мкг) хлороформного раствора. В точку 3 наносят 0,0002 мл (0,2 мкг) 0,01% хлороформного раствора адамантан-2-она

(свидетель). Пластинку помещают в камеру с вышеуказанной системой растворителей и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителя пройдет 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе 5 мин и опрыскивают смесью раствора 2,4-динитрофенилгидразина и спирта (1:1). Через 1-2 мин в точке 1 должно быть одно пятно кемантана (содержание адамантан-2,6-диона менее 10%). В точке 2 не должно быть пятен на уровне свидетеля (содержание адамантан-2-она менее 0,5%).

1.6.3. Определение нитритов и нитратов

К 0,1 г технического продукта прибавляют 3-5 капель раствора дифениламина (ГФ X, стр. 878). Не должно появляться синего окрашивания.

Появление синего окрашивания свидетельствует о наличии нитратов и нитритов, продукт должен быть передан на стадии ТП-2.

2 стадия. Очистка технического 5-гидроксиадамантан-2-она

2.1. Определение конца гидролиза

5 мл реакционной массы помещают в делительную воронку и экстрагируют хлороформом 3 раза по 5 мл. Хлороформное извлечение фильтруют через сухой бумажный фильтр в одну емкость и перемешивают.

3 мл полученного экстракта помещают в фарфоровый тигель и упаривают досуха. К остатку добавляют 3-5 капель раствора дифениламина. Не должно появляться синего окрашивания.

2.2. Определение полноты экстракции кемантана

Анализ проводят методом ТСХ по п. 1.5.

2.3. Определение потери в массе при высушивании

Около 1,0 г (точная навеска) кемантана сушат при температуре 60 °С до постоянной массы. Потеря в массе не должна превышать 2,5%.

2.4. Анализ готового продукта

Анализ готового продукта проводили по проекту ВФС на кемантан, субстанцию.

1.4.4. Контроль качества субстанции кемантана

В проекте ВФС на субстанцию кемантана был предусмотрен контроль качества по следующим показателям: «Описание», «Растворимость» «Подлинность» (качественная химическая реакция – реакция на кето-группу с 2,4-динитрофенилгидразином в хлористоводородной кислоте), «Прозрачность раствора», «Цветность раствора», «рН раствора» (2% раствор в воде), «Потеря в массе при высушивании», «Температура плавления», «Сульфаты», «Нитраты и нитриты» (качественная реакция), «Сульфатная зола и тяжелые металлы», «Адамантан-2-он, адамантан-2,6-дион» (метод ТСХ), «Количественное содержание» (метод оксимирования), «Упаковка», «Маркировка», «Хранение» и «Срок годности».

Определение посторонних примесей проводили по следующей методике: 0,05 г препарата растворяют в 5 мл хлороформа (раствор А). К 1 мл раствора А прибавляют 9 мл хлороформа, перемешивают (раствор Б). 0,0025 мл (25 мкг) раствора А наносят на линию старта пластинки Kieselgel F254 (Merk) размером 5x15 см, предварительно промытой смесью растворителей, описанной ниже. Рядом с первой точкой, на расстоянии 2 см, наносят 0,002 мл (2 мкг) раствора Б. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 5 минут, затем помещают в камеру со смесью растворителей: гексан – диоксан (5:2) и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителя пройдет расстояние 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 минут и опрыскивают смесью раствора 2,4-динитрофенилгидразина в хлористоводородной кислоте (ГФ X, стр. 677) и спирта (1:1). Через 1 минуту наблюдают появление пятен.

На хроматограмме из первой стартовой точки над пятном кемантана желтого или оранжевого цвета допускается наличие второго пятна желтого цвета (адамантан-2,6-дион), но последнее не должно обнаруживаться на хроматограмме из второй стартовой точки, что соответствует содержанию этой примеси менее 2,5% (предел обнаружения адамантан-2,6-диона 0,05 мкг). Адамантан-2-он в 25

мкг не обнаруживается, что соответствует его содержанию менее 0,4% (предел обнаружения адамантан-2-она 0,1 мкг).

Количественное определение проводили по следующей методике: около 0,15 г препарата (точная навеска) растворяют в 8 мл раствора гидроксиламина гидрохлорида, добавляют точно 40 мл 0,05 н раствора дифенилгуанидина, перемешивают, оставляют стоять на 30 мин и титруют 0,2 н спиртовым раствором хлорной кислоты до желтой окраски слепого опыта, состоящего из 8 мл раствора гидроксиламина гидрохлорида и 40 мл 95% спирта (индикатор бромфеноловый синий). Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,2 н спиртового раствора хлорной кислоты соответствует 0,03324 г $C_{10}H_{14}O_2$.

Приготовление раствора гидроксиламина гидрохлорида: 7,0 г гидроксиламина гидрохлорида растворяют в 20 мл воды в мерной колбе емкостью 200 мл и доводят объем раствора спиртом 95% до метки, перемешивают.

Приготовление 0,05 н раствора дифенилгуанидина: 5,3 г дифенилгуанидина (ч, МРТУ 6-09-4811-67) растворяют в 200 мл спирта этилового 95 % в мерной колбе емкостью 500 мл и доводят объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивают.

Приготовление раствора бромфенолового синего: 1 г бромфенолового синего растворяют в 100 мл спирта этилового 95%.

Приготовление 0,2 н спиртового раствора хлорной кислоты: 23,4 мл 57% или 36,2 мл 42% водного раствора хлорной кислоты помещают в мерную колбу емкостью 1 л и доводят объем раствора спиртом этиловым 95 % до метки, перемешивают.

Установка титра: около 0,4 г (точная навеска) дифенилгуанидина (ч, МРТУ 6-09-4811-67) высушенного до постоянной массы, растворяют в 25 мл спирта этилового 95 % и титруют приготовленным раствором хлорной кислоты в присутствии 1 капли спиртового раствора бромфенолового синего до перехода фиолетовой окраски в желтую.

Поправочный коэффициент вычисляют по первому способу, где $T=0,04276$

1.4.5. Контроль качества таблеток кемантана

В проекте ВФС на таблетки кемантана 0,1 г был предусмотрен контроль качества по следующим показателям: «Описание», «Подлинность» (качественная реакция на кето-группу), «Средняя масса и однородность по массе», «Распадаемость», «Количественное определение» (метод УФ-спектрофотометрии, по собственному поглощению водных извлечений из таблеток с концентрацией кемантана 0,2%), «Упаковка», «Маркировка», «Хранение», «Срок годности».

1.4.6. Заключение

Таким образом, на первой стадии контроля производства был предусмотрен контроль качества исходных и промежуточных продуктов, который выполнялся, в основном, путем определения физико-химических характеристик (температура плавления, потеря в массе при высушивании), а также количественного определения методом титриметрии.

При контроле на стадии получения кемантана (анализ реакционной массы на конец реакции, определение конца отгонки адамантан-2-она из кислой водной массы, определение полноты экстракции кемантана из водного слоя) применялись методы ГЖХ и ТСХ.

Контроль технического кемантана проводили по количественному определению (метод ГЖХ, внутренняя нормализация), содержанию примесей адамантан-2-она и адамантан-2,6-диона (метод ТСХ) и отсутствию нитроэфиров (качественная реакция с дифениламином).

Очистку технического кемантана проводили путем кристаллизации из четыреххлористого углерода, и качество готового продукта контролировали по проекту ВФС по показателям «Описание», «Растворимость», «Подлинность» (качественная химическая реакция – реакция на кето-группу с 2,4-динитрофенилгидразином в хлористоводородной кислоте), «Прозрачность раствора», «Цветность раствора», «рН раствора» (2% раствор в воде), «Потеря в массе при высушивании», «Температура плавления», «Сульфаты», «Нитраты и нитриты» (качественная реакция), «Сульфатная зола и тяжелые металлы»,

«Адамантан-2-он, адамантан-2,6-дион» (метод ТСХ), «Микробиологическая чистота», «Количественное определение» (метод оксимирования).

Применения спектральных методов в контроле качества субстанции кемантана в проекте ВФС предусмотрено не было. Несмотря на то, что в контроле производства был использован метод ГЖХ, контроль посторонних примесей в готовом продукте проводился с применением методики ТСХ, обладающей меньшей правильностью.

Кроме того, в проекте ВФС на субстанцию кемантана ранее не был предусмотрен контроль содержания остаточных растворителей, тогда как в настоящее время содержание органических растворителей является важным показателем качества фармацевтических субстанций, и отсутствие этого раздела в нормативной документации должно быть обосновано [21].

Для контроля качества таблеток кемантана по проекту ВФС были предложены метод УФ-спектрофотометрии (количественное определение) и качественная химическая реакция (идентификация кемантана). Контроль чистоты препарата и определение показателя «Растворение» в проекте ВФС не были предусмотрены.

Кроме того, в результате исследований, проведенных в лаборатории готовых лекарственных форм опытно-технологического отдела ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», была предложена новая пропись и технология производства лекарственной формы – таблетки кемантана 100 мг.

Изменения, внесенные в процесс производства препарата «Кемантан», а также появление новых, современных, требований к контролю качества лекарственных средств, призванных обеспечить их эффективность и безопасность, обуславливают необходимость пересмотра и уточнения разработанных ранее методик анализа препарата и комплекса методов его аналитического контроля качества.

ВЫВОДЫ ИЗ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ

1. Составлен краткий обзор физико-химических и фармакологических свойств производных адамантана. Показана взаимосвязь между особенностями их строения и проявляемой специфической биологической активностью. Обобщенные данные по физико-химическим свойствам и параметрам строения соединений с адамантановым фрагментом в структуре позволяют выбирать наиболее оптимальные методы для их анализа, а также прогнозировать хроматографическое поведение, спектральные характеристики.

2. Представленные литературные данные по методам и условиям анализа производных адамантана служат теоретической базой для разработки методик анализа кемантана. Показано, что наиболее распространенными методами контроля подлинности производных адамантана являются ИК-, ЯМР¹H – спектроскопия, СФМ в УФ и видимой областях спектра. А в количественном анализе отдается предпочтение методам неводного титрования, ГЖХ, ВЭЖХ.

3. Описанные фармакологические характеристики кемантана свидетельствуют о перспективности разработки данного препарата и актуальности проводимых с этой целью исследований.

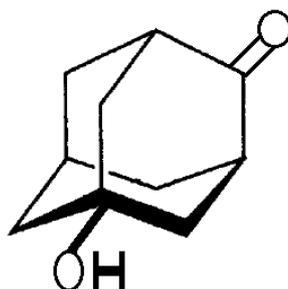
4. Представлен обзор способов синтеза 5-гидроксиадамантан-2-она (кемантана), в том числе и оригинального способа синтеза, разработанного в НИИ фармакологии, а также существующих методов и методик контроля производства субстанции, что позволяет сделать вывод о степени разработанности темы исследования.

5. Показано, что в связи с изменениями, внесенными в процесс производства препарата «Кемантан», а также современными требованиями к контролю качества лекарственных средств, необходимо пересмотреть разработанный ранее комплекс методик контроля производства субстанции кемантана, а также контроля качества его субстанции и лекарственной формы с целью обеспечения соответствия препарата современным требованиям эффективности и безопасности.

ГЛАВА 2. Материалы и методы

Объектом наших исследований являлись исходные и промежуточные продукты синтеза кемантана, образцы субстанции и твердой дозированной лекарственной формы кемантана - таблетки дозировкой 100 мг.

По химическому строению кемантан представляет собой 5-гидроксиадамантан-2-он (син.: 1-гидроксиадамантан-4-он) (Рисунок 8).



М.м. 160,22

Рисунок 8 - Структурная формула кемантана

В качестве веществ-свидетелей при разработке методик анализа были использованы потенциальные промежуточные и побочные продукты синтеза: адамантан-2-он, адамантан-2,6-дион, адамантан-1-ол, адамантан-2-ол, адамантан-2,6-диол, адамантан-1,4-диол, адамантан-1,4-диол («цис»-изомер).

В качестве внутренних стандартов при разработке методик фармацевтического анализа использовали: адамантан (100277 Aldrich), 1-адамантилэтанол (188115 Aldrich), адамантан-2-он (99,8%, АО «Олайнский химико-фармацевтический завод», Латвия), ацетон (414689 Fluka).

Синтез кемантана и его потенциальных технологических примесей осуществлен в химико-технологической лаборатории ОТО ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (руководитель отдела – доктор фарм. наук, профессор Б.М. Пятин, руководитель группы технологии синтеза – ведущий научный сотрудник, кандидат хим. наук Н.И. Авдюнина).

Твердая дозированная лекарственная форма – таблетки кемантана 100 мг изготовлена в лаборатории готовых лекарственных форм ОТО ФГБНУ «НИИ

фармакологии имени В.В. Закусова» (заведующий лабораторией – доктор фарм. наук, профессор К.В. Алексеев).

Изучение физико-химических свойств кемантана, разработку методик анализа, установление сроков годности и научно обоснованных норм качества субстанции кемантана и его лекарственной формы проводили в аналитической группе ОТО ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (руководитель аналитической группы - ведущий научный сотрудник, доктор фарм. наук Л.Н. Грушевская).

В работе использовалась мерная лабораторная посуда классов «А» (мерные колбы вместимостью 5, 10, 20, 25, 50, 100, 200, 250 и 1000 мл), «AS» (аналитические пипетки вместимостью 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 мл) и «В» (мерные цилиндры вместимостью 20 мл, 50 мл, 500 мл и 1000 мл), бюретки для титрования.

Также для целей пробоподготовки применяли фильтры «Fisher Scientific» (материал Glasfaser-Vorfilter/Nylon (PA)), размер пор 0,22 и 0,45 мкм, Германия; ультразвуковую ванну: УЗВ-5,7 «Сапрфир», РФ.

Изучение формы кристаллов проводили на электронном микроскопе фирмы Nikon, серии H550S, Япония. Используемый реактив: масло вазелиновое.

Для определения растворимости исследуемой субстанции кемантана, а также возможных примесей, были использованы следующие растворители: вода очищенная, спирт этиловый 95%, метанол (для ВЭЖХ, «Lab-Scan», Польша), диэтиловый эфир (ч.д.а.), этилацетат (х.ч.), хлороформ (х.ч.), бензол (х.ч.), толуол (ч.д.а.), диметилформаид (х.ч.), изопропиловый спирт (х.ч.), ацетон (ос.ч.), диоксан (ч.д.а.), н-гексан (х.ч.), уксусная кислота ледяная (х.ч.), диметилсульфоксид (экстра чистый по Ph Eur, USP. SU01511000 «Scharlau», Испания), 25 % раствор аммиака (ч.д.а.), растворы хлористоводородной кислоты и натрия гидроксида готовили из стандарт-титров (ОАО «Химтитры», РФ).

Температуру плавления определяли на приборах ПТП Клинского стекольного завода и Opti Melt MPA 100 (Stanford Research Systems, США).

Для определения рН растворов и потенциометрического титрования были использованы иономер ЭВ-74 (Гомель, СССР) и рН-метр Seven-easy S20 фирмы «Mettler Toledo», Швейцария.

Изучение потери в массе при высушивании проводили в сушильном шкафу фирмы Binder марки FD 53 E2, Германия и в сушильном шкафу фирмы «Jouan» тип EU18, Франция. Взвешивание производили на электронных аналитических весах, AB204-S/FACT фирмы «Mettler Toledo», Швейцария.

Для изучения спектральных свойств субстанции использовали УФ-спектрофотометр UV-1700 фирмы “Shimadzu”, Япония. Реактивы: хлороформ (х.ч.), вода очищенная, спирт этиловый 95%, растворы хлористоводородной кислоты и натрия гидроксида готовили из стандарт-титров (ОАО «Химтитры», РФ).

ИК-спектры в средней области были сняты сотрудниками лаборатории химии пищевых продуктов ФГБУ «НИИ питания», руководитель лаборатории – д.б.н. Бессонов В.В.. ИК-спектроскопия в диапазоне $4000-400\text{ см}^{-1}$ в дисках с калия бромидом и методом нарушенного полного внутреннего отражения (МНПВО) проводилась на однолучевом ИК-Фурье-спектрометре «BrukerTensor 27» (ФРГ) с валидированным программным обеспечением «OPUS-NT», приставкой для снятия ИК-спектра МНПВО - PIKE MIRacle с германиевым кристаллом (США).

ИК-спектры в ближней области были сняты сотрудниками московской лаборатории контроля качества лекарственных средств ФГБУ "ИМЦЭУАОСМП" Росздравнадзора, начальник отдела организации контроля качества лекарственных средств - д.ф.н. Титова А.В. Прибор - ИК-Фурье спектрометр Antaris II фирмы Thermo Electron Corporation (Интертек, США) с оптоволоконным датчиком; разрешение - 8 см^{-1} , количество сканирований 16, область измерения от 4000 до 12500 см^{-1} . Базовая линия была проведена по эталону из тефлона, количество сканирований - 32. Обработка результатов осуществлена посредством применения пакета программ «OMNIC» и «Thermo Scientific TQ Analyst 8». Все оборудование на момент выполнения исследований было аттестовано.

ЯМР¹H - спектры были сняты в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» научным сотрудником Ребеко А. Г. ЯМР¹H-спектры регистрировали в шкале δ , м.д., на спектрометре Bruker AC-250 (Германия) в растворах CDCl₃, используя в качестве внутреннего стандарта тетраметилсилан.

Для количественного определения кемантана в субстанции методом неводного титрования использовали кислоту хлорную 65% (х.ч.), бромфеноловый синий (ч.д.а.), гидроксилламин солянокислый (ч., МРТУ 6-09-4811-67), 1,3-дифенилгуанидин (97%, «Sigma-Aldrich», Германия).

Для хроматографического анализа методом тонкослойной хроматографии применяли готовые пластинки Kieselgel 60 F₂₅₄ («Merck», Германия), органические растворители: спирт этиловый 95%, хлороформ (х.ч.), диоксан (ч.д.а.), гексан (х.ч.).

Хроматографический анализ методом ГЖХ проводили на 2 приборах:

- 1) «Chrom-5» (Чешская Республика); детектор - ПИД; программное обеспечение – «Экохром» (ООО Прибор, Россия);
- 2) «Varian GC-450» (Нидерланды); детектор - ПИД; автосамплер «Varian CombiPAL Autosampler» (Нидерланды); программное обеспечение – «Galaxie».

Система подачи газов:

-газ-носитель: азот. Баллоны с газом особой чистоты, 2 сорт (99,996%). ГОСТ 9293-74 ОАО «Линде Газ Рус». Параметры: давление – $4,5 \pm 0,5$ бар.

-баллоны с воздухом: поверочный газ нулевой. Марка «Б». ОАО «Линде Газ Рус»/ ООО «НИИ КМ». Параметры: давление – $5 \pm 0,5$ бар.

- система фильтров для очистки газов: Gas Clean Filter System, Varian. Фильтры для очистки от кислорода и влаги: Gas Clean Filter Oxygen (CP17970) и Gas Clean Filter Moisture (CP17971), Agilent, Нидерланды.

-генератор водорода: ГВЧ-12 и ГВЧ-12М1, НПП Химэлектроника, Москва. Параметры: давление – $4,20 \pm 0,15$ атм.

Хроматографическое разделение изучаемых соединений проводили на колонках:

- кварцевая капиллярная колонка “CP-WAX 52CB” длиной 50 м и внутренним диаметром 0,32 мм с нанесенной неподвижной фазой – полиэтиленгликолем (толщина слоя - 1,2 мкм), Varian, Нидерланды;

- кварцевая капиллярная колонка “CP-WAX 52CB” длиной 25 м и внутренним диаметром 0,25 мм с нанесенной неподвижной фазой – полиэтиленгликолем (толщина слоя - 1,2 мкм), Agilent, Нидерланды;

-кварцевая капиллярная колонка «VF-624ms» 60 м x 0,32 мм, с нанесенной неподвижной фазой - 6% цианопропилфенил, 94% диметилполисилоксан (толщина слоя - 1,8 мкм), Varian, Нидерланды;

- кварцевая капиллярная колонка Zebtron «ZB-624» 30 м x 0,53 мм, с нанесенной неподвижной фазой - 6% цианопропилфенил, 94% диметилполисилоксан (толщина слоя – 3,0 мкм), Phenomenex, США;

- кварцевая капиллярная колонка - FactorFour Cappillary Columns VF-5ms длиной 50м и внутренним диаметром 0,32мм, неподвижная фаза - 5% фенил 95% диметилполисилоксан (толщина слоя - 0,40 мкм), Varian, Нидерланды;

-металлическая набивная колонка: Хромосорб W-AW 80/100 меш + 10% Апиезон L+2%КОН, длина – 2,4м; диаметр-2мм, «Хромресурс», РФ;

-металлическая набивная колонка: Хроматон N-AW фр. 0,160-0,200мм + 15% Апиезон L, длина – 2,4м; диаметр – 2мм, «Хромресурс», РФ.

Для хроматографического анализа методом ГЖХ использовали: воду очищенную и бидистиллированную, спирт этиловый 95%, метанол (для ВЭЖХ), ацетон (х.ч.). В качестве свидетелей использовали стандарты: гексан, четыреххлористый углерод, дихлорэтан, хлороформ, толуол, ацетон, метанол, бензол, этанол (ампулы по 5 мл, х.ч. для хроматографии, ООО «Хромресурс» и ООО «ХромЛаб», РФ).

Разработку теста «Растворение» проводили на приборе «Pharma Test DT 70» («Vitek», Германия), тип «Лопастная мешалка».

Распадаемость таблеток проверяли на приборе «качающаяся корзинка» (сер. №14 455, «PHARMA TEST», Германия).

Для анализа проб применяли специальные виалы для хроматографии вместимостью 2 мл с навинчивающимися крышками с септами (материал - PTFE/sil). Для метода парофазной ГЖХ применяли виалы на 20 мл, магнитные крышки с септами из материала PTFE («Agilent Technologies» серия «CrossLab», США).

Изучение фармакопейных показателей качества субстанции и лекарственной формы кемантана, а также разработку методик анализа проводили в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи СССР XI издания вып. 1 и 2, Государственной Фармакопеи РФ XII издания, часть 1 и в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00 [21, 24, 25, 73].

Изучение стабильности лекарственных форм проводили в соответствии с требованиями инструкции «Временная инструкция по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода «ускоренного старения» при повышенной температуре» И 42-8-82, Минздрав СССР, Москва [19].

Статистическая обработка результатов анализов проведена в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи XI издания, вып. 1, стр.199 и по пособию К. Дёрффеля: «Статистика в аналитической химии» [24, 28].

Поскольку на данный момент в действующей на территории РФ Государственной фармакопее отсутствует статья по валидации аналитических методик, в своей работе мы руководствовались основными документами, применяемыми как в лабораториях, так и на производстве. К таковым источникам относятся: руководства международной конференции по гармонизации [124], общие фармакопейные статьи Европейской фармакопеи [110] и Фармакопеи США [148], а также руководства по валидации: «Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств» под редакцией Н.В.Юргеля [66] и «Валидация аналитических методик для производителей лекарств» под ред. В.В.Береговых [16].

Использованные формулы для расчета основных хроматографических параметров.

Параметры пригодности хроматографической системы рассчитывались по следующим формулам:

$$N=16x(Rt_i/W_i)^2, \quad (5)$$

где N – число теоретических тарелок;

Rt_i – время удерживания i -го компонента в смеси;

W_i – ширина пика i -го компонента у основания;

$$As=W_{0,05} / (2f), \quad (6)$$

где As – фактор асимметрии пика (хвостовой фактор);

$W_{0,05}$ – ширина пика на 5 % (1/20) его высоты;

f – расстояние между перпендикуляром, опущенным из вершины пика, и восходящей стороной пика на 5 % его высоты.

$$RSD = 100 * [\sum (x_i - x_{cp.})^2 / (n-1)]^{1/2} / x_{cp.}, \quad (7)$$

где RSD – относительное стандартное отклонение площади пика;

x_i – результат единичного определения;

$x_{cp.}$ – среднее результатов определений;

n – число определений.

$$RRT = RT_1/RT_2, \quad (8)$$

где RRT – относительное время удерживания;

RT_1 – время удерживания компонента 1;

RT_2 – время удерживания компонента 2.

$$Rs=2 \times (t_2-t_1)/(W_1+W_2), \quad (9)$$

где Rs – разрешение между пиками двух соседних компонентов смеси;

t_1 и t_2 - времена удерживания пика 1 и 2 соответственно;

W_1 и W_2 – ширина пика 1 и 2 соответственно у основания.

ГЛАВА 3. Постадийный контроль производства субстанции кемантана

Процесс производства лекарственного средства осуществляется строго по разработанному лабораторному регламенту [26]. С целью получения фармацевтической субстанции с минимальными потерями необходимо иметь комплекс аналитических процедур, позволяющих контролировать поэтапно процесс производства и гарантирующих получение четких и достоверных результатов анализа. Данный комплекс должен включать методики анализа исходного сырья, промежуточных и конечных продуктов производства [62]. К применяемым методам предъявляется целый ряд требований: они должны быть экспрессными, точными, ресурсосберегающими и т.д. [26, 61, 62].

В Главе 1 уже были рассмотрены основные этапы синтеза и контроля производства кемантана согласно лабораторному регламенту, разработанному ранее в ФГБНУ «НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова».

Для оптимизации условий проведения синтеза перед нами были поставлены следующие задачи:

- 1) провести оценку качества исходного сырья;
- 2) осуществить аналитический контроль на стадиях синтеза:
 - определить конец реакции,
 - определить конец отгонки адамантан-2-она из кислой водной массы,
 - определить полноту экстракции кемантана из «водного слоя»;
- 3) оценить качество технического продукта;
- 4) оценить качество очищенного продукта.

С целью решения данных задач предполагалось воспроизвести ранее созданные в аналитической группе ОТО, а также разработать новые современные методики постадийного контроля производства.

3.1. Контроль качества исходного сырья

Исходным сырьем в синтезе 5-гидроксиадамantan-2-она (кемантана)

является адамантан-2-он, а также серная и азотная концентрированные кислоты.

3.1.1. Анализ адамантан-2-она

Для синтеза кемантана использовали адамантан-2-он (99,8%), приобретенный в АО «Олайнский химико-фармацевтический завод», Латвия. Контроль качества адамантан-2-она не проводился. Сертификат качества производителя на адамантан-2-он представлен в Приложении А.

3.1.2. Анализ концентрированных кислот

Анализ концентрированных кислот проводили в соответствии с разработанными ранее методиками и нормами (см. Главу 1).

3.1.2.1. Анализ азотной кислоты (определение процентного содержания)

Результаты количественного анализа образцов азотной кислоты, применяемых в синтезе субстанции кемантана по усовершенствованному способу, представлены в Таблице 7. Для синтеза кемантана применяли кислоту азотную с содержанием от 63 до 70 %.

Таблица 7

Результаты анализа количественного содержания азотной кислоты, %

№ образца	I	II	III	IV	V
Норма по НТД	63-70 %				
процентное содержание азотной кислоты, %	63	67	68	66	70

3.1.2.2. Анализ серной кислоты (определение процентного содержания)

Результаты количественного анализа образцов серной кислоты представлены в Таблице 8. Для синтеза кемантана применяли кислоту серную с содержанием от 93,56 до 95,68 %.

Таблица 8

Результаты анализа количественного содержания серной кислоты, в %

№ образца	I	II
Норма по НТД	93,56-95,68%	
процентное содержание серной кислоты, %	94,78%	94,89%

3.1.2.3. Анализ смеси азотной и серной кислот

Для синтеза кемамантана применяли смесь кислот с содержанием серной кислоты от 79% до 85%, азотной – от 6,5% до 12%. Результаты количественного анализа образцов представлены в Таблице 9.

Таблица 9

Результаты определения массовой доли кислот

Образец №	Серная, %	Азотная, %
норма	79-85	6,5-12
147	84,32	6,51
727	84,39	7,93

3.2. Аналитический контроль на стадии получения кемамантана

3.2.1. Анализ реакционной массы на конец реакции

Анализ проведен по разработанной ранее методике (см. Главу 1). Концом реакции считали такой состав реакционной массы, при котором относительное содержание кемамантана составляло не менее 80 % (см. Таблицу 10).

Таблица 10

Результаты анализа реакционной массы на конец реакции

Содержание, % / № пробы	Адамантан-2-он	Адамантан-2,6-дион	Кемамантан
1	8,0	10,0	82,0
2	8,0	12,0	80,0
3	8,2	10,3	81,5

3.2.2. Определение конца отгонки адамантан-2-она из кислой водной массы

Анализ проведен по разработанной ранее методике (см. Главу 1). По размеру и интенсивности пятен относительно соответствующих параметров пятна свидетеля (адамантан-2-она) судили о содержании данной примеси в хлороформных извлечениях из кубового остатка. Содержание адамантан-2-она не превышало допустимое значение - 0,05 мг/мл.

3.2.3. Определение полноты экстракции кемамантана из «водного слоя»

Анализ проведен по разработанной ранее методике (см. Главу 1).

Результаты представлены в Таблице 11.

Таблица 11

Определение полноты экстракции кемантана из «водного слоя»

№ опыта	01	04	735	151
Норма				
содержание кемантана в «водном слое» составляет менее 0,05 мг/мл.	Содержание кемантана в «водном слое» составляет менее 0,05 мг/мл. Экстракция прошла полностью			Содержание кемантана в «водном слое» составляет более 0,05 мг/мл. Экстракция прошла не полностью.

Согласно полученным данным, кубовой остаток (опыт 151) с превышением в нем допустимого содержания кемантана отправили на повторную экстракцию. В остальных опытах считалось, что экстракция была проведена полностью.

3.2.4. Анализ технического кемантана

Анализ технического кемантана ранее было предложено проводить по трем показателям (см. Главу 1): содержание адамантан-2-она и адамантан-2,6-диона (ТСХ, не более 0,5% и не более 10%, соответственно), содержание комплексов с азотной кислотой (отсутствие), содержание кемантана (ГЖХ, 88 – 95%). Технической считалась субстанция, полученная до очистки путем кристаллизации из четыреххлористого углерода.

3.2.4.1. Метод тонкослойной хроматографии

Анализ проведен по разработанной ранее методике (см. Главу 1). Результаты представлены в Таблице 12.

Таблица 12

Результаты анализа содержания примесей в технических образцах субстанции кемантана, полученных до стадии очистки

№ образца	Норма	01г	149г	731г	734г	151г	04 г
Содержание адамантан-2-она, %	не более 0,5	Отсутствует					
Содержание адамантан-2,6-диона, %	не более 10,0	более 5,0	более 5,0	≈ 5,0	более 10,0	≈ 10,0	менее 5,0

3.2.4.2. Нитриты / нитраты

Синтез кемаманта предусматривает применение концентрированных серной и азотной кислот [35]. С азотной кислотой 5-гидроксиадамман-2-он образует устойчивые комплексы, которые разлагают путем кипячения реакционной массы в присутствии инертных носителей. В связи с этим в проект ФСП ранее был включен раздел по определению показателя «нитриты/нитраты». Определение осуществляли посредством проведения реакции с раствором дифениламина – реакция А, стр. 163, ГФ XI, вып.1. Появление синего окрашивания свидетельствовало о наличии нитратов / нитритов. Минимально определяемое количество нитрит-/ нитрат-ионов составляет 1 мкг.

При проверке технических образцов кемаманта по показателю «нитриты и нитраты» было обнаружено, что в навеске 0,5 г некоторые образцы дают синее окрашивание, в то время как при навеске 0,1 г нитриты и нитраты обнаружены не были, т.е. их содержание не превышало 0,001%. Согласно полученным данным по чувствительности реакции, было принято брать навеску образца – 0,5 г.

На основании данных литературы, а также экспериментально полученных данных, установлено, что кемамант не образует с серной кислотой устойчивых комплексов. Все образцы, использованные далее для стадии кристаллизации из органических растворителей, не имели синего окрашивания по реакции с раствором дифениламина (см. Главу 1).

Количественное определение кемаманта на данном этапе не проводили, контроль этого показателя был осуществлен после кристаллизации субстанции из четыреххлористого углерода.

3.3. Анализ субстанции кемаманта после кристаллизации из четыреххлористого углерода

Ранее эта стадия анализа была последней, и анализ готового продукта предлагалось проводить по проекту ВФС (см. Главу 1).

В разработанный ранее проект ВФС не были включены спектральные методы, в связи с чем перед нами стояла задача изучения спектральных

характеристик субстанции и возможности их применения в контроле ее качества.

Кроме того, для контроля чистоты субстанции использовался метод ТСХ, несмотря на то, что разделение основных технологических примесей было достигнуто с помощью метода ГЖХ-ПВД на набивных колонках (см. Главу 1, контроль производства субстанции, п. 1.6). Из-за таких преимуществ метода ГЖХ как высокая правильность и специфичность нами было принято решение изучить возможность его применения в анализе субстанции кемантана.

Кроме того, в проект ВФС не было включено определение остаточных растворителей. Поскольку на последней технологической стадии процесса производства субстанции кемантана используется четыреххлористый углерод, определение этого растворителя в субстанции является необходимым. Соответственно, нашей задачей являлась также разработка методики определения остаточных растворителей в субстанции кемантана.

3.3.1. Внешний вид

Субстанцию кемантана, кристаллизованную из четыреххлористого углерода, по внешнему виду можно охарактеризовать как белый или почти белый кристаллический порошок.

3.3.2. Растворимость

Оценку показателя «растворимость» проводили по методике ГФ XII, вып. 1, стр. 92. Нами была определена растворимость в различных растворителях как субстанции кемантана, так и свидетелей его технологических примесей. Результаты представлены в Таблице 13.

Все образцы субстанции кемантана, полученные после кристаллизации из четыреххлористого углерода, легко растворимы с образованием прозрачных растворов в воде, спирте этиловом 95%, хлороформе.

Таблица 13

Данные по растворимости кемантана и его технологических примесей в различных растворителях

Растворитель	Кемантан (1г в ...мл)	Категория растворимости	Адамантан- 2,6-дион (1г в ...мл)	Категория растворимости	Адамантан-2-он (1г в ...мл)	Категория растворимости
Вода очищенная	1:3 - 1:8	легко растворим	1:30	умеренно растворим	1:10 000 и выше	практически нерастворим
Этанол (95%)	1:2	легко растворим	1:14 - 1:15	растворим	1:9 - 1:10	легко растворим
Хлороформ	1:1 – 1:2	легко растворим	1:2	легко растворим	1:2 - 1:3	легко растворим
Толуол	1:100	мало растворим	1:6 - 1:7	легко растворим	1:50 - 1:60	умеренно растворим
0,1 М HCl	1:3 - 1:4	легко растворим	1:50	умеренно растворим	1: до 10 000	очень мало растворим
0,1 М NaOH	1:15 - 1:20	растворим	1:80	умеренно растворим	1: до 10 000	очень мало растворим
DMFA	1:2	легко растворим	1:5	легко растворим	1:8	легко растворим
Изопропиловы й спирт	1:4	легко растворим	1:25	растворим	1:10 - 1:11	растворим
Ацетон	1:4	легко растворим	1:6	легко растворим	1:5 - 1:6	легко растворим
Диоксан	1:4	легко растворим	1:6 - 1:8	легко растворим	1:6	легко растворим
Гексан	1:10000 и выше	практически нерастворим	1: 1000	мало растворим	1:28	умеренно растворим
ЛУК	1:4	легко растворим	1:6 - 1:8	легко растворим	1:6	легко растворим
DMCO	1:3	легко растворим	1:4 - 1:5	легко растворим	1:25	растворим
NH ₃ OH*H ₂ O	1:80	умеренно растворим	1:100	мало растворим	1:100 и выше	мало растворим

3.3.3. Определение прозрачности и цветности растворов субстанции кемантана

Прозрачность, степень мутности и окраску полученных растворов определяли по методике ГФ XII, ч. 1, стр. 93 и стр. 98.

Аналізу подвергали 2% водный раствор субстанции кемантана (200 мг субстанции в 10 мл воды очищенной).

Из данных, представленных в Таблице 14, видно, что по показателю «Прозрачность» все растворы в воде были прозрачными или по мутности не превышали эталон I, а по показателю «Цветность» - бесцветными.

Таблица 14

Результаты определения прозрачности и цветности 2% растворов субстанции кемантана в воде очищенной

№ опыта	1	4	28	30	117	146	148	149	162	709
Показатель										
прозрачность	прозрачный									менее I эталона
цветность	бесцветный									бесцветный
№ опыта	724	725	729	730	732	737	738	744	745	746
Показатель										
прозрачность	прозрачный									
цветность	бесцветный									

3.3.4. Определение pH растворов субстанции кемантана

Значение pH определяли потенциометрически для 2% растворов субстанции в воде (200 мг субстанции в 10 мл воды очищенной) (ГФ XII, с.85). Результаты определения представлены в Таблице 15.

Таблица 15

Результаты определения pH 2% водных растворов субстанции кемантана

№ опыта	1	4	28	30	117	146	148	149	162	709
pH	6,66	6,75	6,55	6,10	4,65	6,15	5,35	6,53	6,12	6,39
№ опыта	724	725	729	730	732	737	738	744	745	746
pH	6,21	4,95	6,16	6,25	6,75	6,20	6,23	6,55	6,75	6,78

Как видно из таблицы, значения pH 2% растворов субстанции в воде лежали в пределах интервала от 4,6 до 6,8.

3.3.5. Спектральные характеристики субстанции кемантана

Нами были изучены спектральные характеристики субстанции кемантана методами ИК-, УФ- и ЯМР-спектроскопии.

Следует отметить, что в электронной библиотеке спектров имеются данные по субстанции 5-гидроксиадамantan-2-она для методов ИК- и ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии [144].

Нами были впервые получены и математически обработаны спектры в ближней ИК-области, создана библиотека спектров субстанции кемантана, синтезированной по способу, разработанному в НИИ фармакологии [35].

3.3.5.1. Спектроскопия в инфракрасной области

3.3.5.1.1. ИК-спектроскопия в средней области спектра

Были зарегистрированы ИК-спектры пропускания субстанции кемантана, кристаллизованной из четыреххлористого углерода, в дисках (таблетках) с калия бромидом (Рисунки 9, 10), а также спектры внутреннего отражения, полученные с помощью МНПВО (Рисунки 11, 12). Исследования проведены в диапазоне частот излучения $4000-400 \text{ см}^{-1}$ [90].

Для снятия спектров пропускания проба смешивалась с бромидом калия в соотношении 1:200, после чего прессовалась таблетка, с которой снимался спектр пропускания, фон регистрировался без таблетки.

Полученные ИК-спектры пропускания в дисках с калия бромидом аналогичны НПВО-спектрам образцов технической субстанции кемантана. В спектрах кемантана присутствуют следующие характеристические полосы (см^{-1}): 3404-3399 – полоса валентных связанных колебаний вторичной спиртовой группы О-Н (3413), 2923 (2927) и 2855 (2856) – полосы валентных колебаний метиленовых групп (С-Н) адамантанового цикла, 1725-1707 – полоса валентных колебаний карбонильной группы (С=О), 1451 и 1351 – деформационные колебания С-Н, 1288 и 1115 – деформационные колебания С-О и О-Н.

В спектре, снятом с использованием МНПВО, наблюдалось незначи-

тельное смещение полосы поглощения карбонильной группы (на величину около 18 cm^{-1}) по сравнению со спектром, снятым в дисках с калия бромидом. Отмечена возможность применения обеих методик ИК-спектроскопии в анализе подлинности субстанции кемантана [90].

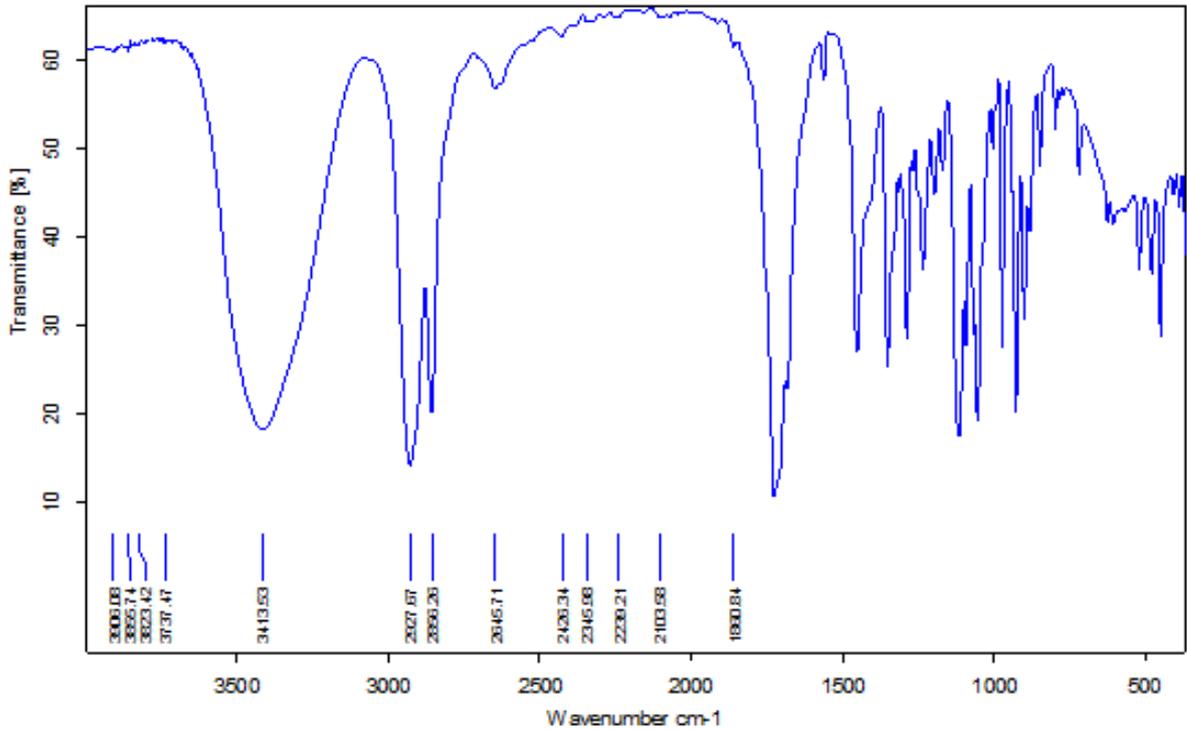


Рисунок 9 - ИК-спектр субстанции кемантана, снятый в дисках KBr (область $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$)

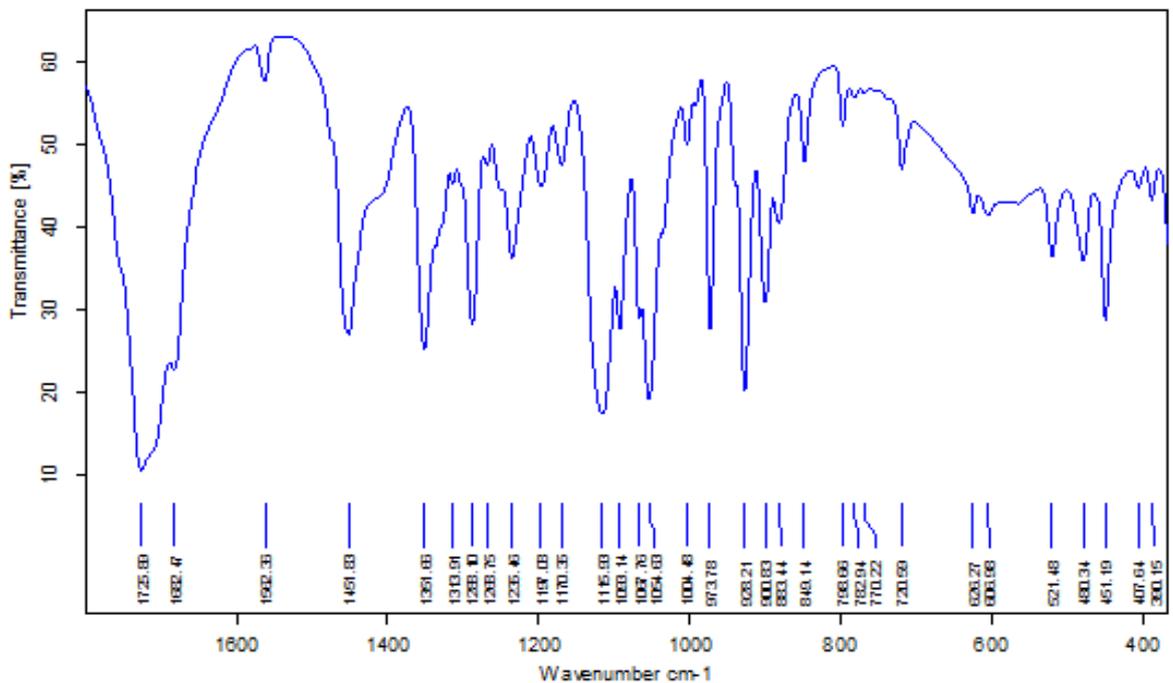


Рисунок 10 - ИК-спектр субстанции кемантана, снятый в дисках KBr (область $1800\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$)

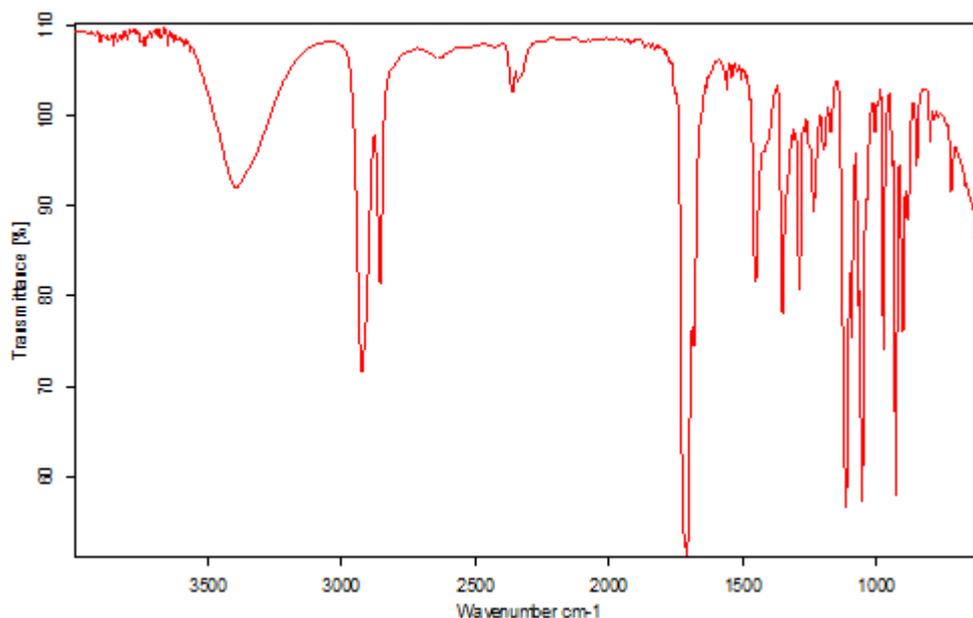


Рисунок 11 - ИК-спектр субстанции кемантана, снятый с приставкой НПВО (область $4000-400\text{ см}^{-1}$)

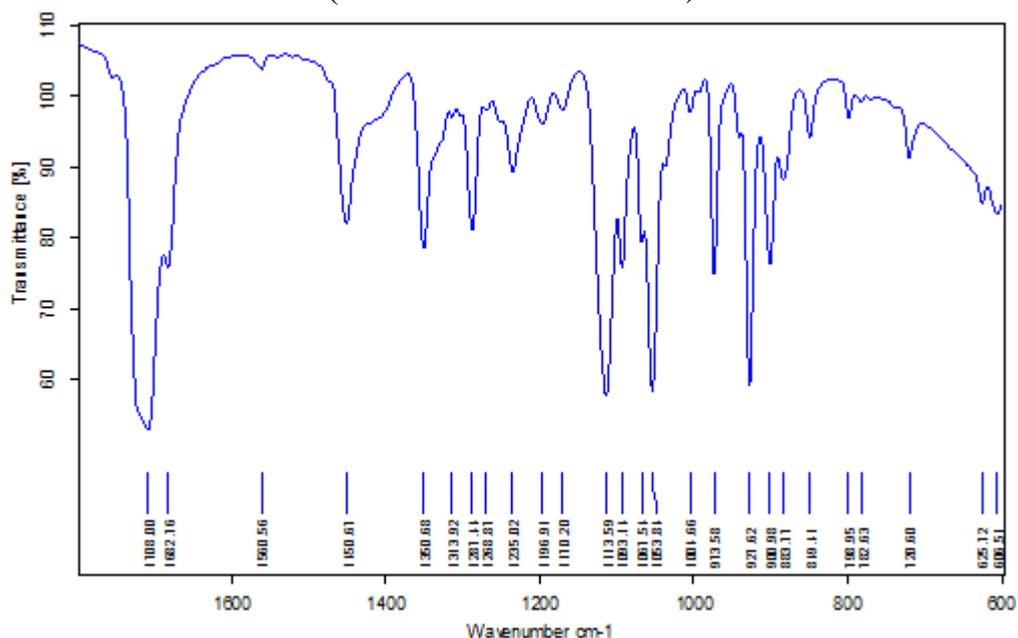


Рисунок 12 - ИК-спектр субстанции кемантана, снятый с приставкой НПВО (область $1800-600\text{ см}^{-1}$)

3.3.5.1.2. ИК-спектроскопия в ближней области спектра

Исследование субстанции кемантана и ее технологических примесей в ближней ИК-области проводилось методом диффузного отражения [89].

Для получения спектров использовался ИК-Фурье спектрометр Antaris II фирмы Thermo Electron Corporation (Интертек, США) с оптоволоконным датчиком; разрешение - 8 см^{-1} , количество сканирований 16, область измерения от 4000 до 12500 см^{-1} . Базовая линия проведена по эталону из тефлона, количество

сканирований - 32. Обработка результатов осуществлена посредством применения пакета программ «TQ Analyst» [89].

Методика анализа субстанции: датчик прижимали плотно к поверхности порошка субстанции в пенициллиновом флаконе и снимали спектр. Анализ проводили не менее пяти раз для каждой пробы, перемешивая её перед каждым измерением.

Визуальная оценка БИК-спектров субстанции кемантана и ее технологических примесей выявила значительные различия по положению и интенсивности некоторых полос: в области от 4500 до 7500 см^{-1} , от 8400 до 9000 см^{-1} . В тоже время отмечено совпадение полос поглощения в области от 4000 до 4500 см^{-1} , от 8000 до 8400 см^{-1} и от 10500 до 11500 см^{-1} (Рисунок 13).

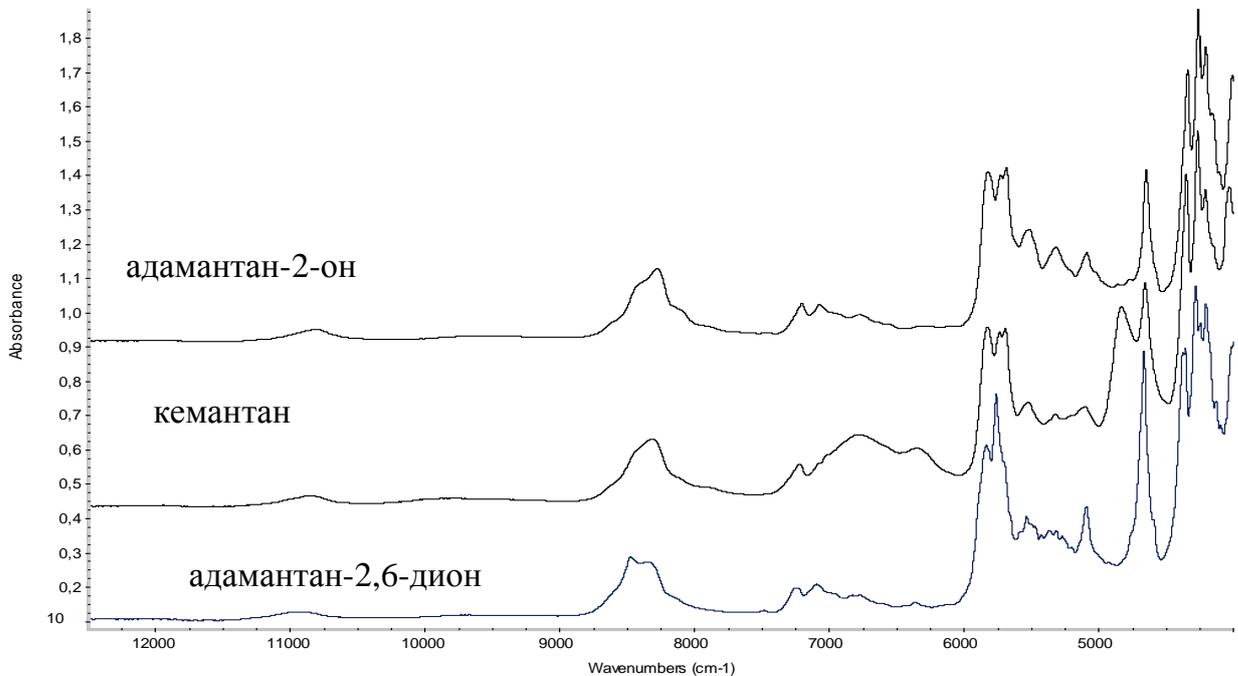


Рисунок 13 - БИК-спектры образцов субстанций

Дальнейшие исследования были проведены на 10 сериях субстанции кемантана, кристаллизованной из четыреххлористого углерода, с различным содержанием посторонних примесей (адамантан-2-она и адаммантан-2,6-диона). 8 образцов получены в опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» по приведенной ранее схеме (I) и 2 образца синтезированы иным способом (II) (см. Таблицу 17).

Перед нами стояла задача изучить, возможно ли с помощью БИК-спектроскопии выявить различия между образцами субстанции кемантана, синтезированными различными способами, а также между образцами субстанции различной степени чистоты.

Методика проведения анализа описана выше. Обработку результатов проводили хемометрическим методом с помощью программы «Thermo Scientific TQ Analyst 8». Обработка БИК-спектров происходит на основе сочетания спектроскопии и статистического метода анализа многофакторных зависимостей.

Взятые на анализ субстанции кемантана отличались по чистоте. Во всех образцах предварительно оценивали содержание примесей методом газожидкостной хроматографии. Методика контроля посторонних примесей в субстанции кемантана подробно описана далее (Глава 3, стр. 96). Данные по чистоте образцов субстанции кемантана представлены в Таблице 16.

Таблица 16

Содержание посторонних примесей в субстанции кемантана

№ Серии образца	Способ синтеза	Примеси, %		Анализ
		адамантан-2,6-дион	адамантан-2-он	
1	I	1,01	-	к/м*
2	I	1,36	-	к/м
3	I	1,37	-	к/м
4	I	2,96	-	к/м
5	II	-	0,45	к/м
6	I	2,54	-	соответствует
7	I	3,02	-	соответствует
8	I	9,64	-	не соответствует
9	I	50,20	9,98	не соответствует
10	II	17,99	-	не соответствует

*к/м - калибровочная модель

Спектры первых пяти серий субстанции кемантана (из Таблицы 16) были использованы для построения калибровочной модели. Содержание адамантан-2,6-диона в данных образцах не превышало 3,0%, а адамантан-2-она – 0,5 %. Калибровочную модель строили следующим образом: спектры каждой серии субстанции рассматривали как отдельный класс, т.е. калибровочная модель состояла из 5 классов. Посредством метода дискриминантного анализа спектральные данные были математически преобразованы и спроецированы на

плоскости в виде двумерного графика в координатах Махаланобиса. Для оценки результатов мы придерживались принятых в литературе параметров, где единица расстояния Махаланобиса рассматривается как величина, равная стандартному отклонению, а в качестве теоретических границ принадлежности к группе – расстояние в три стандартных отклонения от среднего, т.е. в 3 единицы Махаланобиса. Каждая точка на полученной плоскости соответствовала отдельному спектру каждой из представленных серий субстанции. В результате обработки спектров были получены значения парных расстояний между классами (сериями) субстанции кемантана, выраженные в единицах Махаланобиса при доверительной вероятности 95 %. Данный подход позволил выявить максимальные спектральные различия между сериями субстанции кемантана и провести ранжирование классов: чем ближе полученное значение к 0, тем выше спектральное соответствие.

Как видно из рисунка 14 и Таблицы 17, в результате хемометрической обработки спектров посредством применения дискриминантного анализа были получены 2 дискриминантные группы, объединяющие серии субстанции кемантана по способу синтеза. Группа I включала серии с 1 по 4 субстанции кемантана: расстояние Махаланобиса во всех случаях не превышало 3σ (критическое расстояние Махаланобиса – 3σ при вероятности 95%). II группа включала только серию 5, синтезированную иным способом.

В ходе исследования был проведен эксперимент по идентификации нескольких образцов субстанции кемантана с различным содержанием посторонних примесей (образцы 6-10 из Таблицы 16). Были получены БИК-спектры приведенных субстанций (Рисунок 15). В спектрах субстанций обнаружены характерные полосы поглощения: в области $4000-4500\text{см}^{-1}$, $4700-5000\text{см}^{-1}$, $5700-6000\text{см}^{-1}$, $7800-9000\text{см}^{-1}$. Однако предварительная визуальная оценка спектров не выявила значимых различий.

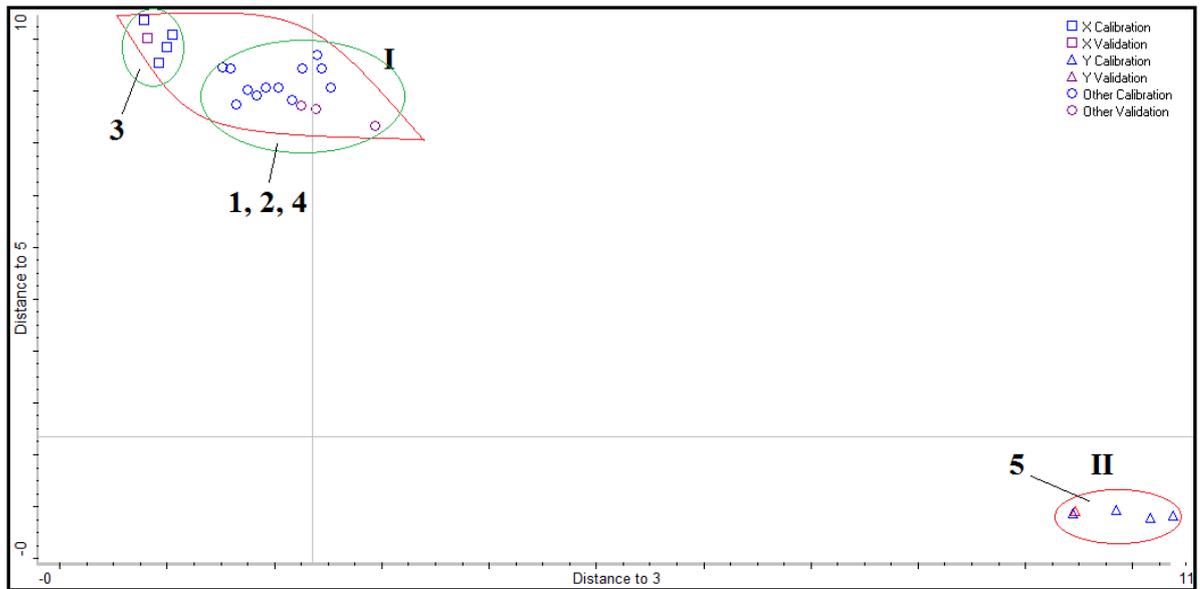


Рисунок 14 - Дискриминантный анализ БИК-спектров субстанции кемантана. I, II – группы, объединяющие серии образцов кемантана по способу синтеза. 1,2,3,4,5 – номера серий субстанции кемантана.

Таблица 17

Максимальные парные расстояния для серий субстанции кемантана

Номер серии	2	3	4	5
1	1,7	3,0	1,8	10,0
2		2,4	1,8	10,0
3			2,6	11,0
4				10,0

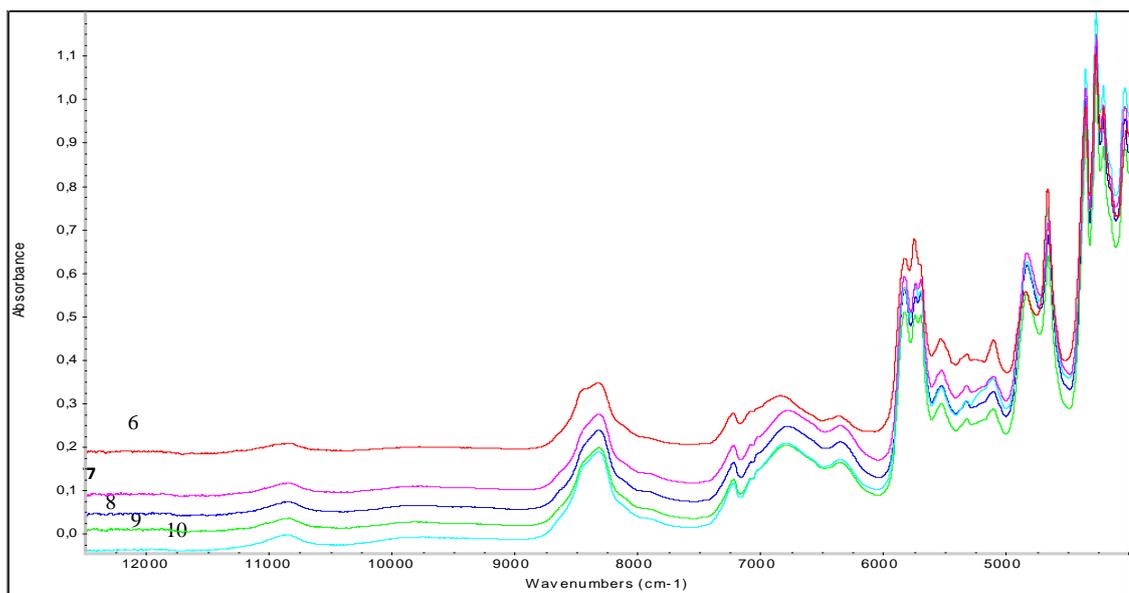


Рисунок - 15 БИК-спектры образцов субстанции кемантана (серии с 6 по 10)

Хемометрическая обработка спектров изучаемых субстанций посредством дискриминантного анализа (ед. Махаланобиса, доверительная вероятность 95 %) выявила статистически значимые различия в спектрах у 3 образцов из пяти: образцы с содержанием адамантан-2,6-диона более 3,00 % не соответствовали по спектральным характеристикам образцам из созданной ранее калибровочной модели (см. выше).

Таким образом, было показано, что с помощью метода БИК-спектроскопии в сочетании с дискриминантным анализом можно точно и быстро установить подлинность субстанции кемантана, различить субстанции кемантана по способу синтеза, провести предварительную оценку чистоты субстанции. Все вышеперечисленное может быть использовано в целях рутинного анализа большого количества образцов при производстве субстанции.

3.3.5.2. Спектроскопия в УФ-области

УФ-спектры субстанции кемантана, кристаллизованной из четыреххлористого углерода, были сняты в воде очищенной, спирте этиловом 95% и в хлороформе в области длин волн от 190 до 350 нм, концентрация испытуемых растворов – 2 мг/мл (0,2%) (Рисунки 16 - 20).

УФ-спектры 0,2 % растворов образцов препарата в воде в области длин волн от 190 до 350 нм имели максимум поглощения при длине волны 285 ± 2 нм и минимум – при 242 ± 1 нм (Рисунки 16 - 18). Также было изучено влияние pH среды на смещение λ_{max} : растворение в 0,1 М HCl (pH = 2,88) и 0,1 М NaOH (pH = 11,48) не привело к значительным изменениям положения максимума/минимума спектра (Рисунки 17 и 18, соответственно).

Данный максимум поглощения, вероятно, можно отнести к $n \rightarrow \pi^*$ переходу с участием несвязывающих электронов (неподеленная пара электронов атома кислорода кето-группы). В пользу этого предположения свидетельствует некоторое смещение этой полосы поглощения (Рисунки 19, 20) в длинноволновую область при изменении растворителя на менее полярный (этанол и хлороформ, соответственно).

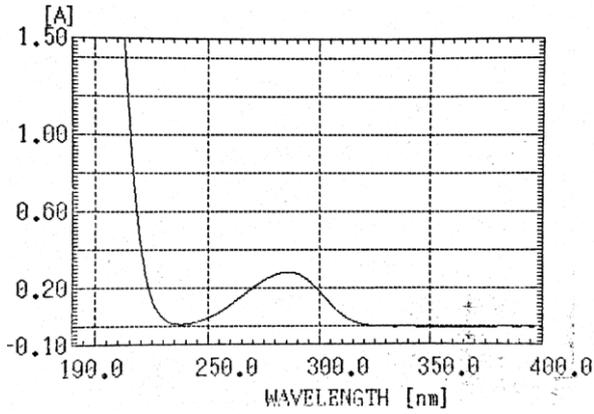


Рисунок 16 - Кемантан в воде – 2,0 мг/мл: $\lambda_{\max}=285,0\pm 2\text{нм}$, $D=0,281$; $\lambda_{\min}=241,0\text{ нм}$, $D=0,057$.

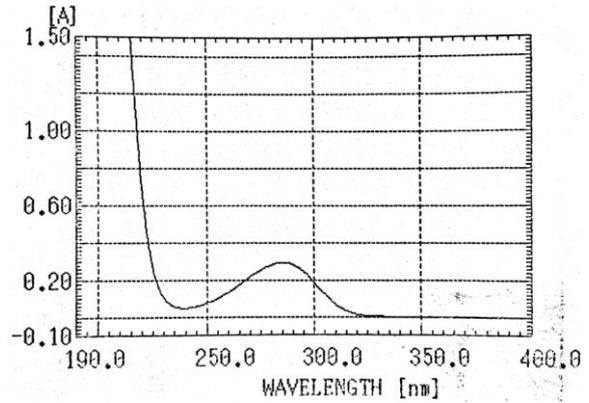


Рисунок 17 - Кемантан в щелочной среде (pH=11,48) - 2,0 мг/мл: $\lambda_{\max}=286,0\text{ нм}$, $D=0,294$; $\lambda_{\min}=243,0\text{ нм}$, $D=0,060$.

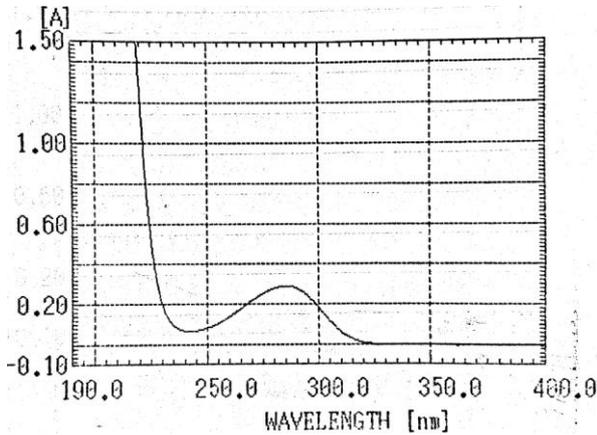


Рисунок 18 - Кемантан в кислой среде (pH=2,88) - 2,0 мг/мл: $\lambda_{\max} = 285,5\text{ нм}$, $D = 0,287$; $\lambda_{\min}=243,0\text{ нм}$, $D = 0,064$.

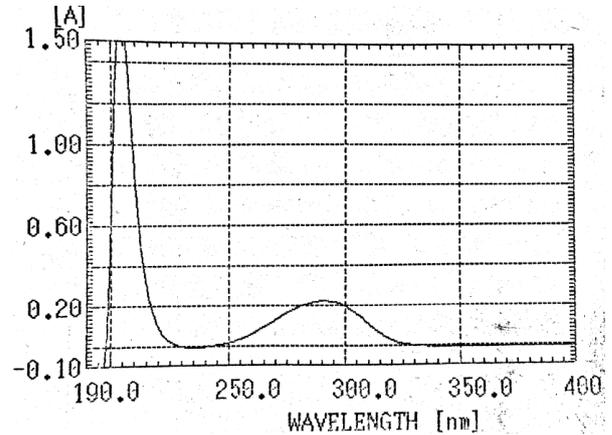


Рисунок 19 - Кемантан в спирте этиловом 95% - 2,0 мг/мл: $\lambda_{\max}=290,5\text{нм}$, $D=0,223$; $\lambda_{\min}=235,0\text{ нм}$, $D= - 0,009$

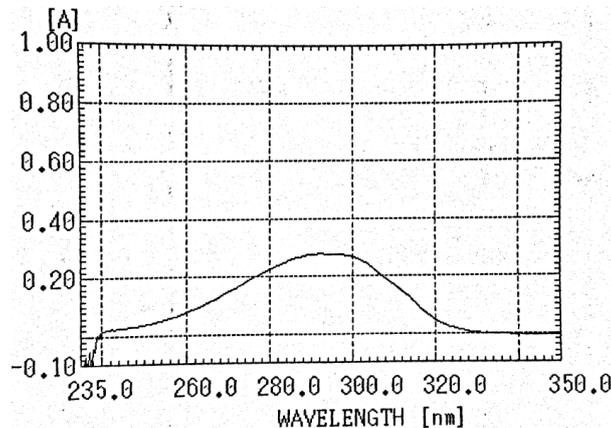


Рисунок 20 - УФ-спектр кемантана в хлороформе – 2,0 мг/мл: $\lambda_{\max} = 292 \pm 1\text{нм}$, $D = 0,279$; $\lambda_{\min} = 343,8\text{ нм}$, $D = -0,005$.

Величина удельного показателя поглощения при длине волны максимума 285 ± 2 нм для растворов кемантана в воде и 0,1 М кислоте хлористоводородной имеет значение около 1,5 (1,405-1,462). Молярный показатель поглощения водного раствора кемантана составляет $24,0 \pm 0,55$.

3.3.6. Посторонние примеси. Контроль чистоты субстанции кемантана

3.3.6.1. Определение посторонних примесей в технической субстанции кемантана методом ТСХ

Исходным продуктом синтеза кемантана является адамантан-2-он, а побочным продуктом – адамантан-2,6-дион. Оба соединения относятся к потенциальным технологическим примесям в конечном продукте.

Для обнаружения вышеописанных соединений в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» была разработана методика контроля чистоты субстанции кемантана методом ТСХ (см. Главу 1) [1, 87].

Мы воспроизвели данную методику на образцах субстанции кемантана, кристаллизованных из четыреххлористого углерода [87].

0,1 г субстанции кемантана растворяли в 5 мл спирта этилового 95%, в котором легко растворяются и технологические примеси (Таблица 14). 0,01 мл (200 мкг) полученного раствора наносили на линию старта пластинки. В качестве свидетелей на пластинку наносили по 5, 10 и 20 мкл (5, 10, 20 мкг) спиртовых растворов адамантан-2,6-диона и 10 мкл (1 мкг) адамантан-2-она, что соответствовало концентрациям примесей: 2,5%, 5%, 10% (адамантан-2,6-дион) и 0,5% (адамантан-2-он).

Пластинку с нанесенными пробами высушивали на воздухе в течение 5 минут, а затем помещали в камеру со смесью растворителей: 25 мл н-гексана и 15 мл диоксана (5:3) и хроматографировали восходящим способом.

Когда фронт растворителей проходил 10 см от линии старта, пластинку вынимали из камеры, сушили на воздухе в течение 5 мин.

Детектирование пятен на хроматограмме проводили смесью раствора 2,4-динитрофенилгидразина в хлористоводородной кислоте и спирте (1:1). При этом

способе детектирования кемантан и примеси образовывали соответствующие гидразоны: адамантан-2-он и адамантан-2,6-дион проявлялись в виде пятен желтого цвета, а кемантан – от желтого до оранжевого, в зависимости от концентрации испытуемого раствора.

Сравнивали R_f и интенсивность пятен на хроматограмме испытуемого образца с соответствующими параметрами пятен веществ-свидетелей. Значение R_f кемантана составляло $0,43 \pm 0,03$, адамантан-2,6-диона – $0,63 \pm 0,03$, адамантан-2-она – $0,89 \pm 0,03$ (Рисунок 21). Предел обнаружения адамантан-2-она – 0,5 мкг, адамантан-2,6-диона – 0,2 мкг [87].

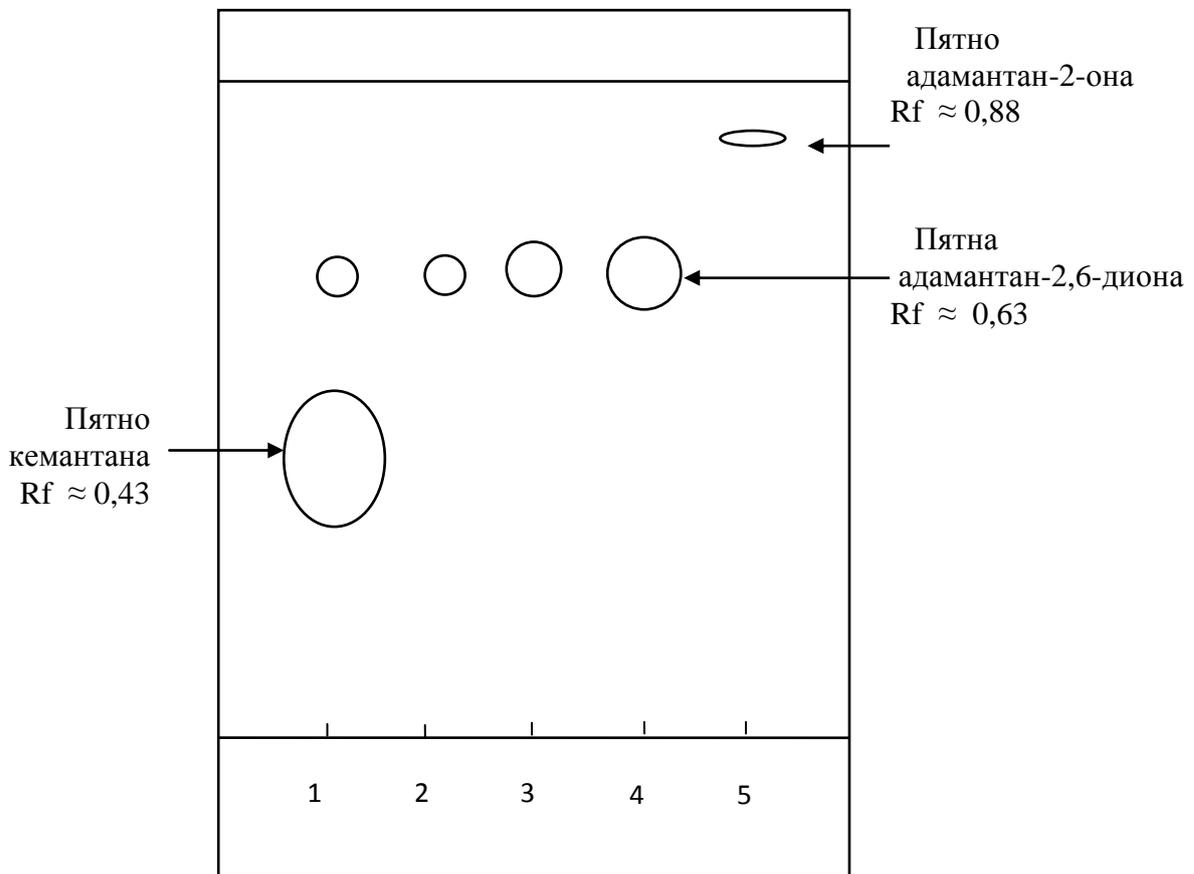


Рисунок 21 - Хроматограмма образца кемантана в системе:
гексан : диоксан (5:3)

1 - образец субстанции кемантана (200 мкг); 2, 3, 4 - свидетель: адамантан-2,6-дион (5, 10, 20 мкг); 5 - свидетель: адамантан-2-он (1 мкг). Детектирование - раствор 2,4-динитрофенилгидразина в хлористоводородной кислоте и спирте (1:1)

Результаты анализа образцов субстанции кемантана после кристаллизации их четыреххлористого углерода, а также образцов технической субстанции, из

которых они были получены (для сравнения), представлены в Таблицах 18 и 19.

Как видно из Таблицы 19, после кристаллизации технического кемантана из четыреххлористого углерода концентрация адамантан-2,6-диона существенно снижается. Содержание адамантан-2,6-диона в образцах субстанции кемантана после очистки путем кристаллизации из четыреххлористого углерода во всех образцах, кроме опыта 149, не превышало 2,5% (ТСХ, полуколичественный метод оценки). При превышении в этих образцах содержания адамантан-2,6-диона значения 5% проводилась повторная кристаллизация из четыреххлористого углерода.

Представленная выше методика определения примесей в субстанции кемантана позволяет достоверно разделить и качественно идентифицировать основные потенциальные технологические примеси: адамантан-2-он и адамантан-2,6-дион.

Однако данная методика является полуколичественной: сравнение по величине и интенсивности пятен в анализируемом образце с аналогичными параметрами пятен веществ-свидетелей с известной концентрацией позволяет приблизительно оценить порядок содержания той или иной примеси. Для получения продукта высокого качества необходимо использовать методики, позволяющие не только быстро, но и с высокой степенью правильности и достоверности давать количественную оценку содержания примесей в анализируемой субстанции.

Таблица 18

Содержание примесей в технической субстанции кемантана до кристаллизации кемантана из четыреххлористого углерода

№ образца	01т	25т	A-2-011т	04т	709т	162т	151т	149т	141т	146 т (получен после 2 ^{ой} очистки образца 141т)	714т	133 т
адамantan-2,6-дион, %	более 5%	более 5%	≈ 5%	менее 5%, но больше 2,5%	≈5%	≈5%	≈10%	менее 10%, но больше 5%	менее 20%, но больше 10%	≈10%	≈10%	менее 10%, но больше 5%
адамantan-2-он, %	отсутствует в образцах								менее 0,5%	отсутствует в образцах		менее 0,5%

Таблица 19

Содержание примесей в технической субстанции кемантана после кристаллизации кемантана из четыреххлористого углерода

№ образца	01	25	A-2-011	04	709	162	151	149	146	715 (получен из образца 714т)	134 (получен из образца 133т)
адамantan-2,6-дион, %	≈2,5%	≈2,5%	менее 2,5%	≈ 2,5%	≈ 2,5%	менее 2,5%	≈2,5%	≈5%	менее 2,5%	≈2,5%	≈2,5%
адамantan-2-он, %	отсутствует в образцах										

3.3.6.2. Разработка и валидация методики количественного определения посторонних примесей в субстанции кемантана методом ГЖХ-ПВД [85]

Метод ГЖХ получил широкое распространение в области анализа производных адамантана. Работы С.В. Курбатовой и К.К. Константиновой посвящены исследованию поведения производных адамантана как сорбатов, так и сорбентов в условиях высокоэффективной газовой хроматографии и изучению взаимосвязи между строением, физико-химическими и сорбционными характеристиками [39, 40, 43-46]. Метод был успешно применен для изучения фармакокинетики кемантана и его активного метаболита – адамантан-1,4-диола у животных [15]. Однако данных по изучению хроматографического разделения кемантана и его технологических примесей, а также их количественной оценки в литературе найдено не было.

Таким образом, основной целью настоящего исследования была разработка новой, специфичной, правильной и надежной методики идентификации и количественного определения примесей в субстанции кемантана с применением метода ГЖХ.

Исследования проводили на технических образцах субстанции кемантана, и образцах, полученных после кристаллизации из четыреххлористого углерода. В качестве свидетелей (возможных технологических примесей в субстанции кемантана) были рассмотрены, наряду с основными, выявляемыми методом ТСХ, другие потенциальные примеси - продукты окисления адамантана: адамантан-1-ол, адамантан-2-ол, адамантан-1,4-диол, адамантан-1,4-диол («цис»-изомер), адамантан-2,6-диол [85].

Для достижения наилучшего разделения исследуемых веществ было протестировано несколько видов капиллярных и набивных колонок с различными типами неподвижных фаз, а именно:

1. кварцевая капиллярная колонка - FactorFour Cappillary Columns VF-5ms (50 м, 0,32 мм, 0,40 мкм), «Varian», Нидерланды;

2. кварцевая капиллярная колонка - FactorFour Cappillary Columns VF-624ms (60 м, 0,32 мм, 1,80 мкм), «Varian», Нидерланды;
3. металлическая набивная колонка: Хромосорб W-AW 80/100 меш + 10% Апиезон L+2%КОН, длина – 2,4м; диаметр-2мм, «Хромресурс», РФ;
4. металлическая набивная колонка: Хроматон N-AW фр. 0,160-0,200 мм + 15% Апиезон L, длина – 2,4м; диаметр – 2мм, «Хромресурс», РФ.

В качестве растворителя для подготовки проб был выбран спирт этиловый 95 %. Все исследуемые соединения легко растворимы в этаноле.

При изучении хроматографического поведения кемантана и его вероятных технологических примесей на колонке №1 не удалось добиться полного разделения пиков кемантана и его основной примеси - адамантан-2,6-диона ни при изменении скорости потока газа-носителя, ни при варьировании температуры термостата: использовали как изотермический, так и градиентный температурные режимы.

На колонке №3 пики кемантана и адамантан-2,6-диона разделились не полностью (разрешение менее 1,5), также невозможно было скорректировать форму пиков анализируемых соединений. Вычисленные факторы асимметрии пиков составляли: кемантан – 1,92, адамантан-2,6-дион - 2,02. Предположили, что вклад в «хвостование» пиков обусловлен ионизацией соединений из-за наличия в составе колонки КОН.

Применение колонки №4 (также с неполярной фазой Апиезон L, но без КОН) способствовало получению пиков анализируемых соединений приемлемой формы (фактор асимметричности был в пределах 1). Полного разделение пиков кемантана и адамантан-2,6-диона добиться не удалось: фактор разрешения не превышал 0,97 (при норме – более 1,5 [16]) (Рисунок 22).

Явным недостатком набивных колонок является их низкая эффективность, выраженная числом теоретических тарелок. Эффективность набивных колонок № 3 и 4 не превышала значения 3700 теоретических тарелок.

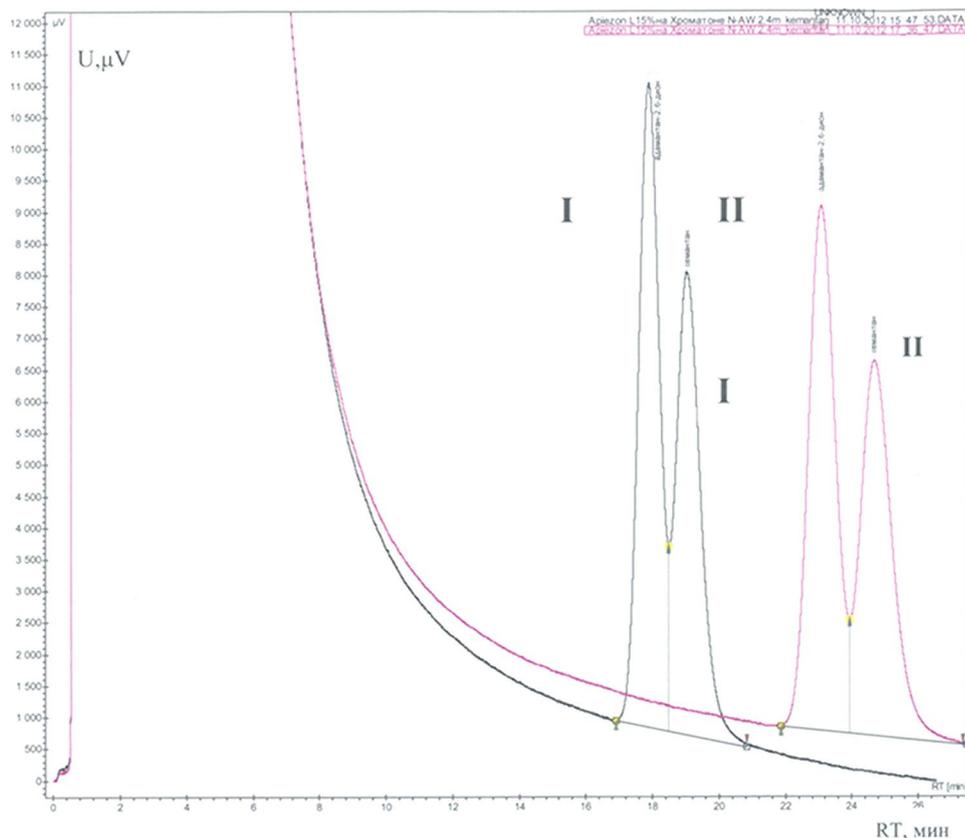


Рисунок 22 - Хроматограмма разделения I - адамантан-2,6-диона и II-кемантана на колонке №4. Черным цветом обозначено разделение при температуре термостата - 180°C, розовым – при 170°C

Удовлетворительных результатов по селективности удалось добиться на колонке №2. В результате проведенных исследований были выбраны следующие условия: кварцевая капиллярная колонка «VF-624ms» 60м, 0,32мм, толщина слоя НФ – 1,8 мкм, температура испарителя - 250°C, термостата - 200°C, детектора - 300°C, газ-носитель – азот, 1,5 мл/мин; детектирование – ПИД, скорость водорода – 30 мл/мин, газа-поддува (азот) - 25 мл/мин, скорость воздуха – 300 мл/мин; объем вводимой пробы – 1 мкл, деление потока (сплит) – 1:20.

Для количественной оценки содержания примесей в субстанции кемантана был предложен метод внутреннего стандарта. Достоинства этого метода состоят в том, что он не требует воспроизводимости пробы по объему и мало зависит от нестабильности работы хроматографа.

Выбор стандарта проводили, руководствуясь следующими требованиями: внутренний стандарт должен иметь схожее с определяемым веществом строение и проявляться на хроматограмме в виде хорошо разрешенного пика.

Были исследованы следующие соединения: нафталин, 1-адамантилэтанол, адамантан. Внутренним стандартом был выбран адамантан. Приведенное соединение имеет близкое с определяемыми веществами строение, в разработанных условиях хроматографирования время его удерживания составляет около $8,17 \pm 0,05$ минут, его пик хорошо отделен от пика кемантана, а также пиков всех потенциальных примесей (Рисунок 23).

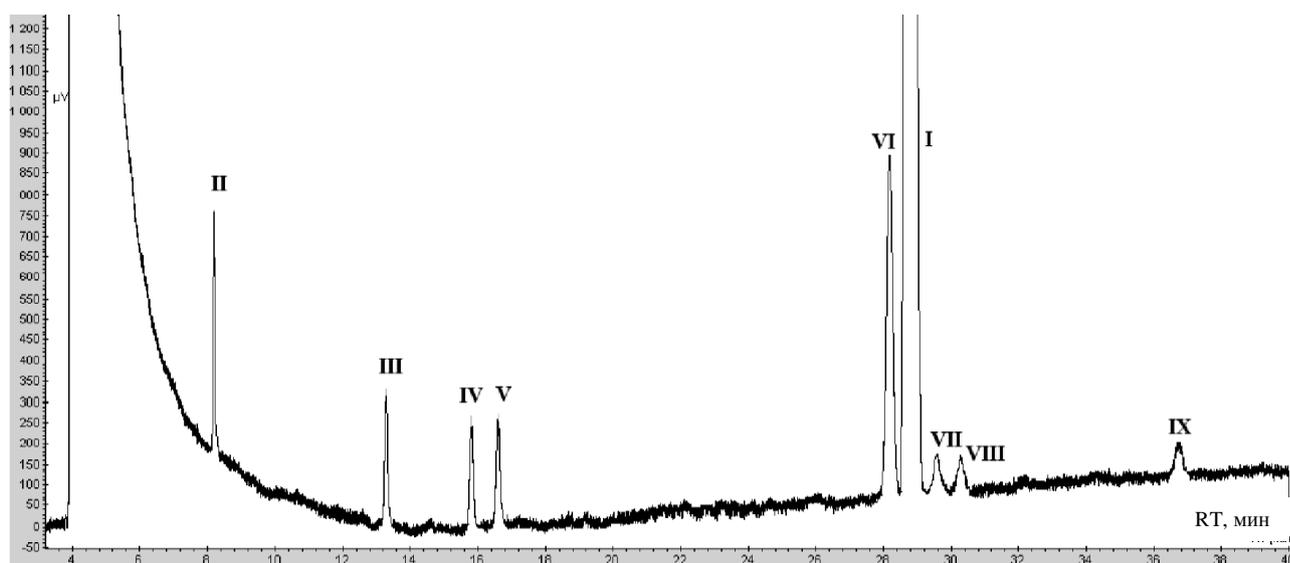


Рисунок 23 - Хроматограмма модельной смеси: I – кемантан, II – адамантан, III – адамантан-1-ол, IV – адамантан-2-ол, V – адамантан-2-он, VI – адамантан-2,6-дион, VII – адамантан-1,4-диол, VIII- адамантан-1,4-диол («цис»-изомер), IX- адамантан-2,6-диол.

Специфичность разработанной методики проверяли на модельной смеси, содержащей все изучаемые вещества, концентрация каждого из соединений – 0,005 мг/мл. Как видно на рисунке 23, разделились пики всех выше указанных соединений. Времена удерживания, пределы обнаружения и параметры разделения исследуемых соединений представлены в Таблице 20.

Для проверки пригодности хроматографической системы готовили модельную смесь кемантана и его основных технологических примесей – адамантан-2-она (см. Приложение А) и адамантан-2,6-диона (синтезирован в ОТО НИИ фармакологии, > 99,0%, ГЖХ), концентрация кемантана составляла 1 мг/мл, адамантан-2-она – 0,005 мг/мл, адамантан-2,6-диона - 0,005 мг/мл.

В Таблице 21 представлены параметры пригодности хроматографической системы.

Времена удерживания, пределы качественного и количественного обнаружения, параметры разделения кемантана и его вероятных примесей

№	Соединение	RT, мин	RRT	Rs	ПО, мкг	ПКО, мкг
1	адамantan	8,17±0,05	0,280±0,005	-	0,0005	0,0010
2	адамantan-1-ол	13,23±0,04	0,460±0,002	39,58±2,27	0,001	0,005
3	адамantan-2-ол	15,76±0,06	0,549±0,001	14,21±0,63	0,001	0,005
4	адамantan-2-он	16,54±0,07	0,576±0,003	3,79 ± 0,56	0,001	0,005
5	адамantan-2,6-дион	28,06±0,13	0,977±0,002	41,03±4,13	0,002	0,005
6	кемантан	28,70±0,12	1,00	1,83 ± 0,02	0,002	0,005
7	адамantan-1,4-диол	29,45±0,10	1,026±0,001	2,28 ± 0,26	0,002	0,01
8	адамantan-1,4-диол («цис»-изомер)	30,15±0,08	1,050±0,002	2,48 ± 0,76	0,002	0,01
9	адамantan-2,6-диол	36,62± 0,15	1,276±0,001	15,16±0,26	0,002	0,01

RT - время удерживания; RRT - относительное время удерживания; Rs – разрешение между соседними пиками; ПО – предел обнаружения; ПКО – предел количественного определения.

Таблица 21

Значения параметров пригодности хроматографической системы

Соединение	Параметры пригодности хроматографической системы			
	N	As	RSD	Rs
1.Адамantan-2-он	101800± 17200	0,97 ± 0,10	3,34%	-
2.Адамantan-2,6-дион	111300 ± 1100	1,02 ± 0,01	0,92%	(1 и 2) 41,03±4,13
3.Кемантан	111050 ± 4750	0,97 ± 0,03	2,17%	(2 и 3) 1,83±0,02
Критерии приемлемости				
1. Адамantan-2-он	не менее 100 000	не более 1,5	не более 4%	(1 и 2) не менее 35,0 (2 и 3) не менее 1,50
2. Адамantan-2,6-дион			не более 2%	
3. Кемантан			---	

N – число теоретических тарелок, As – фактор асимметрии пика, RSD – относительное стандартное отклонение площади пика, Rs – разрешение пар пиков.

На основании представленных в Таблице 21 данных были выбраны следующие критерии пригодности хроматографической системы: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам адамantan-2-она, адамantan-2,6-диона – не менее 100000 теоретических тарелок; фактор асимметрии для адамantan-2-она, адамantan-2,6-диона, кемантана – не более 1,5; относительное стандартное отклонение площадей пиков адамantan-2-она, адамantan-2,6-диона – не более 4% и не более 2% соответственно; разрешение

между пиками адамантан-2-она и адамантан-2,6-диона – не менее 35,0 и между пиками адамантан-2,6-диона и кемантана – не менее 1,50.

Линейная зависимость площадей пиков от концентрации растворов кемантана, его примесей и внутреннего стандарта наблюдалась в интервале от 0,002 до 2 мг/мл (для кемантана) и от 0,001 до 0,5 мг/мл - для примесей; значения коэффициентов корреляции составляли более 0,997 (Рисунки 24, 25). S, ед.

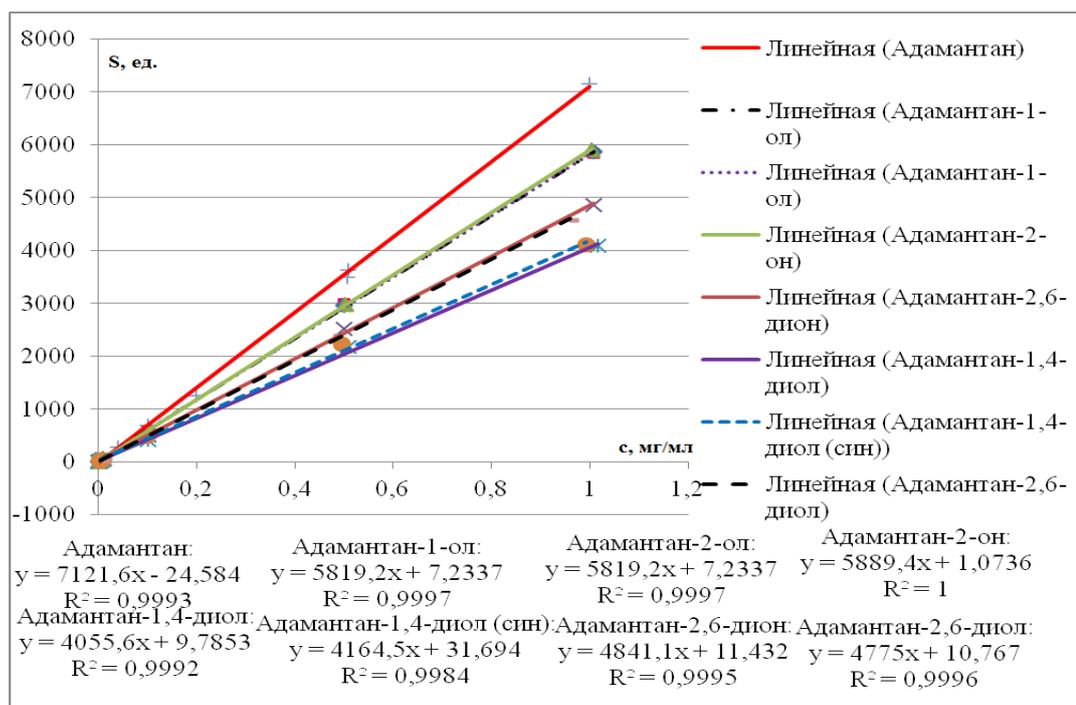


Рисунок 24 - Зависимость площади пиков (S) от содержания примесей в модельных смесях (с)

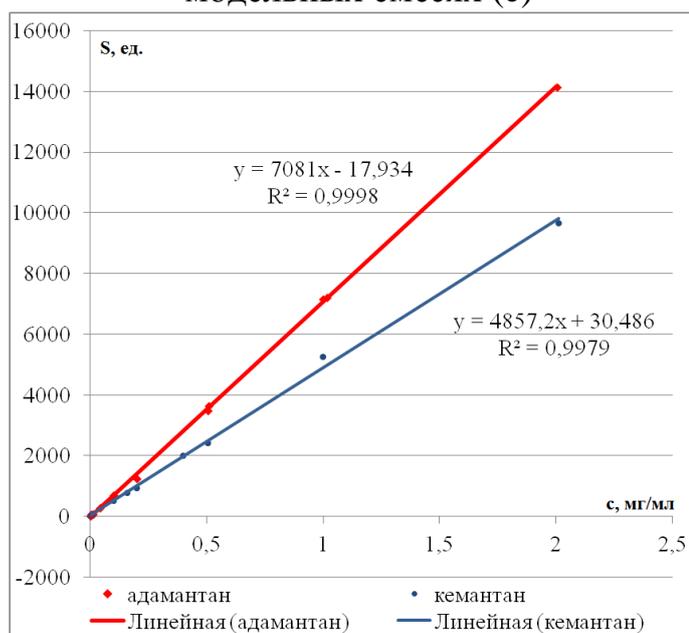


Рисунок 25 - Зависимость площади пика (S) кемантана и адамантана от концентрации (с)

На основании проведенных исследований была установлена рабочая концентрация растворов кемантана – 2 мг/мл. Концентрация внутреннего стандарта в растворах была выбрана с учетом ожидаемого содержания основных технологических примесей в субстанции кемантана и составила 0,05 мг/мл.

Поскольку отклик детектора в случае анализа потенциальных технологических примесей в субстанции кемантана отличался при одинаковых концентрациях изучаемых соединений, мы посчитали целесообразным вести расчет содержания посторонних примесей с учетом значений поправочных коэффициентов, определенных для каждой известной примеси. Поправочные коэффициенты установлены на модельных растворах известных примесей и адамантана шести различных концентраций в пределах диапазона линейной зависимости отклика детектора от концентрации: 0,002; 0,005; 0,01; 0,1; 0,5 и 1 мг/мл. Расчет проведен по следующей формуле:

$$K = \frac{S_{st} \times C_{прим} \times P_1}{S_{прим} \times C_{st} \times P_2}, \quad (10)$$

где: S_{st} – площадь пика внутреннего стандарта, мВ x мин;

$S_{прим}$ – площадь пика примеси, мВ x мин;

C_{st} – концентрация раствора внутреннего стандарта (адамантана), мг/мл;

$C_{прим}$ – концентрация раствора СО примеси, мг/мл;

P_1 – содержание основного вещества в СО примеси, в десятичных долях;

P_2 – содержание основного вещества в СО адамантана, в десятичных долях.

Усредненные значения поправочных коэффициентов составили: 1,14 – для адамантан-1-ола, 1,11 – для адамантан-2-ола, 1,15 – для адамантан-2-она, 1,34 – для адамантан-2,6-диола, 1,65 – для адамантан-1,4-диола, 1,51 – для «цис»-изомера адамантан-1,4-диола и 1,35 – для адамантан-2,6-диола.

В результате проведенных исследований была разработана следующая методика:

- *раствор внутреннего стандарта*: около 0,025 г (точная навеска) адамантана помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл

спирта этилового 95 %, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали;

- *испытуемый раствор*: около 0,1 г (точная навеска) субстанции кемантана помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 20 мл спирта этилового 95 %, прибавляли 10 мл предварительно подготовленного раствора внутреннего стандарта (адаммантана), доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали;

- *раствор для проверки пригодности хроматографической системы*: около 0,01 г (точная навеска) адамантан-2-она и 0,01 г (точная навеска) адамантан-2,6-диона помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл спирта этилового 95%, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали. 5 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, в которую предварительно помещали 0,1 г (точная навеска) рабочего стандартного образца кемантана, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали.

По 1 мкл испытуемого раствора и раствора для определения пригодности хроматографической системы вводили в испаритель хроматографа и получали не менее пяти хроматограмм каждого раствора в указанных выше хроматографических условиях.

Идентификацию примесей проводили по относительным временам удерживания, рассчитанным по результатам хроматографирования раствора для проверки пригодности хроматографической системы.

Содержание единичной примеси в субстанции ($X_i, \%$) рассчитывали по формуле:

$$X_i(\%) = \frac{K \times S_{\text{прим.}} \times C_{\text{st}} \times P}{S_{\text{st}} \times C_{\text{кем.}}} \times 100, \quad (11)$$

где $S_{\text{прим.}}$ – площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора, мВ х мин;

S_{st} – площадь пика внутреннего стандарта адамантана на хроматограмме испытуемого раствора, мВ x мин;

C_{st} – концентрация адамантана в испытуемом растворе, мг/мл;

$C_{кем.}$ – концентрация кемантана в испытуемом растворе, мг/мл;

K – коэффициент пересчета для каждой идентифицированной примеси (для неидентифицированных примесей $K=1$).

P – содержание основного вещества в СО адамантана, в десятичных долях.

Валидация разработанной методики была проведена по следующим критериям: специфичность, предел обнаружения, предел количественного определения, линейность и диапазон применения, правильность, прецизионность и устойчивость (робастность).

Специфичность методики была доказана на модельных смесях кемантана, его возможных примесей и внутреннего стандарта адамантана. В разработанных условиях наблюдалось полное разделение всех исследуемых соединений (см. Рисунок 23, Таблицу 20).

Линейный характер зависимости площадей пиков от концентрации испытуемых растворов показан ранее (Рисунки 24, 25).

Пределы обнаружения исследуемых соединений составляли от 0,0005 до 0,002 мкг, пределы количественного определения – от 0,001 до 0,01 мкг (Таблица 21).

Критерии «правильность» и «прецизионность» разработанной методики определяли одновременно, анализируя модельные смеси внутреннего стандарта и основных технологических примесей в субстанции кемантана – адамантан-2-она и адамантан-2,6-диола.

Испытуемые растворы готовили следующим образом: в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали точную навеску адамантан-2-она массой от 0,08 до 0,5 г (0,08 г, 0,1 г, 0,25 г и 0,5 г) и точную навеску адамантан-2,6-диола массой от 0,25 до 1,0 г (0,25 г, 0,4 г, 0,5 г, 1,0 г). Затем в каждую из колб помещали по 0,5 г (точная навеска) внутреннего стандарта (адамантана). Содержимое колб растворяли в 50 мл спирта этилового 95%, доводили объемы растворов тем же

растворителем до метки и перемешивали. По 1 мл полученных растворов переносили в мерные колбы вместимостью 100 мл, доводили объемы растворов тем же растворителем до метки и перемешивали. Отбирали по 3 мл во флаконы для анализа.

Определение содержания в полученных растворах адамантан-2-она и адамантан-2,6-диона проводили по разработанной методике. В Таблицах 22 и 23 представлены результаты анализа модельных смесей.

Таблица 22

Результаты определения содержания адамантан-2-она в модельных смесях

Взято (c_1), мг/мл	Найдено (c_2), мг/мл	Абсолютная ошибка, ($d = c_2 - c_1$)	Относительная ошибка результата: $X = (d \times 100 / c_1)$, %	Найдено, %	Метрологические характеристики ($P=95\%$, $n=5$)	Метрологические характеристики ($P=95\%$, $n=4$)
0,0080	0,0081	+0,0001	1,25	101,25	$\bar{X} = 104,25\%$ $S^2 = 3,59$ $S = 1,89$ $S\bar{x} = 0,85$ $\Delta\bar{X} = 2,35$ $RSD = 1,81$ $\bar{\mathcal{E}} = 2,25\%$	$\bar{X} = 102,91\%$ $S^2 = 4,63$ $S = 2,15$ $S\bar{x} = 1,08$ $\Delta\bar{X} = 3,42$ $RSD = 2,09$ $\bar{\mathcal{E}} = 3,32\%$
	0,0084	+0,0004	5,00	105,00		
	0,0085	+0,0005	6,25	106,25		
	0,0083	+0,0003	3,75	103,75		
	0,0084	+0,0004	5,00	105,00		
0,0106	0,0113	+0,0007	6,60	106,60	$\bar{X} = 104,34\%$ $S^2 = 3,82$ $S = 1,95$ $S\bar{x} = 0,87$ $\Delta\bar{X} = 2,42$ $RSD = 1,87$ $\bar{\mathcal{E}} = 2,32\%$	твыч. < табл (2,71 < 3,18)
	0,0108	+0,0002	1,89	101,89		
	0,0109	+0,0003	2,83	102,83		
	0,0112	+0,0006	5,66	105,66		
	0,0111	+0,0005	4,72	104,72		
0,0255	0,0252	-0,0003	1,18	98,82	$\bar{X} = 99,76\%$ $S^2 = 1,89$ $S = 1,38$ $S\bar{x} = 0,62$ $\Delta\bar{X} = 1,72$ $RSD = 1,38$ $\bar{\mathcal{E}} = 1,72\%$	
	0,0254	-0,0001	0,39	99,61		
	0,0251	-0,0004	1,57	98,43		
	0,0260	+0,0005	1,96	101,96		
	0,0255	0	0	100,00		
0,0507	0,0528	+0,0021	4,14	104,14	$\bar{X} = 103,27\%$ $S^2 = 0,83$ $S = 0,91$ $S\bar{x} = 0,41$ $\Delta\bar{X} = 1,31$ $RSD = 0,88$ $\bar{\mathcal{E}} = 1,27\%$	
	0,0522	+0,0015	2,96	102,96		
	0,0519	+0,0012	2,37	102,37		
	0,0529	+0,0022	4,34	104,34		
	0,0520	+0,0013	2,56	102,56		

Результаты определения содержания адамантан-2,6-диона в модельных смесях

Взято (c_1), мг/мл	Найдено (c_2), мг/мл	Абсолют- ная ошибка, ($d= c_2-c_1$)	Относитель- ная ошибка результата $X=(d \times 100/c_1)$, %	Найдено, %	Метрологические характеристики ($P=95\%$, $n=5$)	Метрологические характеристики ($P=95\%$, $n=5$)
0,0255	0,0260	+0,0005	1,96	101,96	$\bar{X} = 99,77\%$ $S^2 = 3,58$ $S = 1,89$ $S\bar{x} = 0,85$ $\Delta\bar{X} = 2,35$ $RSD = 1,89$ $\bar{\mathcal{E}} = 2,36\%$	$\bar{X} = 100,32\%$ $S^2 = 1,25$ $S = 1,12$ $S\bar{x} = 0,50$ $\Delta\bar{X} = 1,39$ $RSD = 1,12$ $\bar{\mathcal{E}} = 1,39\%$
	0,0255	0	0	100,00		
	0,0258	+0,0003	1,18	101,18		
	0,0249	-0,0006	2,35	97,65		
	0,0250	-0,0005	1,96	98,04		
0,0397	0,0401	+0,0004	1,01	101,01	$\bar{X} = 98,69\%$ $S^2 = 5,89$ $S = 2,43$ $S\bar{x} = 1,09$ $\Delta\bar{X} = 3,02$ $RSD = 2,46$ $\bar{\mathcal{E}} = 3,06\%$	твыч. < табл (0,64 < 2,78)
	0,0395	-0,0002	0,50	99,50		
	0,0399	+0,0002	0,50	100,50		
	0,0386	-0,0011	2,77	97,23		
	0,0378	-0,0019	4,79	95,21		
0,0484	0,0494	+0,0010	2,07	102,07	$\bar{X} = 101,16\%$ $S^2 = 0,31$ $S = 0,56$ $S\bar{x} = 0,25$ $\Delta\bar{X} = 0,70$ $RSD = 0,55$ $\bar{\mathcal{E}} = 0,69\%$	
	0,0489	+0,0005	1,03	101,03		
	0,0490	+0,0006	1,24	101,24		
	0,0487	+0,0003	0,62	100,62		
	0,0488	+0,0004	0,83	100,83		
0,0502	0,0517	+0,0015	2,99	102,99	$\bar{X} = 100,52\%$ $S^2 = 2,12$ $S = 1,46$ $S\bar{x} = 0,65$ $\Delta\bar{X} = 1,82$ $RSD = 1,45$ $\bar{\mathcal{E}} = 1,81\%$	
	0,0504	+0,0002	0,40	100,40		
	0,0498	-0,0004	0,80	99,20		
	0,0503	+0,0001	0,20	100,20		
	0,0501	-0,0001	0,20	99,80		
0,1002	0,1055	+0,0053	5,30	105,29	$\bar{X} = 101,46\%$ $S^2 = 5,52$ $S = 2,35$ $S\bar{x} = 1,05$ $\Delta\bar{X} = 2,92$ $RSD = 2,32$ $\bar{\mathcal{E}} = 2,88\%$	
	0,0995	-0,0007	0,70	99,30		
	0,1017	+0,0015	1,50	101,50		
	0,1016	+0,0014	1,40	101,40		
	0,1000	-0,0002	0,20	99,80		

Результаты анализа модельных растворов показали, что отклонение среднего результата измерения от истинного значения были в пределах 7% (не более 6,60 % - для адамантан-2-она и 5,30% - для адамантан-2,6-диона).

Оценка прецизионности методики как сходимости получаемых результатов: значения коэффициента вариации (RSD) находятся в пределах 2 % (2,09% - для адамантан-2-она и 1,12% - для адамантан-2,6-диона). Результаты, получаемые по данной методике, не отягощены систематической ошибкой, о чем свидетельствуют неравенства: $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ ($2,71 < 3,18$ и $0,64 < 2,78$, соответственно для адамантан-2-она и адамантан-2,6-диона).

Как видно из данных, приведенных в Таблицах 22 и 23, применяемая методика количественной оценки содержания примесей в субстанции кемантана правильна, прецизионна. Ошибка методики составляет 3,32% - для адамантан-2-она, 1,39% - для адамантан-2,6-диона.

Для оценки устойчивости (робастности) методики были преднамеренно изменены условия эксперимента и определены параметры пригодности хроматографической системы.

Изучено влияние отклонений температуры термостата в диапазоне от 190°C до 220°C, полученные данные представлены в Таблице 24. Увеличение температуры на 10°C или 20°C относительно выбранной приводило к ухудшению разделения пиков кемантана и адамантан-2,6-диона (разрешение пиков при 210°C и 220°C соответственно: 1,51 и 1,27, тогда как при 200°C разрешение составляло 1,78), при этом время анализа сокращалось с 30 мин (при 200°C) до 24 и 19 мин, соответственно. Было показано, что снижение температуры на 10°C улучшает разделение (разрешение пиков кемантана и адамантан-2,6-диона - 1,86), но приводит к увеличению времени анализа до 38 мин.

Таблица 24

Значения параметров пригодности хроматографической системы при изменении температуры термостата

Температура термостата	Компонент смеси	RT	As	N	Rs
190°C	Адамантан-2,6-дион	36,18	1,05	116927	-
	Кемантан	37,14	1,00	116424	1,86
200°C	Адамантан-2,6-дион	28,18	1,04	106523	-
	Кемантан	28,79	1,01	110820	1,78
210°C	Адамантан-2,6-дион	22,48	1,02	116204	-
	Кемантан	22,88	0,97	116471	1,51
220°C	Адамантан-2,6-дион	18,29	1,03	116923	-
	Кемантан	18,57	1,00	116563	1,27

Изменение скорости потока газа-носителя (азота) на $\pm 0,5$ мл/мин влияло на разделение пиков кемантана и его основной примеси. Увеличение скорости потока способствовало сокращению времени анализа до 24 мин, однако при этом разрешение пиков кемантана и адамантан-2,6-диона сократилось с 1,78 до 1,59, а также снизилась эффективность колонки (Таблица 25). Снижение скорости азота до 1 мл/мин привело к более эффективному разделению пиков кемантана и адамантан-2,6-диона на фоне увеличения времени анализа: разрешение составило 1,89.

Таблица 25

Значение параметров пригодности хроматографической системы при изменении скорости потока газа-носителя

Скорость газа-носителя, мл/мин	Компонент смеси	RT	As	N	Rs
2,0 мл/мин	Адамантан-2,6-дион	23,33	1,05	85820	-
	Кемантан	23,85	0,98	84105	1,59
1,5 мл/мин	Адамантан-2,6-дион	28,18	1,04	106523	-
	Кемантан	28,79	1,01	110820	1,78
1,0 мл/мин	Адамантан-2,6-дион	37,36	1,04	98896	-
	Кемантан	38,18	0,99	150449	1,89

Таким образом, после анализа значений параметров пригодности системы, полученных в различных условиях, был сделан вывод о необходимости строгого соблюдения условий предложенной методики с целью получения достоверных и приемлемых результатов с минимальными затратами времени.

По разработанной методике ГЖХ был проведен анализ 6 образцов субстанции кемантана, кристаллизованной из четыреххлористого углерода.

Идентификацию пиков примесей проводили путем сравнения их относительных времен удерживания с относительными временами удерживания пиков свидетелей технологических примесей кемантана, а также методом добавок свидетелей примесей к испытываемому раствору.

Во всех испытываемых образцах была обнаружена примесь адамантан-2,6-диона в содержании от 1,09 до 3,00%, примеси адамантан-2-она и других известных или неидентифицированных примесей в образцах обнаружено не было.

В Таблице 26 представлены результаты содержания посторонних примесей в образцах субстанции кемантана, полученные с помощью метода ТСХ и ГЖХ.

Таблица 26

Содержание примесей в образцах субстанции кемантана, кристаллизованной из четыреххлористого углерода, определенное методами ТСХ и ГЖХ

Метод ТСХ						
№ образца	01	25	А-2-011	04	709	162
адамantan-2,6-дион, %	≈2,5%	≈2,5%	< 2,5%	≤ 2,5%	≈2,5%	< 2,5%
адамantan-2-он, %	отсутствует в образцах					
Метод ГЖХ-ПИД						
№ образца	01	25	А-2-011	04	709	162
адамantan-2,6-дион, %	2,96	1,09	1,47	2,74	3,27	1,47
адамantan-2-он, %	отсутствует в образцах					

Как видно из результатов, представленных в таблице 26, с помощью метода ГЖХ можно более правильно и достоверно установить содержание примесей в субстанции кемантана. Единственным недостатком разработанной методики является относительно длительное время анализа - 40 мин.

На основании полученных результатов было сделано заключение о возможности применения данной методики в рутинном анализе чистоты субстанции кемантана (5-гидроксиадамantan-2-она) как в фармацевтической, так и в химической промышленности [85].

3.3.6.3. Разработка и валидация методики определения остаточных органических растворителей в субстанции кемантана [84]

Важным испытанием в контроле чистоты субстанции является испытание на остаточные органические растворители (ООР).

Технология синтеза субстанции кемантана, разработанная в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», предусматривает применение органических растворителей, принадлежащих к I и II классам токсичности (Таблица 27) [21, 119, 120].

Органические растворители по классам токсичности, применяемые в синтезе субстанции кемантана

ООР	Класс токсичности*	ПДК (ppm)	ПДК (%)	T кип., °C	стадия синтеза, на которой применяется ООР
Четыреххлористый углерод	I	4	0,0004	76,7	очистка технического кемантана от примеси адамантан-2,6-диона, регенерация кемантана из маточников
Хлороформ	II	60	0,006	56,2	выделение технического кемантана из водного маточника, финальная очистка кемантана путем кристаллизации из смеси толуол-хлороформ
Гексан	II	290	0,029	68,7	очистка технического кемантана от примеси адамантан-2,6-диона
Толуол	II	890	0,089	84,1	очистка технического кемантана от примеси адамантан-2,6-диона и остатков четыреххлористого углерода (кристаллизация из смеси толуол-хлороформ)

Контроль содержания ООР проводили методом газовой хроматографии [84, 88]. С целью улучшения извлечения летучих органических растворителей, потенциально находящихся в исследуемой субстанции, использовали статистическую парофазную экстракцию (СПЭ) или «хэд-спейс»-экстракцию («head-space»). Преимущество парофазного ввода пробы перед непосредственным вводом жидкой пробы состоит в минимизации степени загрязнения ГЖХ-системы нелетучим остатком и снижении риска повреждения колонки, повышении селективности анализа [17, 71, 75, 135].

Существует множество нюансов при использовании подхода СПЭ, которые мы учитывали в анализе ООР:

а) применение капиллярной колонки с достаточно толстой пленкой нанесенной неподвижной фазы, не менее 0,5 мкм (чаще используют колонки с толщиной нанесенной фазы - 1,8 или 3,0 мкм) [22, 75, 105, 109]. В качестве неподвижной фазы зарубежными фармакопеями предложены к применению: 6%

цианопропилфенил 94% метилполисилоксан, полиэтиленгликоль, а также полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталатом, и др. [22, 75, 105, 109].

б) преимущественно автоматический ввод пробы посредством автосамплера для снижения ошибки на стадии отбора и ввода пробы [17,75].

в) быстрота приготовления проб и срок использования подготовленных образцов (желательно в течение часа с момента приготовления).

г) отбор проб: проведение нескольких анализов из одной виалы с образцом – существенная ошибка, поскольку воспроизводимо проэкстрагировать искомые летучие соединения из единичной пробы можно лишь однократно. Таким образом, анализ проводят по принципу «одна проба – один вкол» [17,75].

д) выбор материала, из которого изготовлены крышки виал для парофазного анализа. В случае исследования хлорорганических соединений следует использовать крышки с пропиткой PTFE (политетрафторэтилен или тефлон) - материала, индифферентного к действию галогенсодержащих соединений. В целом, он химически устойчив, не адсорбирует компоненты пробы из растворителя, выдерживает температуру от -65°C до $+260^{\circ}\text{C}$, однако существует проблема с утечкой из-за негибкости и тонкости материала. Применяют для единственной инъекции образца. Используются также комбинации материалов: Silicone/PTFE (силикон/тефлон), силикон с двусторонним тефлоном - PTFE/Silicone/PTFE (тефлон/силикон/тефлон) и т.д.

е) для предотвращения конденсации растворителя рекомендуется повышать температуру шприца для отбора пробы на $5-10^{\circ}\text{C}$ выше температуры подготовки пробы.

ж) при выборе условий СПЭ необходимо руководствоваться принципом достижения системой состояния равновесия. Время установления равновесия определяется экспериментально, исходя из выбранной температуры, особенностей пробоподготовки, физико-химических свойств целевых веществ, применяемых для подготовки пробы растворителей, объема пробы, номинального размера виал и т.д. [17, 75].

Контроль наличия и количественного содержания остаточных органических растворителей проводили на кварцевой капиллярной колонке «VF-624ms» 60 м, 0,32 мм, с нанесенной неподвижной фазой - 6% цианопропилфенил 94% диметилполисилоксан (толщина слоя - 1,8 мкм) [84].

Для оптимизации процесса парофазной экстракции целевых соединений из субстанции на основании физико-химических свойств органических растворителей было предложено применять несколько вариантов пробоподготовки: первый способ - для максимизации экстракции из конденсированной фазы и повышения точности определения хлорорганических растворителей: хлороформа и четыреххлористого углерода; второй способ - для извлечения толуола и гексана.

Поскольку субстанция кемантана легко растворима как в воде, так и в диметилсульфоксиде (ДМСО), то решили использовать для подготовки проб оба этих растворителя. Проводились исследования по экстракции целевых ООР парофазным способом как в чистых растворителях (вода, ДМСО), так и в их смеси (различные соотношения воды и ДМСО).

В качестве внутреннего стандарта рассматривали целый ряд веществ: ацетон, метанол, этанол, бутанол, гексанол-1, 1,2-дихлорэтан, дихлорметан, этилацетат. Основные требования, которые предъявлялись к внутреннему стандарту: соединение должно было быть летучим, иметь температуру кипения, близкую к соответствующим температурам искомым ООР, пик стандарта должен был выходить предпочтительно до всех целевых ООР и проявляться на хроматограмме в виде хорошо разрешенного пика. В качестве внутреннего стандарта предварительно были выбраны метанол и ацетон [84, 88].

В соответствии со способом пробоподготовки и с учетом физико-химических свойств применяемых растворителей и анализируемых веществ были предложены следующие условия проведения анализа: температура испарителя – 210°C, температура детектора – 230°C, скорость газа-носителя (азот) – 1,6 мл/мин, газа-поддува (азот) – 28 мл/мин, водорода – 30 мл/мин, воздуха – 300 мл/мин, деление потока - 1:5. Температурная программа для термостата: изотерма при

40°C в течение 5 мин, затем повышение температуры до 130°C со скоростью 10°C/мин, изотерма при 130°C в течение 5 мин, затем повышение температуры до 190°C со скоростью 20°C/мин, изотерма при 190°C в течение 8 мин.

Параметры парофазного отбора пробы для пробоподготовки по первому способу (№1): температура шприца – 85°C, температура испарителя – 80°C, скорость введения пробы – 100 мкл/сек, скорость отбора пробы шприцом – 500 мкл/сек, объем пробы – 1 мл.

Параметры парофазного отбора пробы для пробоподготовки по второму способу (№2): температура шприца – 110°C, температура испарителя – 105°C, скорость введения пробы – 100 мкл/сек, скорость отбора пробы шприцом – 500 мкл/сек, объем пробы – 1 мл.

С целью выбора рабочей концентрации внутреннего стандарта (ацетона) в испытуемых растворах нами была изучена зависимость площади пика от концентрации ацетона.

Линейная зависимость отмечалась в интервале от 0,00127 мг/мл до 0,06 мг/мл, значение коэффициента корреляции составляло 0,999 (см. Рисунок 26). На основании полученных данных в качестве оптимальной была выбрана рабочая концентрация ацетона (внутреннего стандарта) – 0,005 мг/мл.

Была установлена линейная зависимость площади пика от концентрации для всех потенциальных ООР:

- для толуола в интервале от 0,00017 мг/мл до 0,035 мг/мл, значение коэффициента корреляции составляло 0,999 (Рисунок 27).

- для гексана в интервале от 0,00006 мг/мл до 0,01 мг/мл, значение коэффициента корреляции составляло 0,999 (Рисунок 27).

- для хлороформа в интервале от 0,0026 мг/мл до 0,1 мг/мл, значение коэффициента корреляции составляло более 0,95 (что, в соответствии с рекомендациями руководства по валидации [16], приемлемо при анализе следовых количеств веществ) (Рисунок 28).

- для четыреххлористого углерода в интервале от 0,00044 мг/мл до 0,0016 мг/мл, значение коэффициента корреляции составляло более 0,95 (что, в

соответствии с рекомендациями руководства по валидации [16], приемлемо при анализе следовых количеств веществ) (Рисунок 29).

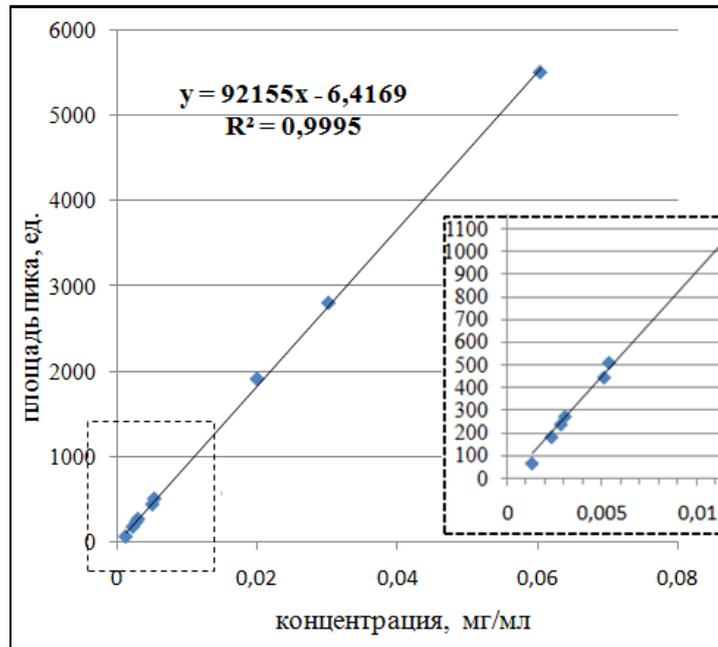


Рисунок 26 - Зависимость площади пика от концентрации ацетона в модельных растворах (вне зависимости от способа пробоподготовки)

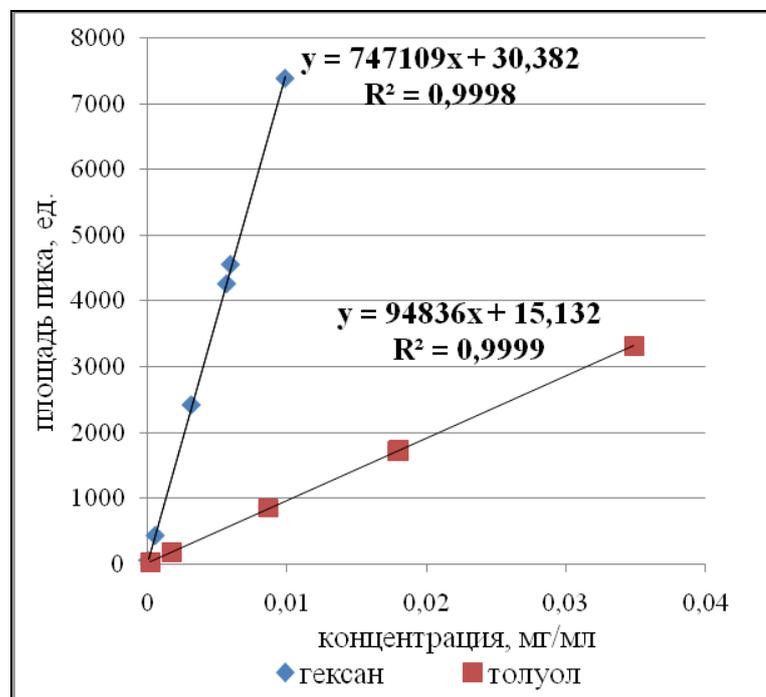


Рисунок 27 - Зависимость площади пика от концентрации гексана и толуола в модельных растворах

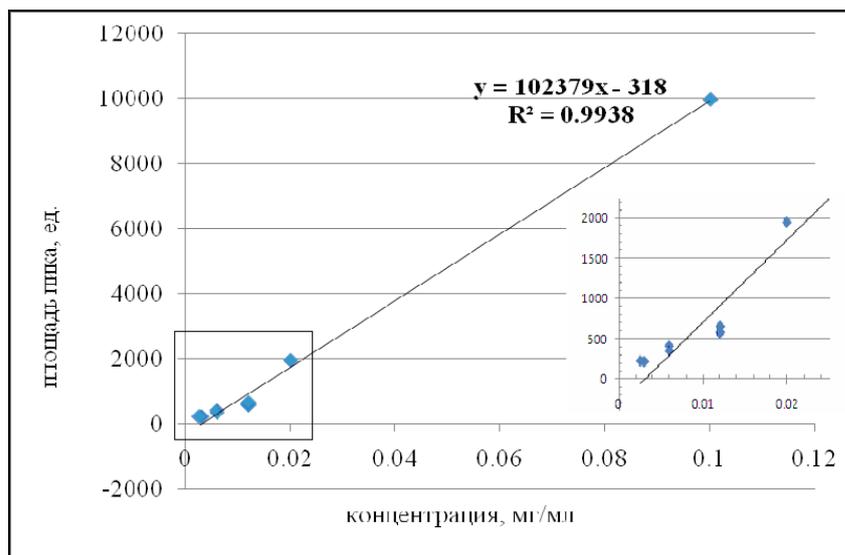


Рисунок 28 - Зависимость площади пика от концентрации хлороформа в модельных растворах

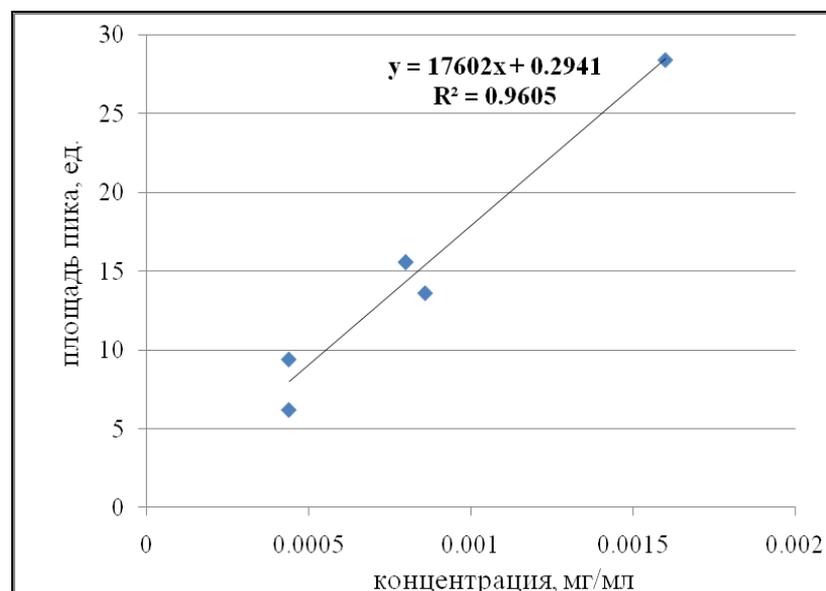


Рисунок 29 - Зависимость площади пика от концентрации четыреххлористого углерода в модельных растворах

На основании полученных данных в качестве оптимальной была выбрана рабочая концентрация внутреннего стандарта (ацетона) – 0,005 мг/мл.

Приготовление испытуемых растворов и их анализ проводили по описанной ниже методике.

Пробоподготовка № 1. Контроль содержания в субстанции четыреххлористого углерода и хлороформа.

Раствор внутреннего стандарта.

Раствор «А»: около 0,025 г (точная навеска) ацетона помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 20 мл воды очищенной, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и тщательно перемешивали.

Раствор «Б»: 1 мл раствора «А» помещали в колбу на 100 мл, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и тщательно перемешивали.

Испытуемый раствор. Около 0,400 г (точная навеска) субстанции кемантана помещали в виалу для хроматографического исследования, растворяли в 2 мл водного раствора внутреннего стандарта с концентрацией 0,005 мг/мл (раствор «Б»).

Стандартный раствор. Около 0,300 г хлороформа и около 0,020 г четыреххлористого углерода (точные навески) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, содержащую заранее отмеренные 20 мл ДМСО. Доводили объем раствора тем же растворителем до метки и тщательно перемешивали.

1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 5 мл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 0,5 мг/мл (раствор «А»), доводили объем раствора водой очищенной до метки и тщательно перемешивали.

1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора водой очищенной до метки и тщательно перемешивали.

Растворы были свежеприготовленными.

Пробоподготовка № 2 . Контроль содержания в субстанции гексана и толуола.

Раствор внутреннего стандарта.

Раствор «В»: около 0,025 г (точная навеска) ацетона помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 20 мл ДМСО, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и тщательно перемешивали.

Раствор «Г»: 1 мл раствора «В» помещали в колбу на 100 мл, доводили объем раствора до метки ДМСО и тщательно перемешивали.

Испытуемый раствор. Около 0,040 г (точная навеска) субстанции кемантана помещали в виалу для хроматографического исследования, растворяли в 2 мл раствора внутреннего стандарта в ДМСО с концентрацией 0,005 мг/мл (раствор «Г»).

Стандартный раствор. Около 0,029 г гексана и 0,089 г толуола (точные навески) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, содержащую заранее отмеренные 10 мл ДМСО. Доводили объем раствора ДМСО до метки.

5 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 5 мл раствора внутреннего стандарта с концентрацией 0,5 мг/мл (раствор «В»), доводили объем раствора ДМСО до метки и тщательно перемешивали.

1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора ДМСО до метки и тщательно перемешивали.

Растворы были свежеприготовленными.

Хроматографировали испытуемые и стандартные растворы, получая не менее 3 хроматограмм. Усредняя результаты, рассчитывали поправочный коэффициент по каждому анализируемому органическому растворителю.

Валидацию разработанной методики проводили в соответствии с Руководством Q2(R1) Международной Конференции по Гармонизации [124].

Специфичность разработанной методики была доказана путем анализа модельных смесей, содержащих ацетон (50 ppm), четыреххлористый углерод (4 ppm), хлороформ (60 ppm), гексан (290 ppm) и толуол (890 ppm). Подготовку проб проводили по методикам, представленным выше. Хроматограммы полученных модельных смесей представлены на рисунках 30, 31. Разделение пиков ООР показано на примере анализа технического образца кемантана, содержащего все четыре обнаруживаемых ООР (пробоподготовка проведена по способу № 1) (см. Рисунок 32).

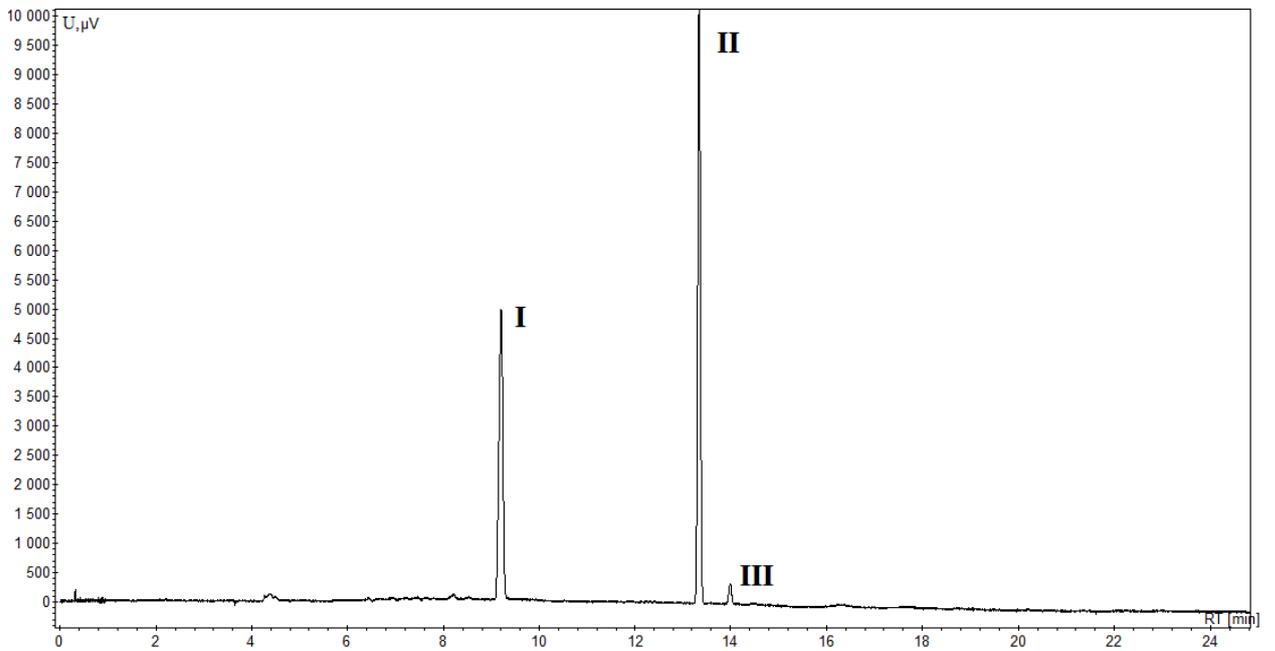


Рисунок 30 - Типичная хроматограмма модельной смеси: I – ацетон (50 ppm), II – хлороформ (60 ppm), III – четыреххлористый углерод (4 ppm). Способ ПП № 1.

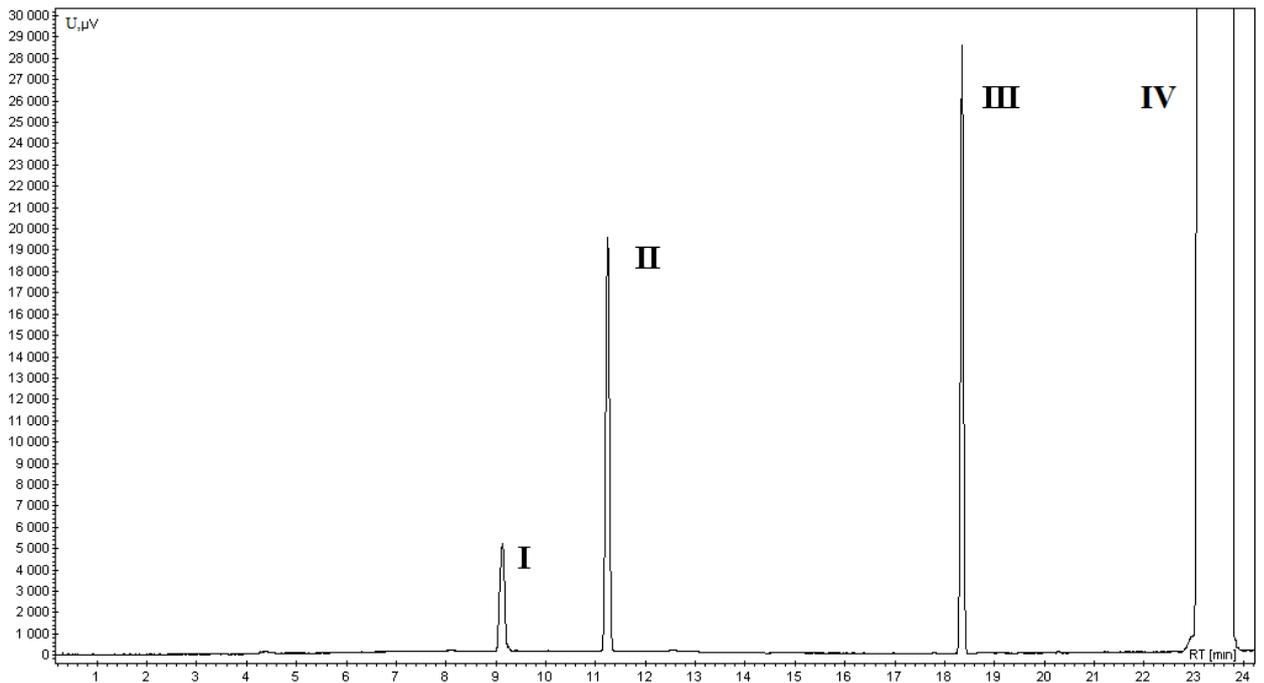


Рисунок 31 - Типичная хроматограмма модельной смеси: I – ацетон (50 ppm), II – н-гексан (290 ppm), III – толуол (890 ppm), IV – пик растворителя (ДМСО).

Способ ПП № 2.

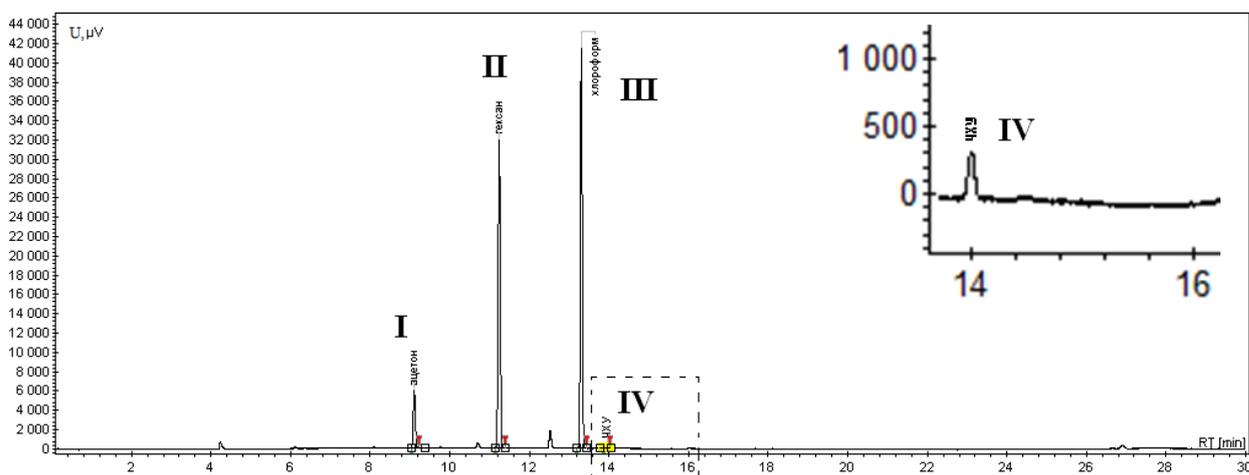


Рисунок 32 - Хроматограмма раствора, содержащего внутренний стандарт (ацетон) и технический образец кемантана. I – ацетон, II – гексан, III – хлороформ, IV- четыреххлористый углерод. Способ ПП № 1.

Времена удерживания, пределы обнаружения и параметры разделения исследуемых соединений представлены в Таблице 28.

Таблица 28

Основные параметры пиков ООР

№	Вещество	RT, мин	RRT	Rs	ПО, мкг	ПКО, мкг
1	ацетон	$9,10 \pm 0,10$	-	-	-	-
2	гексан**	$11,26 \pm 0,05$	$1,23 \pm 0,02$	между 1 и 2: $21,0 \pm 2,0$	0,001	0,002
3	хлороформ*	$13,33 \pm 0,07$	$1,46 \pm 0,02$	между 2 и 3: $21,5 \pm 1,0$	0,02	0,04
4	четырёххлористый углерод*	$13,95 \pm 0,05$	$1,54 \pm 0,02$	между 3 и 4: $6,7 \pm 0,5$	0,04	0,08
5	толуол**	$18,35 \pm 0,05$	$2,00 \pm 0,03$	между 4 и 5: $41,5 \pm 1,5$	0,02	0,035

RT – время удерживания пика вещества, мин; RRT – относительное время удерживания, Rs – разрешение между пиками двух соседних компонентов смеси, ПО – предел обнаружения, ПКО – предел количественного определения (уровень шума – 20 мВ)

* пробоподготовка проводилась по способу №1

** пробоподготовка проводилась по способу №2

Определение правильности и прецизионности проводили методом добавок на модельных смесях, состоящих из субстанции кемантана, внутреннего стандарта (ацетона) и целевого органического растворителя, вносимого в концентрации от 50 до 200% от номинального значения (Таблица 29). В качестве номинального выбрали значение, соответствующее предельно допустимому содержанию ООР в субстанции, согласно ОФС 42-0057-07 [21].

Расчет содержания ООР в модельных смесях проводили по формуле:

$$X = \frac{K \times S_{\text{оор}} \times C_{\text{ст}} \times 100 \%}{S_{\text{ст}} \times C_{\text{кем}}} - X_{\text{оор}}, \% \quad (12)$$

где K – поправочный коэффициент;

$S_{\text{оор}}$ – площадь пика ООР на хроматограмме испытуемого раствора, мВ x мин;

$C_{\text{ст}}$ – концентрация внутреннего стандарта в испытуемом растворе, мг/мл;

$S_{\text{ст}}$ – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора, мВ x мин;

$C_{\text{кем}}$ – концентрация субстанции кемантана в испытуемом растворе, мг/мл;

$X_{\text{оор}}$ – исходное содержание целевого ООР в субстанции, в процентах;

Поправочный коэффициент вычисляли по следующей формуле:

$$K = \frac{S_{\text{ст}} \times C_{\text{оор}}}{S_{\text{оор}} \times C_{\text{ст}}}, \quad (13)$$

где $S_{\text{ст}}$ – площадь пика внутреннего стандарта, мВ x мин;

$S_{\text{оор}}$ – площадь пика ООР, мВ x мин;

$C_{\text{ст}}$ – концентрация внутреннего стандарта в растворе СО, мг/мл;

$C_{\text{оор}}$ – концентрация ООР в растворе СО, мг/мл.

Усредненные значения поправочных коэффициентов составили: $3,30 \pm 1,00$ - для четыреххлористого углерода, $1,70 \pm 0,45$ - для хлороформа, $0,36 \pm 0,05$ - для гексана, $1,0 \pm 0,10$ - для толуола.

Таблица 29

Результаты анализа модельных смесей ООР

Четыреххлористый углерод					
Взято (c_1), мг/мл	Найдено (c_2), мг/мл	Абсолютная ошибка, ($d = c_2 - c_1$)	Относительная ошибка: $X = (d \times 100 / c_1), \%$	Найдено, %	Метрологические характеристики
1	2	3	4	5	6
0,00044	0,00042	-0,00002	4,55	95,45	(P=95%, n=9) $\bar{X} = 102,66\%$ $S = 10,26$ $S_X = 3,42$ $\Delta \bar{X} = 7,9$ RSD=10,0 t выч.=0,78 t табл.=2,31 $\bar{E} = 7,7 \%$
0,00080	0,00079	-0,00001	1,25	98,75	
0,00080	0,00075	-0,00005	6,25	93,75	
0,00082	0,00092	+0,00010	12,20	112,20	
0,00082	0,00077	-0,00005	6,10	93,90	
0,00084	0,00101	+0,00017	20,24	120,24	
0,00086	0,00099	-0,00013	15,12	115,12	
0,00088	0,00087	-0,00001	1,14	98,86	
0,00160	0,00153	-0,00007	4,38	95,63	

Хлороформ					
1	2	3	4	5	6
0,00604	0,00582	-0,00022	3,64	96,36	(P=95%, n=9)
0,00604	0,00594	-0,00010	1,66	98,34	$\bar{X} = 98,34\%$
0,01208	0,01201	-0,00007	0,58	99,42	$S = 4,81$
0,01206	0,01236	+0,00030	2,49	102,49	$S_x = 1,60$
0,01206	0,01163	-0,00043	3,57	96,43	$\Delta\bar{X} = 3,70$
0,01206	0,01300	+0,00094	7,79	107,79	RSD = 4,89
0,01206	0,01197	-0,00009	0,75	99,25	t выч. = 1,04
0,01206	0,01107	-0,00099	8,21	91,79	t табл. = 2,31
0,01210	0,01128	-0,00082	6,78	93,22	$\bar{\mathcal{E}} = 3,76\%$
Гексан					
1	2	3	4	5	6
0,00296	0,00314	+0,00018	6,08	106,08	(P=95%, n=9)
0,00296	0,00310	+0,00014	4,73	104,73	$\bar{X} = 99,01\%$
0,00570	0,00565	-0,00005	0,88	99,12	$S = 4,95$
0,00570	0,00566	-0,00004	0,70	99,30	$S_x = 1,65$
0,00576	0,00545	-0,00031	5,38	94,62	$\Delta\bar{X} = 3,81$
0,00576	0,00558	-0,00018	3,13	96,88	RSD = 5,00
0,00576	0,00589	+0,00013	2,26	102,26	t выч. = 0,60
0,01124	0,01014	-0,00110	9,79	90,21	t табл. = 2,31
0,01124	0,01100	-0,00024	2,14	97,86	$\bar{\mathcal{E}} = 3,85\%$
Толуол					
1	2	3	4	5	6
0,00866	0,00867	+0,00001	0,12	100,12	(P=95%, n=11)
0,00866	0,00859	-0,00007	0,81	99,19	$\bar{X} = 99,93\%$
0,00866	0,00851	-0,00015	1,73	98,27	$S = 1,23$
0,01784	0,01780	+0,00004	0,22	99,78	$S_x = 0,37$
0,01784	0,01832	+0,00048	2,69	102,69	$\Delta\bar{X} = 0,83$
0,01798	0,01766	-0,00032	1,78	98,22	RSD = 1,23
0,01798	0,01789	-0,00009	0,50	99,50	t выч. = 0,19
0,01798	0,01809	+0,00011	0,61	100,61	t табл. = 2,23
0,03480	0,03479	-0,00001	0,03	99,97	$\bar{\mathcal{E}} = 0,83\%$
0,03480	0,03493	+0,00013	0,37	100,37	
0,03480	0,03497	+0,00017	0,49	100,49	

Оценка правильности методики. Согласно полученным данным, максимальная относительная ошибка (%) определения составляла: для четыреххлористого углерода - 20,24 % (т.е. $\pm 1 \text{ ppm}$), для хлороформа - 8,21 %, для гексана – 9,79 %, для толуола - 2,69 %; относительная погрешность методики определения: 7,7 % - для четыреххлористого углерода; 3,76 % - для хлороформа; 3,85 % - для гексана; 0,83 % - для толуола.

Оценка прецизионности методики. Коэффициенты вариации: 10,0 % - для четыреххлористого углерода; 4,89 % - для хлороформа; 5,0 % - для гексана; 1,23

% - для толуола. Результаты, получаемые по данной методике, не отягощены систематической ошибкой, о чем свидетельствует неравенство: $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ (для каждого из искомых ООР).

Проверку пригодности хроматографической системы было предложено проводить по относительному времени удерживания целевых ООР относительно внутреннего стандарта (RRT), а также по числу теоретических тарелок (N), фактору асимметрии (As) пиков ООР. Данные по пригодности хроматографической системы были получены на основе анализа модельных смесей, содержащих ацетон (50 ppm), хлороформ (60 ppm), четыреххлористый углерод (4 ppm), н-гексан (290 ppm) и толуол (890 ppm). Подготовку проб проводили по методике, представленной выше. Результаты расчета и критерии приемлемости указанных параметров представлены в Таблице 30.

Таблица 30

Параметры пригодности хроматографической системы

ООР / Параметр пригодности	RRT	As	N
для контроля содержания хлороформа и четыреххлористого углерода			
хлороформ	1,46±0,02	1,0±0,1	150000±50000
четырёххлористый углерод	1,54±0,02	1,0±0,1	150000±50000
Критерии приемлемости:			
хлороформ	1,46±0,02	Не более 1,5	Не менее 100000
четырёххлористый углерод	1,54±0,02		
для контроля содержания гексана и толуола			
н-гексан	1,23±0,02	1,0±0,1	90000±40000
толуол	2,00±0,03	1,0±0,1	150000±50000
Критерии приемлемости:			
н-гексан	1,23±0,02	Не более 1,5	Не менее 50000
толуол	2,00±0,03		

С помощью описанной методики был проведен анализ нескольких образцов субстанции кемантана, кристаллизованной из четыреххлористого углерода. Результаты определения ООР методом ГЖХ представлены в Таблице 31.

Таблица 31

Результаты определения ООР в серийных образцах субстанции кемантана

ООР / № серии	ПДК, ppm	162	709	Оп 04	оп 736
---------------	----------	-----	-----	-------	--------

ООР / № серии	ПДК, ppm	162	709	Оп 04	оп 736
четыреххлористый углерод, ppm	4,0	10800	10495	14500	10933
хлороформ, ppm	60,0	6,0	5	4	60
н-гексан, ppm	290,0	18,0	-	9	70

Как видно из данных Таблицы 31, во всех проанализированных образцах содержание четыреххлористого углерода превышает допустимые нормы, предусмотренные ОФС 42-0057-07 [21].

Дальнейшие исследования по высушиванию образцов показали, что достичь нормируемого предела содержания ООР в субстанции кемантана путем длительного температурного воздействия (4 часа при 105°C) не удастся (см. Таблицу 32).

Таблица 32

Результаты определения ООР в серийных образцах субстанции кемантана

№ серии / ООР	ПДК, ppm	04		709	
		исходные данные	после высушивания (4 часа при 105°C)	исходные данные	после высушивания (4 часа при 105°C)
четыреххлористый углерод, ppm	4,0	14500	13200	10495	6043
хлороформ, ppm	60,0	4	2	5	2
н-гексан, ppm	290,0	9	7	-	-

По результатам проведенных исследований был сделан вывод о необходимости проведения дополнительной стадии очистки субстанции кемантана от ООР.

Таким образом, нами была разработана методика определения ООР в субстанции кемантана методом ГЖХ с применением СПЭ [84]. Проведена валидация в соответствии с требованиями Руководства Международной Конференции по Гармонизации ICH Q2(R1) [124]. Методика специфична, чувствительна, точна и достоверна. Предложены параметры оценки пригодности хроматографической системы. Сделано заключение, что разработанная методика ГЖХ может применяться в рутинном анализе определения ООР в субстанции кемантана.

С помощью разработанной методики показано, что содержание четыреххлористого углерода в образцах субстанции кемантана после кристаллизации из этого растворителя значительно превышает допустимые значения. Также показано, что дополнительное высушивание субстанции не приводит к удалению из нее четыреххлористого углерода. В связи с чем было сделано заключение о необходимости повторной кристаллизации.

3.3.7. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции кемантана [86]

Ранее количественное определение субстанции кемантана проводили методом оксимирования по кето-группе гидроксиламина гидрохлоридом в присутствии спиртового раствора N,N-дифенилгуанидина, который, являясь сильным основанием, вытесняет хлористый водород из гидроксиламина гидрохлорида [18]. Избыток гидроксиламина титровали 0,2 М спиртовым раствором кислоты хлорной в присутствии индикатора бромфенолового синего. Для повышения точности определения конечной точки титрования испытуемого образца окраску индикатора вблизи точки эквивалентности сравнивали с окраской образца слепого опыта, состоящего из раствора гидроксиламина гидрохлорида и спирта. Параллельно проводили контрольный опыт. Позднее в методику были внесены изменения в соотношения используемых реактивов, а конечную точку титрования было предложено определять потенциометрически.

Мы воспроизвели данную методику [80]. Объектами исследования выступали образцы субстанции кемантана, кристаллизованной из четыреххлористого углерода, ее технологические примеси: адамантан-2-он, адамантан-2,6-дион.

Количественный анализ кемантана методом оксимирования был выполнен по следующей методике: около 0,15 г препарата (точная навеска) растворяли в 8 мл раствора гидроксиламина гидрохлорида, прибавляли точно 40 мл 0,05 М раствора дифенилгуанидина, перемешивали, оставляли стоять в защищенном от

света месте в течение 30 мин, а затем титровали 0,2 М спиртовым раствором хлорной кислоты. Конечную точку титрования определяли потенциометрически.

Параллельно проводили контрольный опыт.

1 мл 0,2 М спиртового раствора хлорной кислоты соответствует 0,03324 г $C_{10}H_{14}O_2$, которого в пересчете на сухое вещество должно быть не менее 98,5% и не более 101,0%.

Приготовление раствора гидроксиламина гидрохлорида: около 7,0 г гидроксиламина гидрохлорида растворяли в 20 мл воды в мерной колбе вместимостью 200 мл и доводили объем раствора спиртом этиловым 95% до метки, перемешивали.

Приготовление 0,05 М раствора дифенилгуанидина: около 5,3 г дифенилгуанидина (ч., 97%, «Sigma-Aldrich», Германия) растворяли в 200 мл спирта этилового 95% в мерной колбе вместимостью 500 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем, перемешивали.

Приготовление раствора бромфенолового синего: 1 г бромфенолового синего растворяли в 100 мл спирта этилового 95%.

Приготовление 0,2 М спиртового раствора кислоты хлорной: 19,13 мл 65% раствора кислоты хлорной помещали в мерную колбу вместимостью 1 л и доводили объем раствора спиртом этиловым 95% до метки, перемешивали.

Установка титра раствора кислоты хлорной: около 0,4 г (точная навеска) дифенилгуанидина (ч, МРТУ 6-09-4811-67) высушенного при 105°C до постоянной массы, растворяли в 25 мл спирта этилового 95 % и титровали приготовленным раствором кислоты хлорной в присутствии 1 капли спиртового раствора бромфенолового синего до перехода фиолетовой окраски в желтую.

Поправочный коэффициент вычисляли по первому способу, где $T=0,04276$.

Результаты количественного определения кемантана методом оксимирования представлены в Таблице 33.

Таблица 33

Результаты количественного определения серийных образцов субстанции кемантана методом оксимирования

№ серии	736	04	01	162
---------	-----	----	----	-----

№ серии	736	04	01	162
Результат, %	99,30	100,46	102,74	100,03
	100,18	100,66	104,11	102,35
	100,38	100,08	104,49	99,94
	99,64	100,79	103,58	98,86
	100,75	100,22	104,12	99,98
Метрологические характеристики, P=95%, n=5	$\bar{X} = 100,05$	$\bar{X} = 100,44$	$\bar{X} = 103,81$	$\bar{X} = 100,23$
	$S = 0,58$	$S = 0,30$	$S = 0,68$	$S = 1,28$
	$S_{\bar{x}} = 0,26$	$S_{\bar{x}} = 0,13$	$S_{\bar{x}} = 0,30$	$S_{\bar{x}} = 0,57$
	$\Delta\bar{X} = 0,72$	$\Delta\bar{X} = 0,37$	$\Delta\bar{X} = 0,85$	$\Delta\bar{X} = 1,59$
	$\bar{\mathcal{E}} = 0,72 \%$	$\bar{\mathcal{E}} = 0,37 \%$	$\bar{\mathcal{E}} = 0,82 \%$	$\bar{\mathcal{E}} = 1,59 \%$

Согласно данным Таблицы 33, количественное содержание кемантана в образцах технической субстанции, полученной после кристаллизации из четыреххлористого углерода, находилось в пределах от 99,30 до 104,49%; относительная ошибка определения не превышала 1,59 %.

Для установления влияния посторонних примесей, присутствующих в субстанции кемантана, на количественное определение последнего мы проводили исследования по титрованию адамантан-2,6-диона. Было показано, что в указанных выше условиях адамантан-2,6-дион вступает в реакцию с гидроксиламина гидрохлоридом, и процесс оксимирования проходит по двум кето-группам.

Нужно также отметить, что вследствие опасности образования ацеталей и кеталей при использовании данного метода оксимирования рекомендуется строго соблюдать порядок смешивания компонентов.

Таким образом, было показано, что при точном соблюдении описанных выше условий метод оксимирования давал воспроизводимые результаты, однако он имел существенные недостатки, такие как: длительность приготовления реактивов, сложность определения точки эквивалентности, а также присутствие в субстанции кемантана примесей, содержащих кето-группы и вступающих в реакцию с гидроксиламином в условиях титрования.

Поскольку целью нашей работы являлся выбор более специфичного, правильного и воспроизводимого метода количественного определения

субстанции кемантана, то мы изучили возможность применения метода ГЖХ для количественного определения кемантана.

Исследование проводилось на газовом хроматографе Varian GC-450 с ПИД [86]. В качестве растворителя для подготовки проб рассматривали как неполярные (гексан, этилацетат), так и слабо полярные вещества (метанол, этанол, вода). Исходя из растворимости анализируемых веществ, а также влияния на хроматографическое разделение, был использован в качестве растворителя спирт этиловый 95%.

В результате проведенных исследований были выбраны следующие условия: кварцевая капиллярная колонка “CP-WAX 52CB” 50 м, 0,32мм, с нанесенной неподвижной фазой – полиэтиленгликолем, температура испарителя – 220°C, температура термостата – 200 °С, температура детектора – 230 °С, скорость газа-носителя (азот) – 5 мл/мин, скорость газа-поддува (азот) – 25 мл/мин, скорость водорода – 30 мл/мин, скорость воздуха – 300 мл/мин, деление потока – 1:40.

В этих условиях наблюдалось полное разделение кемантана и его технологических примесей (Рисунок 33).

Для количественной оценки содержания кемантана в субстанции был предложен метод внутреннего стандарта.

Выбор стандарта основывался на удовлетворении следующих требований: близкое к определяемому веществу химическое строение и проявление на хроматограмме в виде хорошо разрешенного пика.

В качестве внутреннего стандарта был выбран 1-адамантилэтанол, поскольку данное соединение имеет сходное с определяемым веществом строение, и в указанных условиях хроматографирования его пик полностью разделяется с пиками кемантана, технологическими примесями и пиком растворителя. Типичная хроматограмма модельной смеси кемантана, его технологических примесей и внутреннего стандарта представлена на рисунке 33.

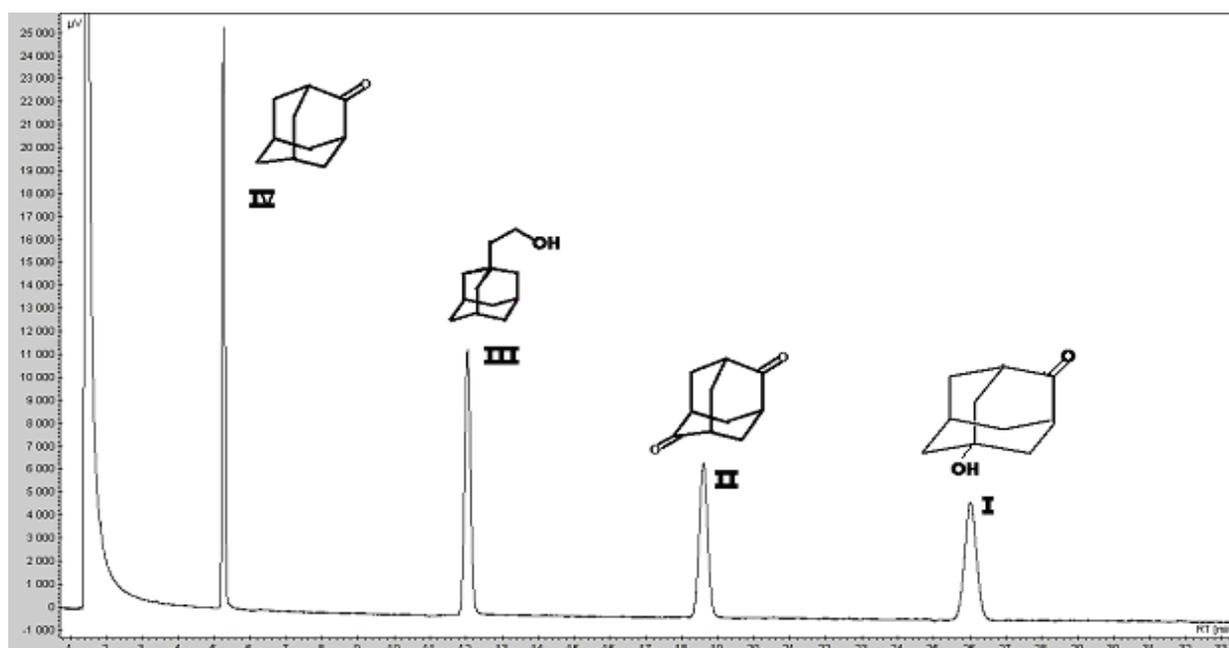


Рисунок 33 - Типичная хроматограмма модельной смеси (концентрация каждого соединения по 0,5 мг/мл): I – кемантан, II - адамантан-2,6-дион, III – 1-адамантилэтанол, IV – адамантан-2-он.

Исследование влияния изменения условий хроматографирования на параметры разделения кемантана, технологических примесей и внутреннего стандарта показало, что варьирование температуры в пределах $\pm 10^{\circ}\text{C}$ приводит к изменению формы пика кемантана: коэффициент асимметрии при 200°C составлял 1,40, при 190°C – 1,47 и при 210°C – 2,75; изменение на 5°C незначительно влияло на симметричность пика кемантана – коэффициент асимметрии возрастал до 1,33 - 1,35.

Изменение скорости потока газа-носителя на ± 1 мл/мин влияло только на время выхода пика вещества, не отражаясь на его форме.

Отсутствие или уменьшение деления потока приводило к перегрузке колонки растворителем (этанолом) и к ухудшению ее эффективности, тогда как увеличение деления потока приводило к снижению чувствительности методики. Оптимальное сочетание эффективности колонки и чувствительности методики наблюдалось при значении деления потока 1:40.

С целью выбора рабочей концентрации кемантана и 1-адамантилэтанола были установлены пределы линейной зависимости площадей пиков от концентрации растворов исследуемых соединений. Линейная зависимость растворов обоих соединений наблюдалась в интервале от 0,01 мг/мл до 1 мг/мл,

значения коэффициентов корреляции составляли 0,9999 (Рисунок 34).

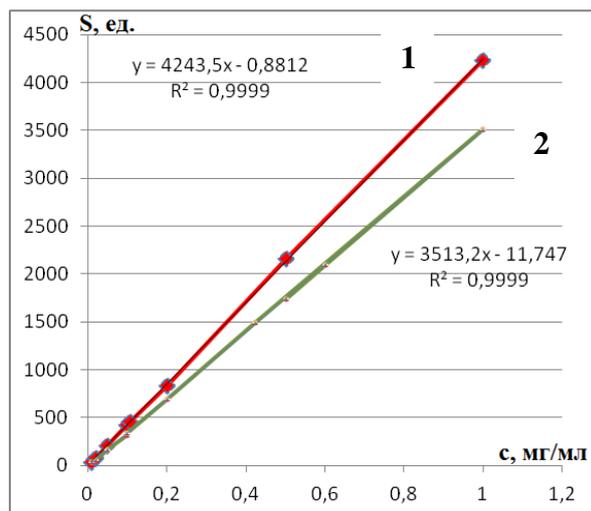


Рисунок 34 - Зависимость площади пика (S) от концентрации (с)
(1 – 1-адамантилэтанол, 2 – кемантан)

Предел обнаружения кемантана – 0,01мкг, 1-адамантилэтанола – 0,005мкг.
Предел количественного определения кемантана – 0,02мкг, 1-адамантилэтанола – 0,01мкг.

На основании полученных данных нами была выбрана рабочая концентрация растворов кемантана и внутреннего стандарта – 0,5 мг/мл. На рисунке 35 представлена типичная хроматограмма модельной смеси кемантана и внутреннего стандарта с концентрацией каждого соединения - 0,5 мг/мл.

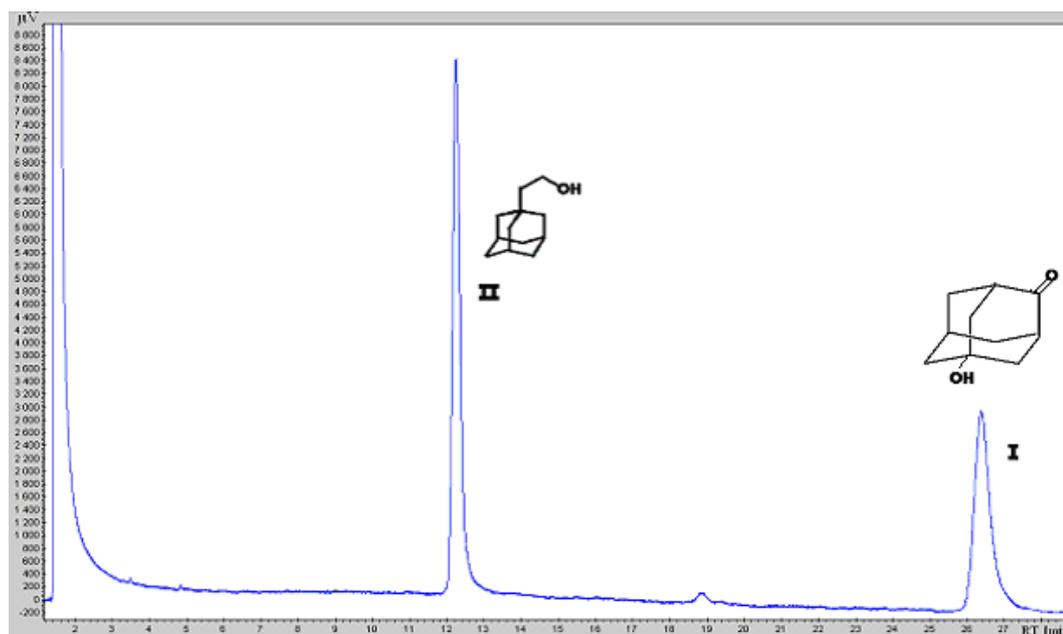


Рисунок 35 - Типичная хроматограмма модельной смеси I – кемантан, II – 1-адамантилэтанол в концентрации 0,5 мг/мл каждый.

В результате проведенных исследований была разработана следующая методика:

- *раствор внутреннего стандарта*: около 0,025 г 1-адамантилэтанола (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл спирта этилового 95%, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали.

- *испытуемый раствор*: около 0,025 г субстанции кемантана (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 10 мл спирта этилового 95%, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали. 5 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, куда предварительно переносили 5 мл раствора внутреннего стандарта, тщательно перемешивали.

Объем вводимой пробы – 1 мкл. Испытуемый раствор хроматографировали в описанных выше условиях, получая не менее пяти хроматограмм.

Содержание кемантана (X, %) рассчитывают по следующей формуле:

$$X(\%) = \frac{S_{\text{кем}} \times K \times C_{\text{ст}} \times P}{S_{\text{ст}} \times C_{\text{кем}}} \times 100\% , \quad (14)$$

где $S_{\text{кем}}$ – площадь пика кемантана на хроматограмме испытуемого раствора, мВ х мин;

$S_{\text{ст}}$ – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора, мВ х мин;

$C_{\text{ст}}$ – концентрация внутреннего стандарта в испытуемом растворе, мг/мл;

$C_{\text{кем}}$ – концентрация кемантана в испытуемом растворе, мг/мл;

K – поправочный коэффициент;

P – содержание основного вещества в стандартном образце 1-адамантилэтанола, в десятичных долях.

Расчет поправочного коэффициента производили на модельных смесях кемантана и внутреннего стандарта. Методика приготовления модельных смесей для расчета поправочного коэффициента аналогична методике приготовления проб для анализа серийных образцов кемантана.

Формула расчета поправочного коэффициента:

$$K = \frac{S_{st} \times C_{кем} \times P_1}{S_{кем} \times C_{st} \times P_2}, \quad (15)$$

где: S_{st} – площадь пика внутреннего стандарта, мВ x мин;

$S_{кем}$ – площадь пика РСО кемантана, мВ x мин;

C_{st} – концентрация раствора внутреннего стандарта, мг/мл;

$C_{кем}$ – концентрация раствора РСО кемантана, мг/мл;

P_1 – содержание основного вещества в РСО кемантана, в десятичных долях;

P_2 – содержание основного вещества в СО внутреннего стандарта, в десятичных долях.

Для количественного определения действующего вещества в субстанции кемантана в качестве стандартного образца использовали наиболее очищенную серию субстанции кемантана, предназначенную для разработки ГСО (см. Главу 4, п.4.1.9).

Валидационные характеристики: правильность, прецизионность (повторяемость и внутрилабораторную прецизионность), оценивали на модельных смесях кемантана и 1-адамантилэтанола (Таблицы 34 и 35).

Таблица 34

Результаты количественного определения кемантана в субстанции на модельных смесях методом ГЖХ

Взято, мг/мл (c_1)	Найдено, мг/мл (c_2)	Абсолютная ошибка, мг/мл ($d=c_2 - c_1$)	Относительная ошибка, % ($Y= dx100/c_1 $)	Найдено кемантана, %	Метрологические характеристики ($P=95\%,n=10$)
0,422	0,424	+0,002	0,47	100,47	$\bar{X} = 100,24\%$ $S = 0,63$ $S_x = 0,20$ $\Delta \bar{X} = 0,45$ $RSD = 0,63$ $t_{выч.} = 1,20$ $t_{табл.} = 2,26$ $\bar{\mathcal{E}} = 0,45 \%$
0,450	0,451	+0,001	0,22	100,22	
0,478	0,478	0	0	100,00	
0,502	0,497	-0,005	1,00	99,00	
0,504	0,501	-0,003	0,60	99,40	
0,508	0,513	+0,005	0,98	100,98	
0,512	0,515	+0,003	0,59	100,59	
0,524	0,525	+0,001	0,19	100,19	
0,576	0,580	+0,004	0,69	100,69	
0,600	0,605	+0,005	0,83	100,83	

Оценка правильности методики: отклонение среднего результата определения от истинного значения не превышает 1 %, относительная погрешность методики ($\bar{\mathcal{E}}$) – менее 1 % (0,45 %).

Оценка прецизионности методики как сходимости получаемых результатов: коэффициент вариации меньше 2 % (0,63 %). Результаты, получаемые по данной методике, не отягощены систематической ошибкой, о чем свидетельствует неравенство: $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ ($1,20 < 2,26$).

Внутрилабораторную прецизионность оценивали на растворах кемантана и 1-адамантилэтанола с концентрацией каждого компонента по 0,5 мг/мл. Анализ модельных растворов проводили в разные дни. Результаты представлены в Таблице 35.

Таблица 35

Результаты определения содержания кемантана в модельных смесях в разные дни

Взято, мг/мл (c_1)	Найдено, мг/мл (c_2)	Абсолютная ошибка, мг/мл ($d=c_2 - c_1$)	Относительная ошибка, % ($Y= d \times 100/c_1$)	Найдено, %	Метрологические характеристики ($P=95\%$, $n=5$)	Метрологические характеристики ($P=95\%$, $n=4$)
0,502	0,488	-0,014	2,79	97,21	$\bar{X}=99,00$ $S=1,16$ $S_{\bar{x}}=0,52$ $\Delta\bar{X}=1,44$ $\bar{\mathcal{E}}=1,45\%$	$\bar{X} = 99,98\%$ $S = 0,94$ $S_{\bar{x}} = 0,47$ $\Delta\bar{X} = 1,49$ $RSD = 0,94$ $t_{\text{выч.}} = 0,04$ $t_{\text{табл.}} = 3,18$ $\bar{\mathcal{E}} = 1,49\%$
	0,502	0	0	100,00		
	0,495	-0,007	1,39	98,61		
	0,502	0	0	100,00		
	0,498	-0,004	0,80	99,20		
0,504	0,501	-0,003	0,60	99,40	$\bar{X}=99,36$ $S=0,58$ $S_{\bar{x}}=0,26$ $\Delta\bar{X}=0,72$ $\bar{\mathcal{E}}=0,72\%$	
	0,501	-0,003	0,60	99,40		
	0,496	-0,008	1,59	98,41		
	0,504	0	0	100,00		
	0,502	-0,002	0,40	99,60		
0,508	0,513	+0,005	0,98	100,98	$\bar{X}=100,90$ $S=0,86$ $S_{\bar{x}}=0,38$ $\Delta\bar{X}=1,07$ $\bar{\mathcal{E}}=1,06\%$	
	0,509	+0,001	0,20	100,20		
	0,511	+0,003	0,59	100,59		
	0,520	+0,012	2,36	102,36		
	0,510	+0,002	0,39	100,39		
0,512	0,519	+0,007	1,37	101,37	$\bar{X}=100,66$ $S=0,88$ $S_{\bar{x}}=0,39$ $\Delta\bar{X}=1,09$ $\bar{\mathcal{E}}=1,08\%$	
	0,510	-0,002	0,39	99,61		
	0,511	-0,001	0,20	99,80		
	0,518	+0,006	1,17	101,17		
	0,519	+0,007	1,37	101,37		

Как показало исследование, коэффициент вариации, который вычислили по полученным в разные дни средним результатам, составлял менее 2 % (0,94%). Относительная ошибка методики также не превышала 2% (как по 5 повторам

одного определения в течение одного дня, так и по средним результатам, полученным в разные дни). Данные свидетельствуют о том, что разработанная методика обладает приемлемой степенью внутрилабораторной прецизионности.

Проверку пригодности хроматографической системы было предложено проводить по относительному времени удерживания кемантана относительно внутреннего стандарта (RRT), а также по числу теоретических тарелок (N), фактору асимметрии (As), относительному стандартному отклонению (RSD) площади пика кемантана. Данные по пригодности хроматографической системы были получены на основе анализа модельных смесей кемантана и 1-адамантилэтанола с концентрацией каждого из соединений по 0,5 мг/мл.

Результаты расчета и критерии приемлемости указанных параметров представлены в Таблице 36.

Таблица 36

Параметры пригодности хроматографической системы

Номер модельной смеси \ параметр пригодности	RRT	As	N	RSD, %
Кемантан	2,15 ± 0,02	1,50 ± 0,09	20351 ± 1571	0,96
	2,15 ± 0,01	1,58 ± 0,02	19507 ± 1345	0,44
	2,15 ± 0,01	1,55 ± 0,17	18562 ± 1872	0,33
Критерии приемлемости:	2,15 ± 0,02	Не более 1,6	Не менее 10000	Не более 2%

С помощью описанной методики был проведен анализ нескольких образцов субстанции кемантана, кристаллизованной из четыреххлористого углерода, ранее проанализированных методом оксимирования.

Результаты количественного определения, полученные методом ГЖХ, представлены в Таблице 37.

Таблица 37

Результаты количественного определения образцов субстанции кемантана методом ГЖХ

№ серии	736	04	01	162
Результат	96,62	101,75	97,46	99,48
	97,01	100,20	100,07	99,42
	98,81	100,24	100,72	99,66
	95,94	100,60	98,53	100,08

№ серии	736	04	01	162
Метрологические характеристики, P=95%, n=4	$\bar{X}=97,10$	$\bar{X}=100,70$	$\bar{X}=99,20$	$\bar{X}=99,66$
	$S=1,23$	$S=0,72$	$S=1,48$	$S=0,30$
	$S\bar{x}=0,62$	$S\bar{x}=0,36$	$S\bar{x}=0,74$	$S\bar{x}=0,15$
	$\Delta\bar{X}=1,96$	$\Delta\bar{X}=1,14$	$\Delta\bar{X}=2,35$	$\Delta\bar{X}=0,48$
	$\bar{\mathcal{E}}=2,02\%$	$\bar{\mathcal{E}}=1,13\%$	$\bar{\mathcal{E}}=2,37\%$	$\bar{\mathcal{E}}=0,48\%$

Как следует из данных, представленных в таблицах 33 и 37, результаты количественного определения некоторых образцов кемантана методом оксимирования и методом ГЖХ значительно отличаются. Так, например, в образце № 736 с помощью метода оксимирования было обнаружено 100,05% кемантана, а методом ГЖХ – 97,10%, значения, полученные для образца № 01, составляли 103,81% и 99,20% соответственно.

Такие результаты, по-видимому, объясняются низкой специфичностью метода оксимирования. Наличие в субстанции кемантана технологической примеси адамантан-2,6-диона мешает количественному определению: содержание этой примеси в образцах № 736, № 04 и № 01 превышает 2,5% и составляет 2,82%, 2,74% и 2,96% соответственно, тогда как в образце № 162 содержится 1,47% адамантан-2,6-диона.

Методика ГЖХ не обладает этим недостатком, что, несмотря на более высокую относительную ошибку определения, на наш взгляд, является ее преимуществом, позволяющим при количественном определении кемантана сделать выбор в ее пользу.

Таким образом, нами была разработана методика количественного определения субстанции кемантана с помощью газожидкостной хроматографии. Показано, что методика ГЖХ по результатам внутрилабораторной воспроизводимости мало уступает разработанному ранее методу оксимирования, а по специфичности и правильности полученных результатов его превосходит.

Разработанная методика ГЖХ валидирована в соответствии с требованиями Руководства Международной Конференции по Гармонизации ICH Q2(R1) [124]. Методика специфична, линейна, чувствительна, правильна и достоверна.

Предложены параметры оценки пригодности хроматографической системы и условия обеспечения надежных результатов (факторы устойчивости методики).

Разработанная методика ГЖХ может применяться в рутинном анализе количественного определения 5-гидроксиадамantan-2-она в субстанции как в фармацевтической, так и в химической промышленности.

Также необходимо отметить, что количественное определение субстанции методом ГЖХ предполагает наличие стандартного образца кемантана. При проведении экспериментальных исследований технических образцов субстанции мы использовали образец с наименьшим содержанием примесей. Однако в случае дальнейшего применения разработанной методики в контроле качества фармацевтической субстанции и включения ее в проект ФСП, необходима разработка стандартного образца на кемантан.

3.4. Нормы качества технической субстанции кемантана

В результате проведенных исследований нами был предложен комплекс методик для контроля качества технической субстанции кемантана и субстанции, кристаллизованной из четыреххлористого углерода.

Контроль качества технических образцов субстанции мы предложили проводить по содержанию посторонних примесей (адамantan-2-она и адамantan-2,6-диона), а также по отсутствию комплексов кемантана с азотной кислотой – показатель «нитриты/нитраты». Появление синего окрашивания в реакции с дифениламином будет свидетельствовать о неполном протекании гидролиза и необходимости повторного разложения комплексов с азотной кислотой. Нормы качества технических образцов субстанции представлены в Таблице 38.

Таблица 38

Показатели и нормы качества технической субстанции кемантана

Показатели	Метод испытания	Нормы
Нитриты/нитраты	Реакция А, с. 163, ГФ XI, вып. 1.	Отсутствие
Посторонние примеси	ГЖХ	примесь адамantan-2-она – не более 0,5% примесь адамantan-2,6-диона - не более 10,0%

После кристаллизации субстанции из четыреххлористого углерода рекомендовано контролировать показатели, представленные в Таблице 39. Присутствие посторонних примесей выше указанной на данном этапе нормы, а также отклонения в технологии получения субстанции могут повлиять на приведенные показатели, что, в конечном счете, может отразиться на качестве готового продукта.

Таблица 39

Показатели и нормы качества технического кемантана после кристаллизации из четыреххлористого углерода

Показатели	Метод испытания	Нормы
Описание	Визуально	Белый или почти белый кристаллический порошок
Растворимость	ГФ XII, ч. 1, с. 92	Легко растворим в воде, спирте этиловом 95 %, хлороформе, практически нерастворим в н-гексане
Прозрачность	ГФ XII, ч. 1, с. 98	2 % раствор субстанции в воде должен быть прозрачным или по степени мутности не превышать эталонный раствор I
Цветность	ГФ XII, ч. 1, с. 93	2 % раствор субстанции в воде должен быть бесцветным или окрашен не более интенсивно, чем эталон В9
pH	ГФ XII, ч.1 с. 85; потенциометрически	От 4,5 до 7,0 (2 % водный раствор)
Посторонние примеси	ГЖХ	примеси адамантан-2-она – не должно быть
ООР	ГФ XII, ч.1, с. 155, ГЖХ	Четыреххлористый углерод – не более 15000 ppm*, Хлороформ – не более 60 ppm, Гексан – не более 290 ppm
Количественное определение	ГЖХ	От 98,5 % до 101,5 %

* Норма содержания четыреххлористого углерода установлена после изучения содержания этого растворителя в субстанции, подвергшейся повторной кристаллизации (см. Главу 4). При содержании в образцах субстанции четыреххлористого углерода 15000 ppm и меньше содержание его в образцах фармацевтической субстанции (в образцах после повторной кристаллизации) будет соответствовать существующим нормам.

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 3

1. Проведен аналитический контроль производства субстанции кемантана на стадии получения технического кемантана из адамантан-2-она по разработанным ранее методикам.

2. Проведена оценка качества технического кемантана до стадии кристаллизации из четыреххлористого углерода.

3. Изучены физико-химические свойства и спектральные характеристики субстанции кемантана после кристаллизации из четыреххлористого углерода. Показано, что методы ИК-, УФ- и ЯМР¹H - спектроскопии могут применяться для оценки качества субстанции.

4. Разработана и валидирована методика определения посторонних примесей в субстанции кемантана с помощью ГЖХ. Показано, что методика обладает большей специфичностью, чем разработанная ранее методика ТСХ.

5. Показана необходимость определения остаточных органических растворителей в субстанции кемантана. Разработана и валидирована методика их определения с помощью ГЖХ.

6. Определено содержание остаточных органических растворителей в субстанции кемантана после кристаллизации из четыреххлористого углерода. Показано, что содержание четыреххлористого углерода в образцах субстанции значительно превышает допустимые значения, а высушивание образцов при температуре 105°C не приводит к значительному снижению содержания этого растворителя. Сделан вывод о необходимости дополнительной стадии очистки субстанции.

7. Разработана и валидирована методика количественного определения субстанции кемантана методом ГЖХ с ПИД. Показано, что методика обладает большей специфичностью и правильностью, чем разработанная ранее методика оксимирования.

8. Разработан комплекс методик анализа для постадийного аналитического контроля производства субстанции кемантана. Установлены нормы качества технической субстанции кемантана и субстанции кемантана после кристаллизации из четыреххлористого углерода, пригодной для получения фармацевтической субстанции кемантана.

ГЛАВА 4. Контроль качества и стандартизация фармацевтической субстанции кемантан

Готовый продукт – фармацевтическую субстанцию кемантан получали в результате проведения дополнительной очистки путем кристаллизации из смеси хлороформ-толуол. Очищенный кемантан высушивали до постоянной массы при 90°C.

Далее представлен контроль качества серийных образцов очищенной субстанции кемантана, проведенный по разработанным нами методикам анализа.

4.1. Фармакопейные показатели качества

4.1.1. Внешний вид

Фармацевтическую субстанцию кемантан по внешнему виду можно охарактеризовать как белый или почти белый кристаллический порошок.

Характер кристаллов субстанции - один из важных параметров, от которого будет зависеть качество изготавливаемых твердых дозированных лекарственных форм [21]. Форма кристаллов кемантана ранее была исследована Н.А. Кисляком: «Кристаллизация кемантана опытных серий НИИ фармакологии АМН СССР проводилась из толуола. Кристаллы этих серий представляют собой бесцветные анизотропные удлиненные дипирамиды и их осколки, коэффициент анизометричности 0,44. Как показал анизометрический анализ, в данных условиях кристаллизации наблюдается явление параллельного срастания. Крупные кристаллы кемантана покрыты рядами выросших на них мелких кристаллов» [34]. Установленная структура кристаллов кемантана являлась причиной крайне неблагоприятного в технологии таблетирования сыпучих порошковых веществ явления слеживания [34].

Поскольку работа, выполненная Н. А. Кисляком и коллегами, проводилась в 80-х годах на образцах субстанции кемантана, полученных способом синтеза, отличным от применяемого на текущий момент, то мы посчитали

целесообразным провести повторное исследование формы кристаллов как технической субстанции кемантана, так и очищенных образцов, а также возможных технологических примесей (адамantan-2-она, адамantan-2,6-диона) и адамantanа.

Полученные нами результаты микроскопического анализа кристаллов субстанции подтвердили данные, представленные Н. А. Кисляком и сотрудниками. Нами впервые были получены снимки микроскопического исследования технических образцов кемантана и потенциальных примесей. На рисунках 36 - 41 видна существенная разница в форме кристаллов: очищенная субстанция кемантана представлена сростками кристаллов в виде палочек или цилиндров с нарощими на них отдельными частичками, размером от 80 до 600 мкм; техническая субстанция представлена отдельными округлыми единицами кристаллов. Для сравнения приведены рисунки микроскопического исследования кристаллов адамantanа (Рисунок 36), технологических примесей в субстанции кемантана: адамantan-2-она (Рисунок 37) и адамantan-2,6-диона (Рисунок 38).



Рисунок 36 - Кристаллы адамantanа



Рисунок 37 - Кристаллы адамantan-2-она

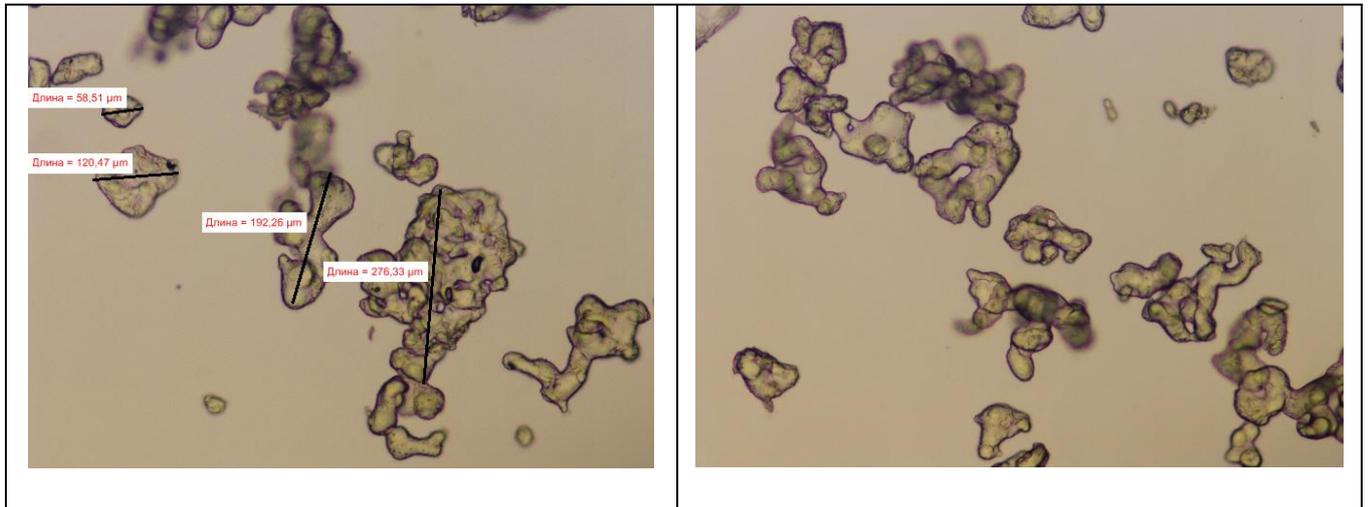


Рисунок 38 - Кристаллы адамантан-2,6-диона

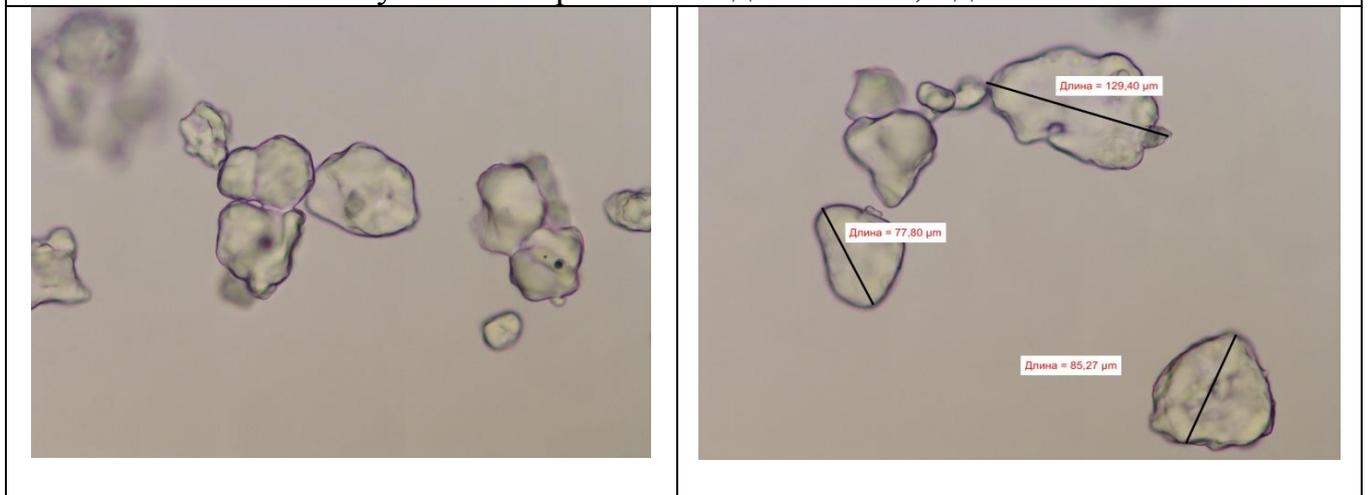


Рисунок 39 - Кристаллы кемантана (образец технической субстанции)

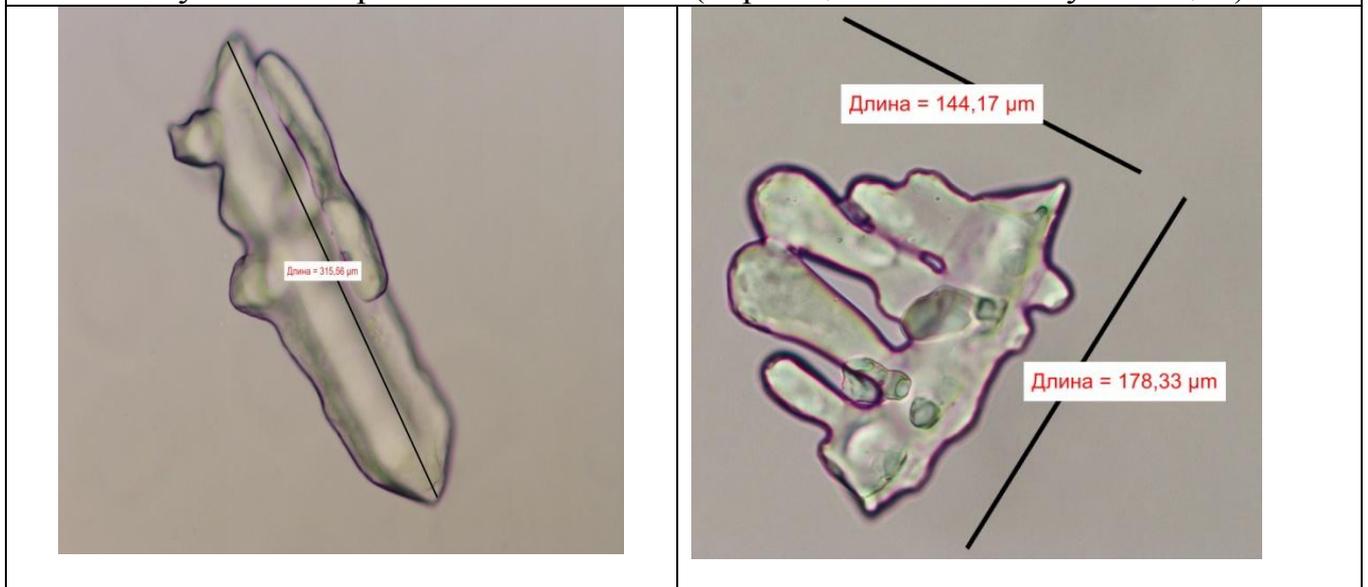


Рисунок 40 - Кристаллы кемантана (образец субстанции кемантана после кристаллизации из четыреххлористого углерода)

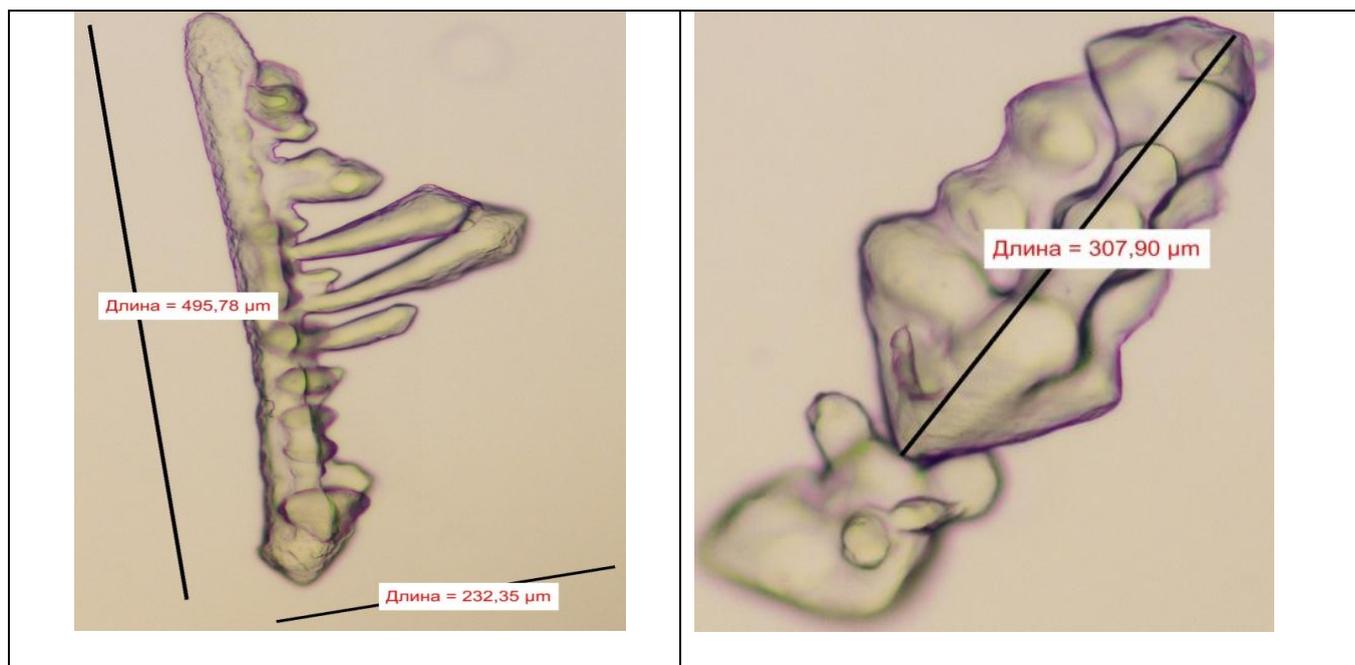


Рисунок 41 - Кристаллы кемантана (очищенный образец субстанции кемантана после кристаллизации из толуола)

4.1.2. Растворимость. Определение растворимости проводили по методике ГФ XII, ч. 1, стр. 92. Растворимость субстанции кемантана проведена в растворителях различной полярности: воде, спирте этиловом 95%, хлороформе, н-гексане. Результаты представлены в Таблице 40.

Таблица 40

Данные по растворимости очищенной субстанции кемантана в различных растворителях. Анализ серий

№ Серии	110	227	114	115
Растворитель	(1 г в ... мл)			
вода	легко растворима (1:3-1:4)	легко растворима (1:3-1:4)	легко растворима (1:4-1:5)	легко растворима (1:3-1:4)
спирт этиловый, 95%	легко растворима (1:3)	легко растворима (1:3)	легко растворима (1:3)	легко растворима (1:3)
хлороформ	легко растворима (1:2-1:3)	легко растворима (1:2-1:3)	легко растворима (1:2-1:3)	легко растворима (1:2-1:3)
н-гексан	практически нерастворима (1: более 10000)			

Как видно из Таблицы 42, все образцы очищенной субстанции кемантана легко растворимы в воде, спирте этиловом 95 %, хлороформе и практически нерастворимы в н-гексане.

4.1.3. Подлинность

4.1.3.1. ИК-спектроскопия

В инфракрасных спектрах серийных образцов фармацевтической субстанции кемантана, снятых в диске с калия бромидом (Рисунок 42), в области от 4000 до 400 см^{-1} наблюдались те же полосы поглощения, что и в субстанции, кристаллизованной из четыреххлористого углерода (см. Рисунок 9).

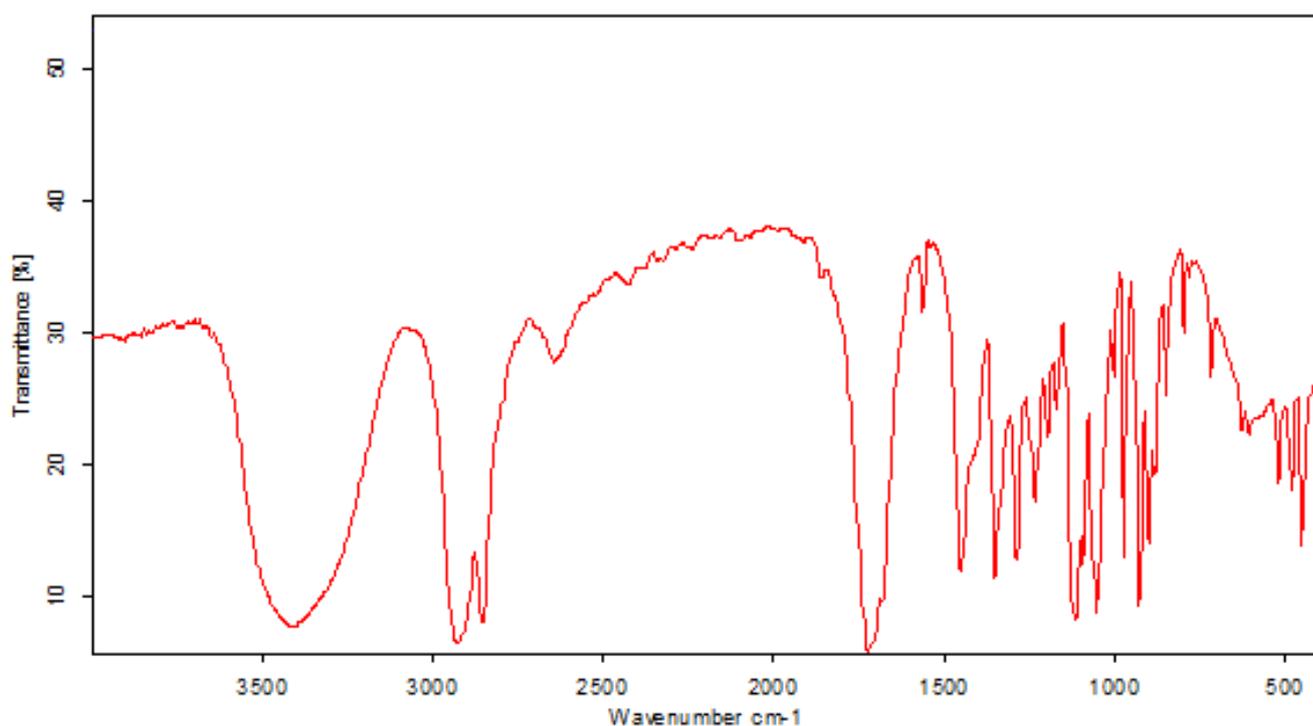


Рисунок 42 - ИК-спектр субстанции кемантана, снятый в дисках KBr (область 4000-400 см^{-1}).

В спектрах серийных образцов фармацевтической субстанции кемантана присутствуют следующие характеристические полосы (см^{-1}): 3404-3399 – полоса валентных связанных колебаний вторичной спиртовой группы O-H (3413), 2923 (2927) и 2855 (2856) – полосы валентных колебаний метиленовых групп (C-H) адамантанового цикла, 1725-1707 – полоса валентных колебаний карбонильной

группы (C=O), 1451 и 1351 – деформационные колебания C-H, 1288 и 1115 – деформационные колебания C-O и O-H.

Методика ИК-спектроскопии в дисках калия бромида предложена для проведения идентификации фармацевтической субстанции кемантана.

4.1.3.2. УФ-спектроскопия

Ультрафиолетовые спектры поглощения 0,2 % водных растворов серийных образцов фармацевтической субстанции кемантана в области от 220 до 350 нм имели один максимум при 285 ± 2 нм (Рисунок 43).

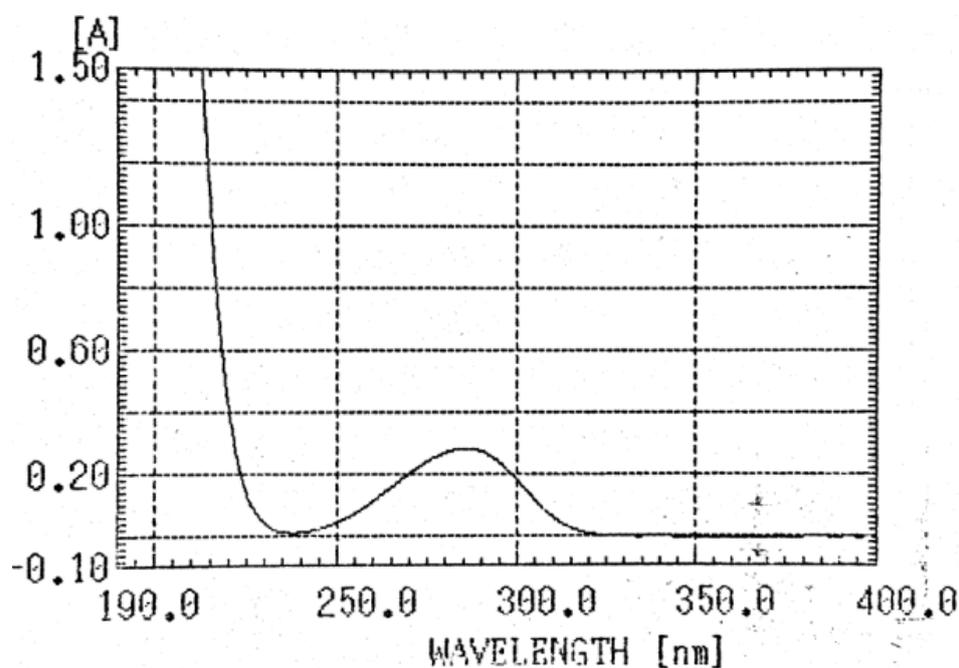


Рисунок 43 – Раствор фармацевтической субстанции кемантана в воде 2,0 мг/мл: $\lambda_{\max} = 285,0 \pm 2$ нм, $D = 0,284$; $\lambda_{\min} = 240,0$, $D = 0,055$

4.1.3.3. ЯМР ^1H - спектроскопия

ЯМР ^1H - спектры регистрировали в шкале δ , м.д., на спектрометре Bruker AC-250 (Германия) в растворах CDCl_3 , используя в качестве внутреннего стандарта тетраметилсилан.

Спектр ЯМР: 2,69 (2 H, д, C^1H , C^3H), 2,32 (1H, т, C^7H), 1,90-2,10 (10 H, м, C^7H_2 , C^6H_2 , C^8H_2 , C^{10}H_2), 1,89 (1H, с, -OH) (Рисунок 44).

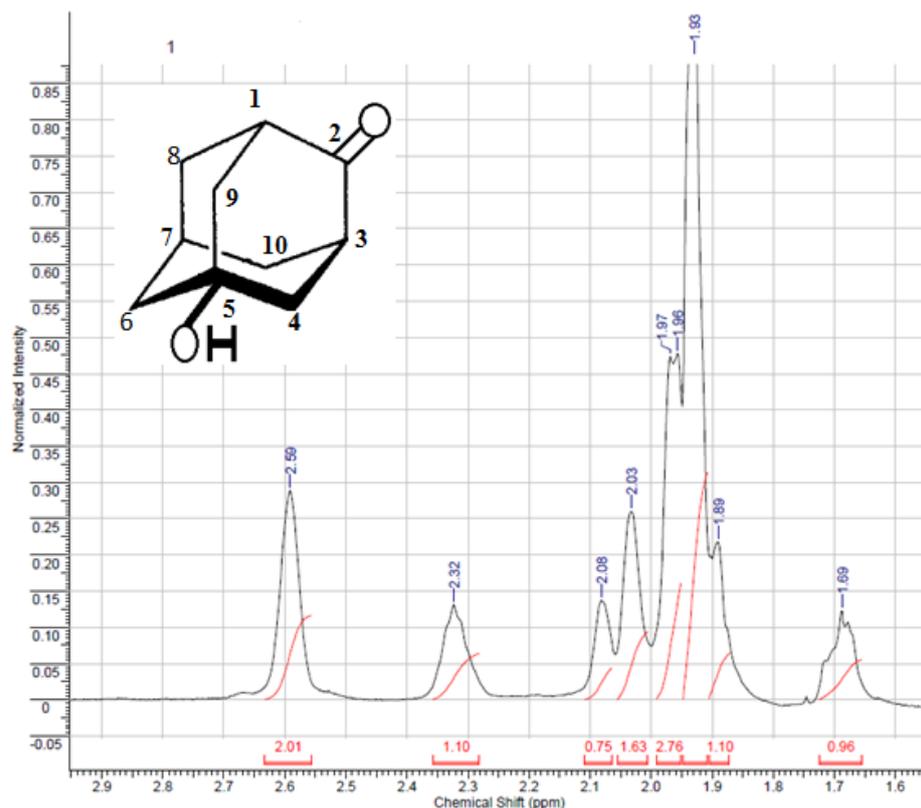


Рисунок 44 – ЯМР ^1H – спектр образца очищенной субстанции кемантана

4.1.4. Определение цветности, прозрачности и степени мутности, pH растворов фармацевтической субстанции кемантана

Прозрачность, степень мутности и окраску полученных растворов определяли по методике ГФ XII, ч. 1, с. 93 и с. 98. Значение pH определяли потенциометрически (ГФ XII, с. 85). Анализу подвергали 2% водный раствор кемантана (200 мг субстанции в 10 мл воды очищенной). Результаты анализа представлены в Таблице 41.

Таблица 41

Результаты определения прозрачности и цветности 2% водных растворов очищенных образцов субстанции кемантана. Анализ серий

№ опыта	110	114	115	227
Показатель				
Прозрачность	Прозрачный	Прозрачный	Прозрачный	Прозрачный
Цветность	Бесцветный	Бесцветный	Бесцветный	Бесцветный
pH	5,14	4,53	5,06	6,02

Из данных, представленных в Таблице 41, видно, что все растворы очищенной субстанции кемантана в воде были бесцветными и прозрачными.

4.1.5. Определение показателя «Температура плавления»

Анализ проводили по методике ГФ XII, ч. 1, с. 29. Скорость подъема температуры – 3,0°C в минуту. Поскольку, как показали исследования, кемантан возгоняется при температуре выше 100°C, то образцы предварительно высушивали при 60°C в течение 3-5 часов до постоянной массы. (ГФ XI, вып. 1, с. 16). Определение вели в запаянных капиллярах. Точка плавления изучаемой субстанции находится в интервале температур: от 318°C до 329°C (метод I, ГФ XII, ч. 1, с. 29). Результаты анализа представлены в Таблице 42.

Таблица 42

Температура плавления образцов фармацевтической субстанции кемантана

№ серии	110	114	115	227
Т пл., °С	323,8-327,3	318,0-324,2	320,9-328,1	322,0-327,1

В связи с тем, что при определении температуры плавления наблюдается разложение субстанции с одновременной возгонкой, было предложено не использовать показатель «Температура плавления» в качестве критерия качества фармацевтической субстанции кемантана.

4.1.6. Определение летучих веществ и воды

Ранее для контроля качества субстанции кемантана было предложено определять потерю в массе при температуре 60°C.

Нами этот показатель был установлен в соответствии с требованиями, изложенными в ОФС «Определение летучих веществ и воды», ГФ XI, вып.1,с.176.

Для выбора оптимальной температуры высушивания образцов субстанции, полученных по усовершенствованной технологии, были проведены исследования: точные навески субстанции (не менее 0,5 г), отвешенные в заранее подготовленные бюксы, помещали в сушильные шкафы с различной температурой термостата (60°C и 105°C). Через заданные промежутки времени анализировали потерю в массе: спустя 3, 4, 5 часов от начала высушивания (см. Таблицу 43). Параллельно проводили анализ содержания воды в образцах методом К. Фишера (Таблица 44) и определяли содержание остаточных

органических растворителей (Таблица 45). В перекристаллизованных образцах кемантана возможно присутствие ООР, использующихся на всех стадиях синтеза, а именно: четыреххлористого углерода, хлороформа, н-гексана и толуола. Определение содержания ООР проводили методом ГЖХ по методике, разработанной для технической субстанции (см. Главу 3).

Таблица 43

Результаты определения потери в массе при высушивании серийных образцов фармацевтической субстанции кемантана

№ серии	110		114		115		227	
Т °С	60°С	105°С	60°С	105°С	60°С	105°С	60°С	105°С
Время (ч)								
3	0,17	0,45	0,26	0,96	0,19	0,41	0,13	0,40
4	0,02	0,02	0	0,21	0	0,07	0,02	0,03
5	0	0,02	0,02	0,10	0,04	0,06	0	0,02
итого: Δm, %	0,19	0,49	0,28	1,27	0,23	0,54	0,15	0,45

Таблица 44

Результаты определения воды в образцах фармацевтической субстанции кемантана методом титрования по К.Фишеру

№ серии	110	114	115	227
% Воды	0,14	0,70	0,69	0,20

Таблица 45

Содержание остаточных органических растворителей в фармацевтической субстанции кемантана

№ п/п	Номер серии	Содержание ООР, ppm			
		Четыреххлористый углерод	Хлороформ	н-Гексан	Толуол
ПДК ООР:		4	60	290	890
1	110	3,0	60,0	5,8	90,7
2	227	н/о	56,9	н/о	423,0
3	114	4,0	58,0	18,6	278,0
4	115	4,0	50,0	239,0	289,0

*н/о – не обнаружен

Как видно из Таблицы 45, содержание ООР в фармацевтической субстанции кемантана не превышало допустимые нормы (ГФ XII изд., ч. I, с. 115).

Приведенные в Таблицах 43 - 45 данные свидетельствует о том, что при 60°C из образцов не происходит полного удаления воды, а при 105°C удаляется не только вода и летучие органические растворители, а, возможно, частично и сам кемантан и/или адамантан-2,6-дион: потеря в массе образцов при высушивании при 105°C в течение 5 часов превышает сумму присутствующих в них ООР и воды.

В связи с вышеизложенным было рекомендовано определять содержание воды в очищенных образцах кемантана методом титрования по К. Фишеру, а содержание летучих веществ (остаточных органических растворителей) – методом ГЖХ с ПИД. Установлена норма влажности – не более 1,0%.

4.1.7. Определение посторонних примесей

Контроль содержания посторонних примесей в фармацевтической субстанции кемантана проводили методом ГЖХ по разработанной ранее методике (см. Главу 3). Результаты представлены в Таблице 46.

Таблица 46

Содержание адамантан-2,6-диона в фармацевтической субстанции кемантана

№ образца / Содержание примеси, %	110	114	115	227
адамантан-2,6-дион, %	0,94	1,15	1,16	1,32
адамантан-2-он, %	отсутствует			

По результатам исследования серийных образцов субстанции кемантана в качестве нормы принято: в очищенной субстанции кемантана должен отсутствовать адамантан-2-он, но допускается содержание побочного продукта синтеза (адамантан-2,6-диона) – не более 2,5%.

4.1.8. Количественное определение содержания кемантана в фармацевтической субстанции

Количественное определение кемантана в фармацевтической субстанции проводили методом ГЖХ по методике, разработанной для технической субстанции (см. Главу 3). Результаты представлены в Таблице 47.

Количественное содержание кемантана в фармацевтической субстанции

№ образца	110	114	115	227
Содержание кемантана, %	98,83	99,2	99,4	99,23

По результатам исследования серийных образцов субстанции кемантана в качестве нормы принято: содержание кемантана в очищенной субстанции должно быть в пределах от 98,5 % до 101,5 % (см. Главу 3).

4.1.9. Установление норм качества для стандартного образца субстанции кемантана

В качестве стандартного образца для расчета количественного содержания действующего вещества в субстанции был выбран синтезированный в опытно-технологическом отделе образец фармацевтической субстанции кемантана.

Перечень показателей качества стандартного образца субстанции кемантана соответствовал таковому фармацевтической субстанции (см. Таблицу 48). Однако контроль стандартного образца по показателю «микробиологическая чистота» не проводили, но предъявляли более строгие требования к содержанию посторонних примесей (адамantan-2-она, адамantan-2,6-диона).

Чистота стандартного образца определялась по формуле [16]:

$$G(\%) = \frac{G' \times (100\% - RS - W - A)}{100}, \quad (16)$$

где G – содержание стандартного образца, в процентах;

G' – содержание стандартного образца, полученное посредством ГЖХ (расчет: метод 100% площадей или нормализации), в процентах;

RS – содержание ООР, в процентах;

W – содержание воды и летучих веществ, в процентах;

A – содержание сульфатной золы и тяжелых металлов, в процентах.

На основании проведенных исследований и полученных результатов были установлены предварительные нормы качества стандартного образца субстанции кемантана, представленные в Таблице 48.

Предварительные нормы качества стандартного образца кемантана

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Описание	Визуальный	Белый или почти белый кристаллический порошок без запаха
Растворимость	ГФ XII, ч. 1, с. 92	Легко растворим в воде, спирте этиловом 95%, ацетоне, хлороформе, практически нерастворим в н-гексане
Подлинность	ИК-спектроскопия	ИК-спектр субстанции по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра кемантана
	УФ-спектроскопия	УФ-спектр поглощения 2% раствора субстанции в воде в области от 250 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при 285 ± 2 нм
Прозрачность раствора	ГФ XII, ч. 1, с. 98	2 % раствор субстанции в воде должен быть прозрачным или по степени мутности не превышать эталон I
Цветность раствора	ГФ XII, ч. 1, с. 93	2 % раствор субстанции в воде должен быть бесцветным или окрашен не более интенсивно, чем эталон B9
pH	ГФ XII, ч. 1, с. 85; потенциометрически	От 4,5 до 7,0
Посторонние примеси	ГЖХ	Примесь адамантан-2-она должна отсутствовать; примесь адамантан-2,6-диона – не более 1,5%
Сульфатная зола	ГФ XII, ч. 1, с. 115	Не более 0,1%
Тяжелые металлы	ГФ XII, ч. 1, с. 121	Не более 0,001%
Вода	ГФ XI, вып. 1, с. 176	Не более 1,0%
Остаточные органические растворители	ГЖХ	Четыреххлористый углерод – не более 4 ppm Хлороформ – не более 60 ppm Гексан – не более 290 ppm Толуол – не более 890 ppm
Количественное определение	ГЖХ	более 98,5 %
Упаковка	По 0,5 г в банки из стекломассы с винтовой горловиной. Банки укупоривают навинчиваемыми крышками. Крышку обортывают пергаментом, обвязывают нитками и заливают парафином. Банки заворачивают в бумагу светонепроницаемую.	
Маркировка	На этикетке указывают министерство, предприятие-изготовитель и его товарный знак, название препарата на латинском и русском языках, массу препарата, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности	
Область применения	Для определения показателей «Подлинность», «Посторонние примеси» и «Количественное определение» субстанции	
Хранение	В сухом, защищенном от света месте, при температуре от +15°C до +25°C	
Срок годности	2 года	

4.2. Изучение стабильности субстанции кемантана при хранении, установление сроков годности

Изучение стабильности фармацевтической субстанции кемантана проводили методом «ускоренного старения» в банках из стекломассы с винтовой горловиной для лекарственных средств и с навинчиваемой пластмассовой крышкой (ГОСТ 17768-90) при температурном режиме 60°C в соответствии с инструкцией И 42-8-82 [19]. Анализ испытуемых образцов проводили по истечению срока, эквивалентного 1 году (23 суток) и 2 годам (46 суток) хранения при температуре от +15°C до +25°C. Общий срок экспериментального хранения - 46 суток.

Результаты анализа, приведенные в Таблице 49, свидетельствуют, что качество образцов субстанции кемантана в течение указанного срока хранения при 60°C не изменилось, все образцы по истечению экспериментального срока хранения удовлетворяли требованиям проекта ФСП на субстанцию кемантана.

На основании результатов проведенного эксперимента установлен предварительный срок годности субстанции кемантана – 2 года.

Таблица 49

Результаты хранения субстанции кемантана методом «ускоренного старения» при 60°C

Номер серии образца	Срок хранения, сут.	Внешний вид	Прозрачность 2% р-р в воде	Цветность 2% р-р в воде	Вода (%)	pH	Посторонние примеси, % (ГЖХ)	Количественное определение, % (ГЖХ)	ООР, ppm
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
227	0	Белый кристаллический порошок	Прозрачный	Бесцветный	0,20	6,02	1,32	99,03	хлороформ -56,9 толуол – 423,0
	23	Белый кристаллический порошок	Прозрачный	Бесцветный	-	5,47	1,30	98,81	хлороформ -56,8 толуол –404,0
	46	Белый кристаллический порошок	Прозрачный	Бесцветный	-	5,50	1,34	98,94	-
110	0	Белый кристаллический порошок	Прозрачный	Бесцветный	0,14	5,14	0,94	98,69	ЧХУ – 3,3 хлороформ -60,0 гексан – 5,8, толуол –90,7
	23	Белый кристаллический порошок	Прозрачный	Бесцветный	-	5,00	0,93	98,66	ЧХУ – 2,0 хлороформ – 58,0 гексан – 2,0 толуол – 85,0
	46	Белый кристаллический порошок	Прозрачный	Бесцветный	-	4,86	0,92	98,55	-

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
114	0	Белый кристаллический порошок	Прозрачный	Бесцветный	0,70	4,53	1,15	98,50	ЧХУ – 4,0 Хлороформ-58,0 Гексан –18,6 Толуол -278,0
	23	Белый кристаллический порошок	Прозрачный	Бесцветный	-	4,51	1,12	98,58	ЧХУ – 4,0 Хлороформ-57,3 Гексан –17,0 Толуол -273,0
	46	Белый кристаллический порошок	Прозрачный	Бесцветный	-	4,52	1,10	98,51	-
115	0	Белый кристаллический порошок	Прозрачный	Бесцветный	0,69	5,06	1,16	98,71	ЧХУ – 4,0 Хлороформ-50,0 Гексан – 239,0 Толуол -289,0
	23	Белый кристаллический порошок	Прозрачный	Бесцветный	-	4,92	1,10	100,29	ЧХУ – 4,0 Хлороформ – 50,0 Гексан –217,0 Толуол -262,0
	46	Белый кристаллический порошок	Прозрачный	Бесцветный	-	4,86	1,11	99,86	-

4.3. Установление норм качества фармацевтической субстанции кемантана

На основании проведенных исследований и полученных результатов были установлены предварительные нормы качества фармацевтической субстанции кемантана, представленные в Таблице 50.

Результаты экспериментальных исследований, разработанные методики и нормы качества использованы при составлении проекта ФСП на субстанцию кемантана (Приложение Б).

Таблица 50

Нормы качества фармацевтической субстанции кемантан

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Описание	Визуальный	Белый кристаллический порошок без запаха
Растворимость	ГФ XII, ч. 1, с. 92	Легко растворим в воде, спирте этиловом 95 %, ацетоне, хлороформе, практически нерастворим в гексане
Подлинность	ИК-спектроскопия	ИК-спектр субстанции по положению полос поглощения должен соответствовать рисунку спектра кемантана
	УФ-спектроскопия	УФ-спектр поглощения 2% раствора субстанции в воде в области от 250 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при 285±2нм
Прозрачность раствора	ГФ XII, ч. 1, с. 98	2 % раствор субстанции в воде должен быть прозрачным или по степени мутности не превышать эталон I
Цветность раствора	ГФ XII, ч. 1, с. 93	2 % раствор субстанции в воде должен быть бесцветным или окрашен не более интенсивно, чем эталон В9
pH	ГФ XII, ч. 1, с.85; потенциометрически	От 4,5 до 7,0 (2 % водный раствор)
Посторонние примеси	ГЖХ	Примесь адамантан-2-она должна отсутствовать; примесь адамантан-2,6-диона – не более 2,5%
Сульфатная зола	ГФ XII, ч. 1, с. 115	Не более 0,1%
Тяжелые металлы	ГФ XII, ч. 1, с. 121	Не более 0,001%
Вода	ГФ XI, вып. 1, с. 176 (метод К. Фишера)	Не более 1,0%
Остаточные органические растворители	ГЖХ	Четыреххлористый углерод – не более 4 ppm Хлороформ – не более 60 ppm Гексан – не более 290 ppm Толуол – не более 890 ppm
Микробиологическая чистота	ГФ II, ч.1, с. 160	Категория 2.2

ПОКАЗАТЕЛИ	МЕТОДЫ	НОРМЫ
Количественное определение	ГЖХ	От 98,5 до 101,5 %
Упаковка	<p>По 0,5; 1 кг в банки из оранжевого стекла с винтовой горловиной для лекарственных средств вместимостью от 0,5 до 2,0 л по ОСТ 64-2-71-80 с навинчиваемыми пластмассовыми крышками по ОСТ 64-2-87-81 и прокладками из картона прокладочного по ГОСТ 7933-89.</p> <p>На банку наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86 или писчей по ГОСТ 18510-87.</p> <p>Допускается изменять массу препарата в первичной упаковке в соответствии с заявками потребителей.</p> <p>Групповая и транспортная тара в соответствии с ГОСТ 17768-90.</p>	
Маркировка	<p>На этикетке указывают название препарата на латинском и русском языках, торговое название субстанции, МНН, наименование компании-владельца регистрационного удостоверения, ее товарный знак, адрес, количество лекарственного средства в упаковке, номер серии, дату выпуска, срок годности, условия хранения, назначение, предупредительные надписи.</p> <p>Маркировка групповой и транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96 и МУ 9467-015-05749470-98</p>	
Хранение	В сухом, защищенном от света месте, при температуре от +15°C до +25°C	
Срок годности	2 года	

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 4

1. Посредством микроскопического исследования проведен сравнительный анализ внешнего вида кристаллов субстанции кемантана и потенциальных примесей в ней. Продемонстрированы различия между техническими, кристаллизованными из четыреххлористого углерода и фармацевтическими образцами субстанции кемантана по форме и организации кристаллов.

2. Изучены спектральные характеристики фармацевтической субстанции кемантана методами ИК-, УФ- и ЯМР¹H - спектроскопии. Показано, что методы ИК-, УФ- и ЯМР¹H - спектроскопии могут применяться для оценки качества субстанции.

3. Определены фармакопейные показатели качества фармацевтической субстанции кемантана: внешний вид, растворимость в различных растворителях, прозрачность, цветность, рН 2% водных растворов, температура плавления, содержание летучих веществ (ООР) и воды. Показано, что при определении показателя «потеря в массе при высушивании» при 60°C не происходит полного удаления воды из образцов, а при 105°C удаляется не только вода и летучие органические растворители, но, возможно, частично и сам кемантан и/или адамантан-2,6-дион. Определение воды рекомендовано определять методом К.Фишера, а содержание остаточных органических растворителей – методом ГЖХ. Из-за сложности точного определения показатель «Температура плавления» принято не вносить в проект ФСП на субстанцию кемантана.

4. Проведен количественный анализ содержания примесей и действующего вещества в субстанции кемантана.

5. Изучена стабильность субстанции кемантана при хранении методом «ускоренного старения» при 60°C. На основании проведенного эксперимента установлен предварительный срок годности субстанции кемантана – 2 года, рекомендуемая температура хранения – от +15°C до +25°C.

6. Установлены нормы качества образцов фармацевтической субстанции кемантана, а также нормы качества стандартных образцов субстанции кемантана. Результаты экспериментальных исследований, разработанные методики и нормы качества использованы при составлении проекта ФСП на субстанцию кемантана (Приложение Б).

ГЛАВА 5. Разработка методик анализа и стандартизация твердой дозированной лекарственной формы - таблетки кемантана 100 мг

По результатам исследований, проведенных в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», рекомендована оптимальная дозировка кемантана в пероральной лекарственной форме - 100 мг. В лаборатории готовых лекарственных форм ОТО ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» была разработана твердая дозированная лекарственная форма – таблетки кемантана, 100 мг. Для приготовления готовой лекарственной формы применяли технологию прямого прессования. Средняя масса таблетки – 0,200 г.

Перед нами стояли следующие задачи:

- 1) разработать методики анализа таблеток кемантана, 100 мг и провести анализ серийных образцов в соответствии с требованиями ГФ XI, вып. 2, с. 154;
- 2) изучить стабильность таблеток при хранении;
- 3) установить научно обоснованные нормы качества и сроки годности.

Для разработки ФСП на таблетки кемантана в лаборатории готовых лекарственных форм ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» были изготовлены 8 серий таблеток: 01, 04, 724.09, 756.09, 151.12, 724.12, 117.12, 756.12. Полный контроль качества и разработка нормативной документации были осуществлены на 3 сериях таблеток кемантана: 117.12, 724.12, 756.12. Остальные экспериментальные образцы использовались в процессе разработки и валидации методик анализа готовой лекарственной формы.

5.1. Основные фармакопейные показатели качества таблеток кемантана

5.1.1. Внешний вид

Внешний вид всех серийных образцов таблеток соответствовал требованиям ГФ XI, вып. 2, с. 154. Таблетки белого или почти белого цвета, двояковыпуклой

формы, без риски.

5.1.2. Средняя масса таблеток

Определение средней массы проводилось в соответствии с требованиями ГФ XI изд., вып. 2, с. 156: взвешивали 20 таблеток одной серии с точностью до 0,001 г. Отклонение в массе отдельных таблеток массой более 0,1 г и менее 0,3 г допускается в пределах $\pm 7,5$ % (ГФ XI, вып.2, с. 156). Средняя масса таблеток кемантана и отклонения в массе отдельных таблеток представлены в Таблице 51.

Таблица 51

Результаты определения показателя «Средняя масса и отклонение от средней массы» таблеток кемантана

№ серии	Средняя масса, мг	Отклонение от средней массы, %
01	0,1999	$\pm 3,25$
04	0,2001	$\pm 3,55$
724.09	0,2000	$\pm 2,50$
756.09	0,1995	$\pm 3,86$
724.12	0,2028	$\pm 2,66$
756.12	0,2050	$\pm 2,39$
117.12	0,2022	$\pm 2,87$
151.12	0,2018	$\pm 2,87$

Как видно из Таблицы 51, средняя масса образцов таблеток составляла от 0,1995 г до 0,2050 г, отклонения от средней массы отдельных таблеток не превышали ± 4 %, что укладывается, согласно требованиям ГФ XI, в рамки установленных норм: отклонение $\pm 7,5$ %, средняя масса – от 0,1850 до 0,2150 г.

5.1.3. Определение распадаемости таблеток

Определение показателя «Распадаемость» таблеток проводили в соответствии с ГФ XI изд., вып. 2, с. 156. Таблетки должны распадаться за интервал времени, не превышающий 15 минут. Результаты определения представлены в Таблице 52.

Таблица 52

Результаты показателя «Распадаемость» таблеток кемантана

№ серии	Результат
01	8 мин 40 сек
04	10 мин 33 сек

№ серии	Результат
724.09	7 мин 57 сек
756.09	10 мин 40 сек
724.12	3 мин 57 сек
756.12	8 мин 37 сек
117	8 мин 00 сек
151	5 мин 04 сек

Полученные результаты свидетельствуют о том, что время распадаемости таблеток кемантана не превышает 15 минут, что соответствует требованиям ГФ XI, вып. 2, с. 156.

5.1.4. Разработка методики определения посторонних примесей и идентификации кемантана в таблетках

Контроль таблеток кемантана по показателю «Посторонние примеси» проводили методом ГЖХ. Для анализа использовали условия, подобранные для контроля чистоты субстанции кемантана (см. Главу 3). Для подтверждения приемлемости выбранных условий анализа таблеток кемантана была проведена валидация методики по параметрам: правильность, прецизионность.

Специфичность выбранной методики в отношении кемантана и его примесей была доказана ранее (см. Главу 3). С целью установления отсутствия влияния плацебо на получаемые результаты готовили извлечения из плацебо: около 0,1 г (точная навеска) плацебо (эквивалентно содержанию в таблетке) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 20 мл спирта этилового 95%, помещали в УЗВ на 10 мин. Затем доводили тем же растворителем до метки, тщательно перемешивали и фильтровали через фильтр типа «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. Полученный фильтрат анализировали на ГЖХ с ПИД, получая не менее трех хроматограмм. На хроматограммах профильтрованных извлечений из плацебо не было каких-либо пиков, помимо пика растворителя.

Для подтверждения отсутствия влияния вспомогательных веществ на результаты анализа, а также с целью оценки методики по характеристикам «правильность», «прецизионность», готовили модельные растворы, содержащие

адамantan-2,6-дион в интервале концентраций от 20 до 200 % от номинального значения, внутренний стандарт – адамantan в концентрации 0,05 мг/мл, вспомогательные вещества - из расчета эквивалентного содержания в таблетках (0,1 г плацебо на 50 мл спирта этилового 95 %). Поскольку адамantan-2-он как одна из технологических примесей отсутствует во всех образцах очищенной субстанции кемантана, соответственно, в таблетках ее присутствие также не ожидается. В связи с этим адамantan-2-он не использовался при приготовлении модельных растворов.

Параллельно анализировали стандартный раствор для определения поправочного коэффициента: около 0,025 г (точная навеска) адамantan-2,6-диона помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл. Растворяли в 50 мл спирта этилового 95 %. Доводили до метки тем же растворителем. Переносили 10 мл раствора в другую колбу на 50 мл, куда предварительно отмеривали 10 мл внутреннего стандарта – адаманта с концентрацией 0,25 мг/мл (25 мг адаманта в 100 мл спирта этилового 95 %). Поправочный коэффициент пересчета содержания адамantan-2,6-диона на адамantan (внутренний стандарт) составлял - $1,37 \pm 0,05$.

Приготовленные растворы хроматографировали, получая не менее 3 хроматограмм для каждого, результаты усредняли. Данные исследования приведены в Таблице 53.

Таблица 53

Результаты определения содержания адамantan-2,6-диона в модельных смесях.

Взято (c_1), мг/мл	Найдено (c_2), мг/мл	Абсолютная ошибка, ($d = c_2 - c_1$)	Относительная ошибка результата $X = (d \times 100 / c_1)$, %	Найдено в среднем, %	Метрологические характеристики $n=8, P=95\%$
0,0106	0,0105	-0,0001	0,94	99,06	$X_{ср} = 100,43$ $S^2 = 2,24$ $S = 1,5$ $Sx_{ср} = 0,53$ $\Delta X_{ср} = 1,25$ $RSD = 1,49$ $\varepsilon = 1,24\%$ $t_{выч.} = 0,81$ $t_{табл.} = 2,36$
0,0250	0,0257	+0,0007	2,80	102,80	
0,0420	0,0422	+0,0002	0,48	100,48	
0,0500	0,0501	+0,0001	0,20	100,20	
0,0504	0,0496	-0,0008	1,59	98,41	
0,0508	0,0520	+0,0012	2,36	102,36	
0,0610	0,0610	0	0	100,00	
0,1004	0,1005	+0,0001	0,10	100,10	

Оценка правильности методики: отклонение среднего результата определения от истинного значения не превышает 3 % (составляет не более 2,8%), относительная погрешность методики ($\bar{\varepsilon}$) – менее 2% (1,24%).

Оценка прецизионности методики по «сходимости» получаемых результатов: доверительный интервал включает 100% значение (100,43%±1,24%), коэффициент вариации меньше 2 % (1,49%) [16]. Результаты, получаемые по данной методике, не отягощены систематической ошибкой, о чем свидетельствует неравенство: $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ (0,81 < 2,36).

Как видно из данных Таблицы 53, применяемая методика количественной оценки содержания примесей в таблетках правильна, прецизионна. Доказано отсутствие значимого влияния вспомогательных веществ на получаемые результаты.

Оценка методики по валидационным характеристикам: линейность, чувствительность, устойчивость проводилась ранее (см. Главу 3).

Параметры пригодности хроматографической системы оценивали по пику адамантан-2,6-диона, анализируя раствор для определения поправочного коэффициента. Были проанализированы данные по модельным смесям, содержащим адамантан-2,6-дион и адамантан в концентрации 0,05 мг/мл, а также плацебо. Результаты анализа представлены в Таблице 54.

Таблица 54

Параметры пригодности хроматографической системы

Соединение	RRT	As	NTP	RSD, %
Адамантан-2,6-дион	3,42 ± 0,02	1,06 ± 0,08	103250 ± 8250	2,0 ± 0,5
Критерии приемлемости:				
Адамантан-2,6-дион	3,42 ± 0,02	Не более 1,5	Не менее 90000	Не более 2,5

Как видно из Таблицы 56, относительное время удерживания пика адамантан-2,6-диона, определенное по пику внутреннего стандарта (адамантана), должно составлять $3,42 \pm 0,02$, эффективность хроматографической колонки по пику адамантан-2,6-диона должна быть не менее 90000 теоретических тарелок,

фактор асимметрии пика – $1,06 \pm 0,08$, коэффициент вариации, рассчитанный по площади пика адамантан-2,6-диона (RSD) при $n=4$, не должен превышать 2,5%.

В итоге был сделан вывод: применяемая методика количественного определения содержания примесей в таблетках кемантана 0,1 г методом ГЖХ-ПВД обладает достаточной селективностью, а также приемлемым уровнем правильности и прецизионности. Результаты анализа серийных образцов таблеток представлены в Таблице 55.

Извлечения из таблеток кемантана готовили следующим образом: в ступке измельчали не менее 20 таблеток, около 0,2 г (точная навеска) измельченной массы помещали в колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 25 мл спирта этилового 95 %. Помещали в УЗВ на 10 мин. Затем прибавляли 10 мл раствора внутреннего стандарта в спирте этиловом 95% с концентрацией адамантана – 0,25 мг/мл. Доводили объем раствора до метки спиртом этиловым 95%, перемешивали и фильтровали через фильтр типа «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм. Концентрация кемантана в полученном растворе составляла 2 мг/мл, концентрация внутреннего стандарта (адамантана) – 0,05 мг/мл.

Таблица 55

Результаты определения содержания адамантан-2,6-диона в таблетках кемантана

Номер серии	756	04	724
адамантан-2,6-дион, %	1,32	1,23	1,26
метрологические характеристики	(n=5, P=95%) $S^2=0,00035$ $S = 0,01871$ $S\bar{x} = 0,00837$ $\Delta\bar{X} = 0,02$ RSD=0,32192 $\bar{\mathcal{E}} = 0,77 \%$	(n=6, P=95%) $S^2=0,00214$ $S = 0,04626$ $S\bar{x} = 0,01889$ $\Delta\bar{X} = 0,05$ RSD=0,71 $\bar{\mathcal{E}} = 1,88 \%$	(n=6, P=95%) $S^2=0,00033$ $S = 0,01817$ $S\bar{x} = 0,00813$ $\Delta\bar{X} = 0,02$ RSD=0,32651 $\bar{\mathcal{E}} = 0,80 \%$

Как видно из Таблицы 55, содержание адамантан-2,6-диона в таблетках кемантана 100 мг не превышало 2,5 %.

5.1.5. Определение содержания действующего вещества в таблетках кемантана

Количественное определение кемантана в таблетках осуществляли методом ГЖХ [81, 83].

Для анализа таблеток была выбрана та же неподвижная фаза, что и для анализа субстанции. Исследование проводили на двух кварцевых капиллярных колонках типа “CP-WAX 52 CB” с нанесенной неподвижной фазой – полиэтиленгликолем. Основные параметры колонок: колонка № 1 - 50 м; 0,32мм; 1,2 мкм, «Varian», Нидерланды; колонка № 2 - 25 м; 0,25мм; 1,2мкм; «Agilent Technologies», Нидерланды.

В качестве растворителя для подготовки проб рассматривали слабо полярные вещества: этанол, метанол, воду. Исходя из растворимости анализируемых веществ (кемантана, плацебо, 1-адамантилэтанола), а также влияния растворителя на хроматографическое разделение, было принято решение использовать спирт этиловый 95%.

В результате проведенных исследований были выбраны следующие условия:

- колонка №1: кварцевая капиллярная колонка “CP-WAX 52CB” 50 м, 0,32 мм, 1,2 мкм; температура испарителя – 220 °С, температура термостата – 200°С, температура детектора – 230°С, скорость газа-носителя (азот) – 5 мл/мин, скорость газа-поддува (азот) – 25 мл/мин, скорость водорода – 30 мл/мин, скорость воздуха – 300 мл/мин, деление потока – 1:40, объем пробы – 1 мкл, время одного анализа – 30 мин;

- колонка №2: кварцевая капиллярная колонка “CP-WAX 52CB” 25 м, 0,25 мм, 1,2 мкм; температура испарителя – 220°С, температура термостата – 200°С, температура детектора – 230°С, скорость газа-носителя (азот) – 2 мл/мин, скорость газа-поддува (азот) – 28мл/мин, скорость водорода – 30 мл/мин, скорость воздуха – 300 мл/мин, деление потока – 1:40, объем пробы – 1 мкл, время одного анализа – 30 мин.

Валидация разработанной методики была проведена по следующим характеристикам: специфичность, линейность, аналитический диапазон,

чувствительность и предел количественного определения, правильность, прецизионность, устойчивость.

Специфичность методики была доказана на модельной смеси, содержащей кемантан, а также возможные технологические примеси: адамантан-2-он, адамантан-2,6-дион.

В этих условиях наблюдалось полное разделение кемантана и его потенциальных технологических примесей - фактор разрешения (R_s) между соседними пиками значительно превышал 1 (Рисунки 45, 46).

Также было доказано, что вспомогательные вещества в таблетках кемантана не оказывают влияния на результаты исследования – при анализе раствора плацебо на хроматограмме отсутствовали пики посторонних веществ (Рисунок 47).

Приготовление растворов плацебо проводили следующим образом: навеску плацебо массой 0,05 г помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 70 мл спирта этилового 95%, помещали в УЗВ на 10 мин. Доводили объем раствора до метки тем же растворителем и тщательно перемешивали. Фильтровали полученный раствор через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Объем вводимой пробы – 1 мкл.

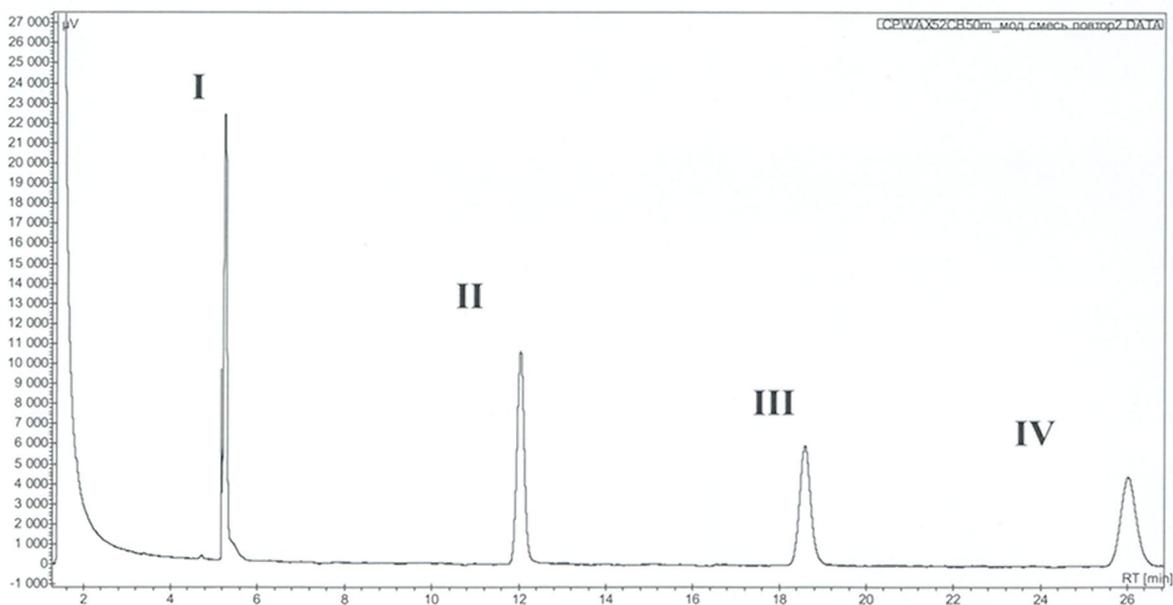


Рисунок 45 - Хроматограмма модельной смеси: I – адамантан-2-он, II – 1-адамантилэтанол, III - адамантан-2,6-дион, IV – кемантан. Колонка №1. Концентрация каждого из соединений – 0,5 мг/мл

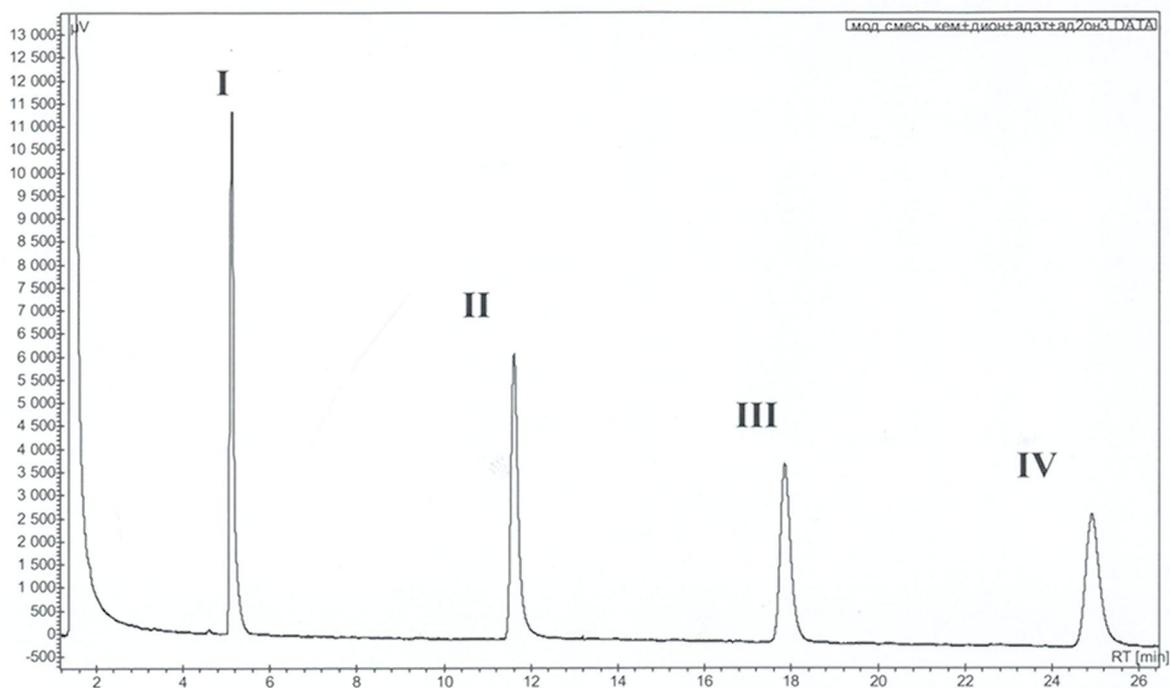


Рисунок 46 - Хроматограмма модельной смеси: I – адамантан-2-он, II – 1-адамантилэтанол, III - адамантан-2,6-дион, IV – кемантан. Колонка №2.
Концентрация каждого из соединений – 0,5 мг/мл

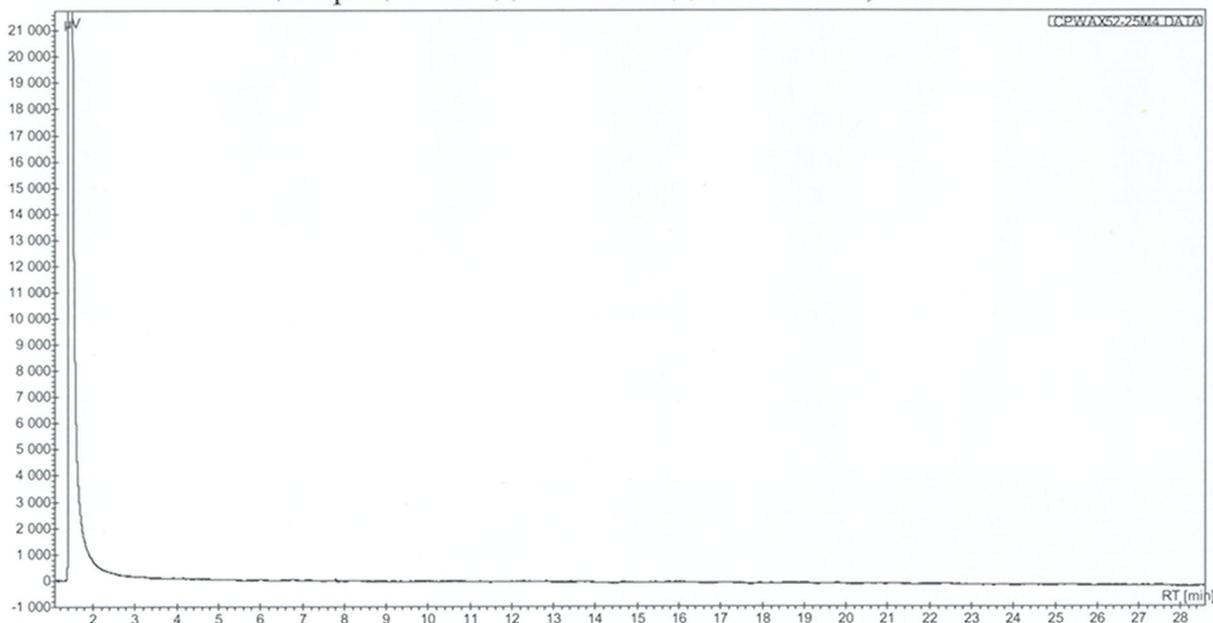


Рисунок 47 - Хроматограмма раствора плацебо. Колонка №2

С целью выбора рабочей концентрации растворов кемантана и 1-адамантилэтанола были установлены пределы линейной зависимости площадей пиков от концентрации растворов исследуемых соединений. Линейная зависимость и для растворов кемантана, и для растворов 1-адамантилэтанола, наблюдалась в интервале от 0,01 мг/мл до 1 мг/мл (колонка №1), значение коэффициента корреляции составляло 0,999 (Рисунок 48). На основании

полученных данных была выбрана рабочая концентрация для раствора кемантана и 1-адамантилэтанола (внутреннего стандарта) – 0,5 мг/мл.

Для колонки №2 подтверждение линейности в области рабочей концентрации проводили в более узком интервале - от 0,4 до 1 мг/мл (Рисунок 49); коэффициент корреляции был равен 0,999.

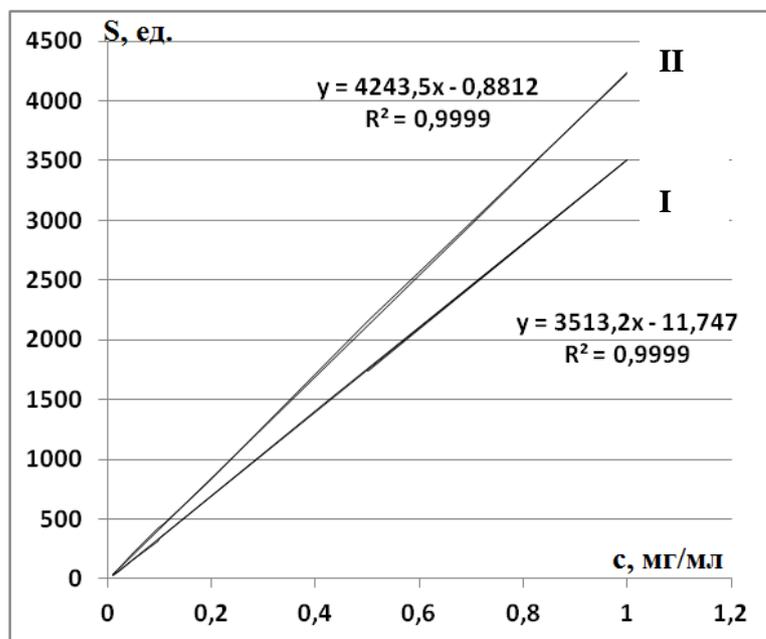


Рисунок 48 - Зависимость площади пика (S) от концентрации (с) (I – кемантан, II – 1-адамантилэтанол). Колонка №1

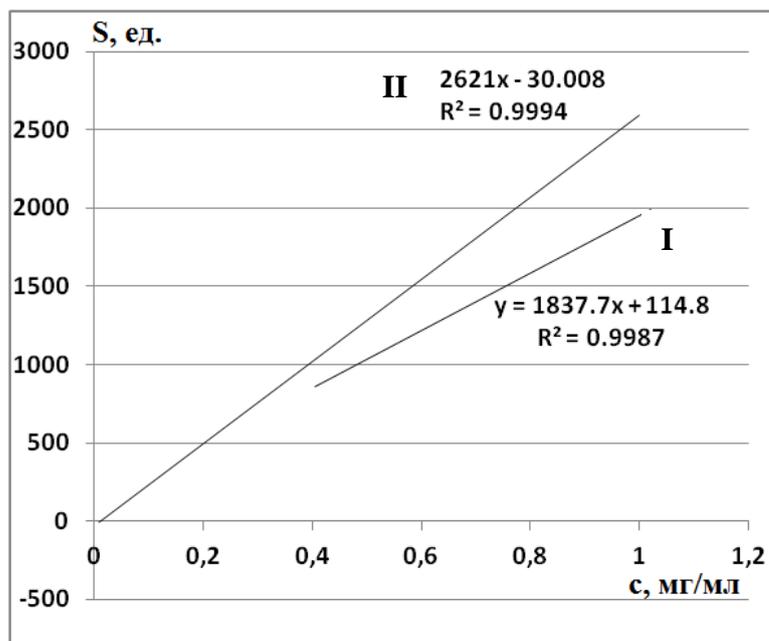


Рисунок 49 - Зависимость площади пика (S) от концентрации (с) (I – кемантан, II – 1-адамантилэтанол). Колонка №2

Определение полноты извлечения кемантана из таблеточной массы проводили на модельных смесях субстанции кемантана и плацебо с содержанием вспомогательных веществ, аналогичным содержанию в таблетке, и с содержанием кемантана (100 ± 20) % от номинального (Таблицы 56, 57). Модельные растворы для разработки методики готовили следующим образом: около $0,05 \pm 0,01$ г (точная навеска) субстанции кемантана и 0,05 г плацебо помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли около 7 мл спирта этилового 95%. Помещали в УЗВ на 10 мин. Объем раствора доводили до метки тем же растворителем и тщательно перемешивали. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл. Помещали в ту же колбу 5 мл предварительно подготовленного спиртового раствора внутреннего стандарта (1-адамантилэтанола) с концентрацией 1 мг/мл*, доводили объем раствора спиртом этиловым 95 % до метки и перемешивали, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

*Приготовление раствора 1-адамантилэтанола, 1 мг/мл: в мерную колбу вместимостью 50 мл помещали 0,05 г (точная навеска) 1-адамантилэтанола, растворяли в 25 мл спирта этилового 95%, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и тщательно перемешивали.

Параллельно готовили аналогичным образом стандартный раствор для расчета поправочного коэффициента: около 0,05г (точная навеска) субстанции кемантана помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в этиловом спирте 95%, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и тщательно перемешивали. Переносили 1 мл раствора кемантана в другую мерную колбу на 10 мл. Переносили в ту же колбу 5 мл предварительно подготовленного спиртового раствора внутреннего стандарта (1-адамантилэтанола) с концентрацией 1 мг/мл*. Доводили объем раствора спиртом этиловым 95 % до метки и тщательно перемешивали.

Объем вводимой пробы – 1 мкл. Данные растворы хроматографировали, получая для каждого не менее 3 хроматограмм. Результаты усредняли.

Расчеты проводили по приведенным ниже формулам.

Формула расчета поправочного коэффициента:

$$K = \frac{S_{st} \times C_{кем} \times P_1}{S_{кем} \times C_{st} \times P_2}, \quad (17)$$

где: S_{st} – площадь пика внутреннего стандарта, мВ х мин;

$S_{кем}$ – площадь пика СО кемантана, мВ х мин;

C_{st} – концентрация раствора внутреннего стандарта, мг/мл;

$C_{кем}$ – концентрация раствора СО кемантана, мг/мл;

P_1 – содержание основного вещества в СО кемантана, в десятичных долях.

P_2 – содержание основного вещества в СО внутреннего стандарта, в десятичных долях.

Содержание кемантана (X , %) рассчитывают по следующей формуле:

$$X(\%) = \frac{S_{кем} \times K \times C_{st} \times P}{S_{st} \times C_{кем}} \times 100\%, \quad (18)$$

где $S_{кем}$ – площадь пика кемантана на хроматограмме испытуемого раствора, мВ х мин;

S_{st} – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора, мВ х мин;

C_{st} – концентрация внутреннего стандарта в испытуемом растворе, мг/мл;

$C_{кем}$ – концентрация кемантана в испытуемом растворе, мг/мл;

K – поправочный коэффициент;

P – содержание основного вещества в СО 1-адамантилэтанола, в десятичных долях.

Правильность и прецизионность методики оценивали в пределах аналитического диапазона концентраций кемантана от 80% до 120% путем анализа модельных растворов с известным содержанием кемантана, плацебо и 1-адамантилэтанола в качестве внутреннего стандарта (см. выше).

В Таблицах 56 и 57 представлены результаты количественного определения кемантана в модельных растворах.

На модельных смесях показано, что извлечение кемантана из таблеточной массы происходит практически полностью.

Оценка правильности методики: отклонение среднего результата определения от истинного значения не превышает 3 % (2,43 % и 1,99 % в случае колонки №1 и №2, соответственно), относительная погрешность методики ($\bar{\varepsilon}$) – менее 1 % (0,83 % и 0,62 % для колонки №1 и №2, соответственно).

Оценка прецизионности методики как сходимости получаемых результатов: коэффициент вариации меньше 2 % (1,07 % и 0,80 % для колонки №1 и №2, соответственно) [16]. Результаты, получаемые по данной методике, не отягощены систематической ошибкой, о чем свидетельствует неравенство: t выч. < t табл. ($1,50 < 2,31$ и $2,18 < 2,31$, соответственно для колонки №1 и №2) [16].

Таблица 56

Результаты количественного определения кемантана в модельных растворах методом ГЖХ. Колонка №1

Взято (c_1), мг/мл	Найдено (c_2), мг/мл	Абсолютная ошибка, ($d = c_2 - c_1$)	Относительная ошибка результата $X = (d \times 100 / c_1)$, %	Найдено, %	Метрологические характеристики (n = 9, P = 95%)
0,405	0,410	+ 0,005	1,23	101,23	$\bar{x} = 100,54$ $S^2 = 1,17$ $S = 1,08$ $\bar{Sx} = 0,36$ $\Delta \bar{x} = 0,83$ $\bar{\varepsilon} = 0,83$ $RSD, \% = 1,07$ $t_{\text{выч.}} = 1,50$ $t_{\text{табл.}} = 2,31$
0,427	0,429	+ 0,002	0,47	100,47	
0,451	0,455	+ 0,004	0,89	100,89	
0,475	0,477	+ 0,002	0,42	100,42	
0,500	0,493	- 0,007	1,40	98,60	
0,527	0,524	- 0,003	0,57	99,43	
0,552	0,557	+ 0,005	0,91	100,91	
0,575	0,589	+ 0,014	2,43	102,43	
0,605	0,608	+ 0,003	0,50	100,50	

Таблица 57

Результаты количественного определения кемантана в модельных растворах методом ГЖХ. Колонка №2

Взято (c_1), мг/мл	Найдено (c_2), мг/мл	Абсолютная ошибка, ($d = c_2 - c_1$)	Относительная ошибка результата $X = (d \times 100 / c_1)$, %	Найдено, %	Метрологические характеристики (n = 9, P = 95%)
0,405	0,405	0	0	100,00	$\bar{x} = 100,58$ $S^2 = 0,64$ $S = 0,80$ $\bar{Sx} = 0,27$ $\Delta \bar{x} = 0,62$ $\bar{\varepsilon} = 0,62$ $RSD, \% = 0,80$ $t_{\text{выч.}} = 2,18$ $t_{\text{табл.}} = 2,31$
0,427	0,428	+ 0,001	0,23	100,23	
0,451	0,456	+ 0,005	1,11	101,11	
0,475	0,480	+ 0,005	1,05	101,05	
0,500	0,496	- 0,004	0,80	99,20	
0,527	0,532	+ 0,005	0,95	100,95	
0,552	0,563	+ 0,011	1,99	101,99	
0,575	0,577	+ 0,002	0,35	100,35	
0,605	0,607	+ 0,002	0,33	100,33	

Как видно из данных, приведенных в Таблицах 56 и 57, применяемая методика количественной оценки содержания кемантана в таблетках правильна, прецизионна. Доказано отсутствие влияния вспомогательных веществ на получаемые результаты.

Внутрилабораторную прецизионность оценивали на растворах кемантана с концентрацией 0,5 мг/мл, приготовленных в разные дни. Результаты представлены в Таблицах 58 и 59.

Таблица 58

Результаты определения содержания кемантана в модельных смесях в разные дни.

Колонка №1

№ дня	Колонка № 1				Метрологические характеристики по результатам в течение 1 дня анализа (n=5, P=95%)	Метрологические характеристики по результатам 4 дней анализа (n=4, P=95%)
	Взято, мг/мл	Найдено, мг/мл	Найдено, %	Отн. ошибка, %		
I	0,500	0,490 0,493 0,497 0,494 0,493	98,00 98,60 99,40 98,80 98,60	2,00 1,40 0,60 1,20 1,40	$\bar{X} = 0,493$ $\bar{X} = 98,68\%$ $S^2 = 0,25$ $S = 0,50$ $Sx = 0,22$ $\Delta\bar{X} = 0,62$ $RSD, \% = 0,51$ $\bar{E} = 0,63\%$	$\bar{X} = 99,70\%$ $S^2 = 0,79$ $S = 0,89$ $Sx = 0,45$ $\Delta\bar{X} = 1,42$ $RSD, \% = 0,89$ $\bar{E} = 1,42\%$ t табл. = 3,18 t выч. = 0,67
II	0,505	0,508 0,501 0,497 0,499 0,501	100,59 99,21 98,42 98,81 99,21	0,59 0,79 1,58 1,19 0,79	$\bar{X} = 0,501$ $\bar{X} = 99,25\%$ $S^2 = 0,67$ $S = 0,82$ $Sx = 0,37$ $\Delta\bar{X} = 1,02$ $RSD, \% = 0,83$ $\bar{E} = 1,03\%$	
III	0,506	0,512 0,513 0,503 0,508 0,509	101,19 101,38 99,41 100,40 100,59	1,19 1,38 0,59 0,40 0,59	$\bar{X} = 0,509$ $\bar{X} = 100,59\%$ $S^2 = 0,60$ $S = 0,78$ $Sx = 0,35$ $\Delta\bar{X} = 0,97$ $RSD, \% = 0,78$ $\bar{E} = 0,96\%$	

IV	0,500	0,512	102,40	2,40	$\bar{X} = 0,501$	
		0,501	100,20	0,20	$\bar{X} = 100,28$	
		0,509	101,80	1,80	$S^2 = 4,41$	
		0,485	97,00	3,00	$S = 2,10$	
		0,500	100,00	0,00	$Sx = 0,94$	
					$\Delta\bar{X} = 2,61$	
					$RSD, \% = 2,09$	
					$\bar{\mathcal{E}} = 2,60\%$	

Таблица 59

Результаты определения содержания кемантана в модельных смесях в разные дни.

Колонка №2

№ дня	Колонка № 2				Метрологические характеристики по результатам в течение 1 дня анализа (n=5, P=95%)	Метрологические характеристики по результатам 4 дней анализа (n=4, P=95%)
	Взято (с ₁), мг/мл	Найдено (с ₂), мг/мл	Найдено, %	Отн. ошибка, %		
I	0,500	0,503	100,60	0,60	$\bar{X} = 100,40$	$\bar{X} = 100,13\%$ $S^2 = 0,35$ $S = 0,59$ $Sx = 0,77$ $\Delta\bar{X} = 0,94$ $RSD, \% = 0,59$ $\bar{\mathcal{E}} = 0,94\%$
		0,502	100,40	0,40	$S^2 = 0,06$	
		0,500	100,00	0,00	$S = 0,24$	
		0,503	100,60	0,60	$Sx = 0,11$	
		0,502	100,40	0,40	$\Delta\bar{X} = 0,30$	
				$RSD, \% = 0,24$		
				$\bar{\mathcal{E}} = 0,30\%$		
II	0,505	0,520	102,97	2,97	$\bar{X} = 100,20$	t табл=3,18 t выч=0,44
		0,501	99,21	0,79	$S^2 = 3,20$	
		0,498	98,61	1,39	$S = 1,79$	
		0,510	100,99	0,99	$Sx = 0,80$	
		0,501	99,21	1,79	$\Delta\bar{X} = 2,23$	
				$RSD, \% = 1,79$		
				$\bar{\mathcal{E}} = 2,23\%$		
III	0,506	0,508	100,40	0,40	$\bar{X} = 100,63$	
		0,503	99,41	0,59	$S^2 = 1,16$	
		0,518	102,37	2,37	$S = 1,08$	
		0,508	100,40	0,40	$Sx = 0,48$	
		0,509	100,60	0,60	$\Delta\bar{X} = 1,34$	
				$RSD, \% = 1,07$		
				$\bar{\mathcal{E}} = 1,33\%$		
IV	0,500	0,497	99,40	0,60	$\bar{X} = 99,28$	
		0,509	101,80	1,80	$S^2 = 3,39$	
		0,488	97,60	2,40	$S = 1,84$	
		0,487	97,40	2,60	$Sx = 0,82$	
		0,501	100,20	0,20		

					$\overline{\Delta X} = 2,29$ $RSD, \% = 1,85$ $\overline{\mathcal{E}} = 2,31\%$	
--	--	--	--	--	---	--

Как видно из данных Таблиц 58 и 59, методика обладает достаточной внутрилабораторной прецизионностью: значения величин относительного стандартного отклонения результата определения в течение 1 дня анализа с числом степеней свободы 4 находится в пределах 2 %: RSD равен 2,09 и 1,85, соответственно для колонки №1 и 2. А при определении RSD по усредненным результатам анализа модельных смесей за 4 дня RSD составляет 1,42 и 0,59 % для колонки № 1 и 2, соответственно. Погрешность методики, определенная в разные дни, не превышала 2,6%.

Для оценки устойчивости разработанной методики проводили испытания с незначительным изменением температуры термостата и скорости газа-носителя. Оценивали влияние этих факторов на хроматографическое разделение пиков 1-адамантилэтанола и кемантана по основным параметрам: RRT – относительному времени удерживания, As – фактору асимметрии пика кемантана, N – числу теоретических тарелок и Rs – показателю разрешения пиков (пика кемантана относительно пика 1-адамантилэтанола). Результаты представлены в Таблицах 60 и 61.

Таблица 60

Влияние изменения условий методики на хроматографическое разделение
Колонка №1

Скорость, мл/мин	RRT	As	N	Rs
4,5	2,15 ± 0,02	1,76 ± 0,10	22560	27,40 ± 0,70
5,0		1,67 ± 0,10	21240	25,75 ± 0,20
5,5		1,50 ± 0,10	20574	25,49 ± 0,20
Температура, °C	RRT	As	N	Rs
210	2,05 ± 0,02	1,90 ± 0,10	18544	22,82 ± 0,20
205	2,10 ± 0,02	1,69 ± 0,10	20989	25,25 ± 1,07
200	2,15 ± 0,02	1,67 ± 0,10	21240	25,75 ± 0,20
195	2,21 ± 0,02	1,49 ± 0,10	21890	27,65 ± 0,20
190	2,26 ± 0,02	1,54 ± 0,10	21844	28,47 ± 0,20

Влияние изменения условий методики на хроматографическое разделение
Колонка №2

Скорость, мл/мин	RRT	As	N	Rs
4,5	2,14 ± 0,01	1,78 ± 0,10	40781	35,52 ± 1,00
5,0		1,84 ± 0,10	25266	30,79 ± 0,05
5,5		1,84 ± 0,10	25703	28,41 ± 1,00
Температура, °С	RRT	As	N	Rs
210	2,03 ± 0,01	1,87 ± 0,10	29874	28,83 ± 0,05
205	2,08 ± 0,01	1,90 ± 0,10	28910	29,48 ± 1,00
200	2,14 ± 0,01	1,84 ± 0,10	25266	30,79 ± 0,05
195	2,19 ± 0,01	1,63 ± 0,10	30704	32,37 ± 0,05
190	2,25 ± 0,01	1,51 ± 0,10	33756	34,87 ± 0,05

По представленным в Таблицах 60 и 61 данным можно сделать вывод, что изменение температуры термостата в пределах ± 10 °С и скорости газа-носителя в пределах $\pm 0,5$ мл/мин не оказывает существенного влияния на основные хроматографические параметры разделения пиков исследуемых соединений. При повышении температуры термостата уменьшается время выхода вещества, соответственно, уменьшается и разрешение между пиками кемантана и 1-адамантилэтанола (R_s). Изменение скорости влияет только на разрешение между пиками кемантана и 1-адамантилэтанола.

Проверку пригодности хроматографической системы было предложено проводить по относительному времени удерживания пика кемантана относительно пика внутреннего стандарта (RRT), а также по числу теоретических тарелок (N), фактору асимметрии (As), относительному стандартному отклонению площади пика кемантана (коэффициенту вариации) (RSD). Данные по пригодности хроматографической системы были получены на основе анализа нескольких модельных смесей, состоящих из кемантана, 1-адамантилэтанола, с концентрацией каждого из соединений - 0,5 мг/мл. Результаты расчета по пику кемантана и критерии приемлемости указанных параметров представлены в Таблицах 62, 63.

Параметры пригодности хроматографической системы для колонки №1

Параметр пригодности / Соединение	RRT	As	N	RSD,%
Кемантан	2,15 ± 0,10	1,64 ± 0,30	19000 ± 3600	2,24
Критерии приемлемости:	2,15 ± 0,10	не более 2,0	не менее 10000	не более 2,5%

Таблица 63

Параметры пригодности хроматографической системы для колонки №2

Параметр пригодности /Соединение	RRT	As	N	RSD,%
Кемантан	2,14 ± 0,01	1,70 ± 0,22	31000 ± 2000	2,03
Критерии приемлемости:	2,14 ± 0,01	не более 2,0	не менее 10000	не более 2,5%

Исходя из результатов, представленных в Таблицах 62 и 63, относительное время удерживания пика кемантана должно быть равно - $2,15 \pm 0,1$, фактор асимметрии пика не должен превышать 2,0, эффективность колонок №1 и №2, рассчитанная по пику кемантана – не менее 10000 т.т., относительное стандартное отклонение площади пика кемантана (RSD, %) не должно превышать 2,5%.

Количественное определение содержания кемантана проводили на серийных образцах таблеток кемантана 100 мг. Испытуемые растворы готовили следующим образом: около 0,1 г (точная навеска) порошка растертых таблеток (20 таблеток) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 7 мл спирта этилового 95%, помещали в УЗВ на 10 минут, доводили объем раствора до метки тем же растворителем и тщательно перемешивали. Переносили 1 мл раствора в другую мерную колбу вместимостью 10 мл, куда предварительно вносили 5 мл спиртового раствора внутреннего стандарта (1-адамантилэтанола) с концентрацией 1 мг/мл. Доводили объем раствора до метки тем же растворителем и тщательно перемешивали. Фильтровали через фильтр типа «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм (концентрация кемантана - 0,5 мг/мл). Параллельно готовили раствор для расчета поправочного коэффициента, состоящий из кемантана, 1-адамантилэтанола; концентрация каждого из соединений - 0,5 мг/мл. Объем вводимой пробы составлял 1 мкл. Получали не менее 5 хроматограмм. Результаты усредняли.

Формула расчета содержания кемантана в таблетках (количество грамм кемантана в одной таблетке, г/табл.):

$$X = \frac{K \times S_{\text{кем}} \times C_{\text{ст}} \times m_{\text{табл.}} \times V \times P}{S_{\text{ст}} \times m_{\text{навески}}}, \quad (19)$$

где $m_{\text{табл.}}$ – средняя масса таблетки, в граммах;

$m_{\text{навески}}$ – масса навески таблеточной массы, в граммах;

$S_{\text{кем.}}$ – площадь пика кемантана на хроматограмме испытуемого раствора, мВ х мин;

$S_{\text{ст}}$ – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора, мВ х мин;

$C_{\text{ст}}$ – концентрация внутреннего стандарта в испытуемом растворе, мг/мл;

V – объем разведения навески таблеточной массы, мл;

K – поправочный коэффициент;

P – содержание основного вещества в стандартном образце адамантана, в десятичных долях.

Результаты количественного определения серийных образцов таблеток кемантана, 100 мг, методом ГЖХ представлены в Таблице 64.

Таблица 64

Результаты количественного определения кемантана в таблетках 100мг

№ серии / Колонка	01	04	724.09	756.09	151
колонка №1	0,1020 г/табл (P=95%, n=5) $\bar{X} = 102,0 \%$ S=0,56 $Sx = 0,25$ $\Delta\bar{X} = 0,31$ RSD=0,55 $\bar{E} = 0,30\%$	0,0971 г/табл (P=95%, n=5) $\bar{X} = 97,96\%$ S=1,20 $Sx = 0,54$ $\Delta\bar{X} = 1,22$ RSD=1,22 $\bar{E} = 1,52\%$	0,1011 г/табл (P=95%, n=5) $\bar{X} = 101,1 \%$ S = 3,23 $Sx = 1,44$ $\Delta\bar{X} = 1,79$ RSD=3,19 $\bar{E} = 1,77\%$	0,1045 г/табл (P=95%, n=5) $\bar{X} = 104,5\%$ S = 2,46 $Sx = 1,1$ $\Delta\bar{X} = 1,37$ RSD=2,35 $\bar{E} = 1,31\%$	0,1006 г/табл (P=95%, n=5) $\bar{X} = 100,6 \%$ S=0,33 $Sx = 0,15$ $\Delta\bar{X} = 0,19$ RSD=0,33 $\bar{E} = 0,19\%$
колонка №2	0,1023 г/табл (P=95%, n=5) $\bar{X} = 102,3 \%$ S=0,3 $Sx = 0,13$ $\Delta\bar{X} = 0,16$	0,0976 г/табл (P=95%, n=7) $\bar{X} = 99,1\%$ S = 2,44 $Sx = 1,09$ $\Delta\bar{X} = 3,03$	0,1010 г/табл (P=95%, n=5) $\bar{X} = 101,0 \%$ S = 1,7 $Sx = 0,76$ $\Delta\bar{X} = 0,94$	0,1043 г/табл (P=95%, n=5) $\bar{X} = 104,3\%$ S = 0,82 $Sx = 0,37$ $\Delta\bar{X} = 0,46$	0,1013 г/табл (P=95%, n=5) $\bar{X} = 101,3 \%$ S=0,90 $Sx = 0,40$ $\Delta\bar{X} = 1,12$

№ серии / Колонка	01	04	724.09	756.09	151
	RSD=0,29 $\bar{\mathcal{E}}=0,16\%$	RSD=2,46 $\bar{\mathcal{E}}=3,06\%$	RSD=1,68 $\bar{\mathcal{E}}=0,93\%$	RSD=0,79 $\bar{\mathcal{E}}=0,44\%$	RSD=0,89 $\bar{\mathcal{E}}=1,11\%$

Как видно из Таблицы 64, содержание кемантана в серийных образцах таблеток было в пределах от 0,0971 г/табл до 0,1045 г/табл, т.е. соответствовало требованиям ГФ XI изд., вып. 2, с. 154: содержание фармацевтической субстанции в таблетках дозировкой 100 мг должно находиться в пределах $0,100 \pm 0,005$ г/табл.

Значения, получаемые на колонке №1 и №2 были очень близки. Экспериментально подтверждена возможность применения обеих колонок для количественного определения содержания действующего вещества в таблетках кемантана 100 мг.

5.1.6. Разработка теста «Растворение» для таблеток кемантана [82]

ОФС «Таблетки» [25, с.156], а также ОСТ 91500.05.001.00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» [73] предусматривают в контроле качества таблеток проведение теста «Растворение». Посредством данного испытания определяют количество действующего вещества, высвободившегося в среду растворения из твердой дозированной лекарственной формы в нормируемых условиях и за определенный период времени [20, 25]. Роль данного испытания трудно переоценить. Тест «Растворение» используется в следующих случаях: на стадии разработки ЛП для установления скорости высвобождения действующего вещества из ЛП, а также для выбора оптимального состава ЛФ; для оценки стабильности ЛП; для проверки качества готового ЛП как в процессе его производства, так и при обращении на фармацевтическом рынке; для гарантии неизменности качества ЛП, кроме тех случаев, когда изменения в технологии производства ЛП приводят к изменению механизма высвобождения; для текущего контроля качества таблеток и капсул, обеспечения однородности внутри серий, выявления фальсифицированных препаратов [70].

Определение показателя «Растворение» таблеток кемантана проводили в соответствии с требованиями ОФС 42-0003-04 «Растворение».

В работе Кисляка Н.А. [34] в качестве метода количественной оценки степени высвобождения кемантана из таблеток был предложен метод УФ-СФМ. В качестве среды растворения использовали воду очищенную, концентрация кемантана в испытуемых растворах составляла около 2 мг/мл. Мы воспроизвели для таблеток кемантана с новым составом разработанную ранее методику, в качестве среды растворения использовали воду очищенную. Ниже приведены условия и результаты проведенных испытаний.

Как было показано ранее (см. Главу 3) растворы кемантана в воде в диапазоне от 220 до 350 нм имеют максимум поглощения при длине волны 285 ± 2 нм. Данную длину волны выбрали в качестве аналитической.

Была изучена зависимость оптической плотности от концентрации растворов кемантана в воде очищенной при длине волны максимума УФ-спектра 285 нм. Линейная зависимость оптической плотности растворов от концентрации кемантана была подтверждена в пределах интервала от 0,8 до 5 мг/мл (Рисунок 50). Коэффициент корреляции составлял 0,9999.

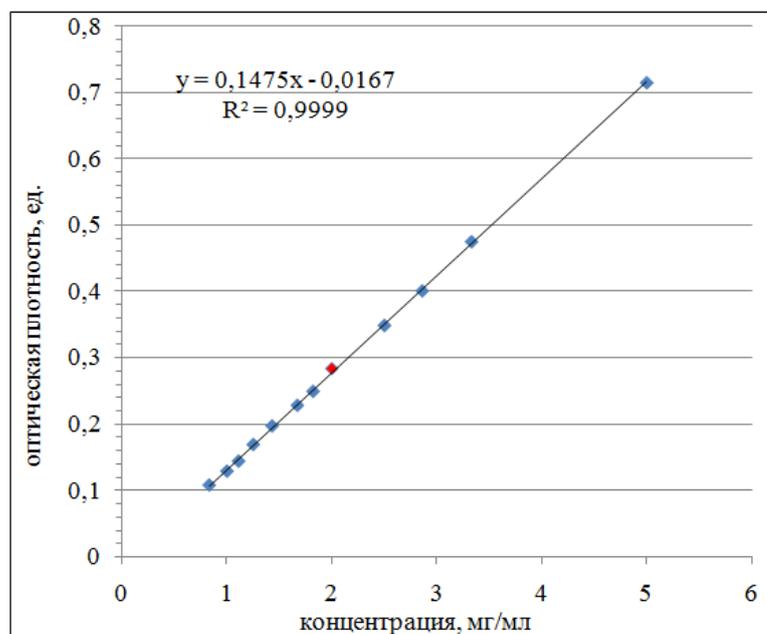


Рисунок 50 - Зависимость оптической плотности от концентрации растворов кемантана в воде очищенной.

Согласно графику, представленному на рисунке 50, концентрации раствора кемантана в воде, равной 2 мг/мл, соответствует оптическая плотность $D=0,284$. Несмотря на низкий показатель оптической плотности, концентрация 2 мг/мл была выбрана в качестве рабочей, поскольку увеличение концентрации испытуемых растворов повлекло бы за собой увеличение расхода испытуемых образцов: в один сосуд для растворения с объемом среды растворения 500 мл необходимо было бы помещать более 10 таблеток кемантана с дозировкой 100 мг.

Для оценки степени влияния вспомогательных веществ на оптическую плотность изучаемых растворов, были сняты спектры растворов плацебо в воде очищенной.

Методика приготовления извлечения из плацебо: около 0,05 г плацебо помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли около 10 мл воды очищенной. Помещали в УЗВ на 15 мин. Доводили объем раствора до метки тем же растворителем, тщательно перемешивали и фильтровали через фильтр типа «Миллипор» с диаметром пор 0,45 мкм.

Согласно полученным данным (Рисунок 51), растворы плацебо в воде поглощают электромагнитное излучение при 285 нм. Оптическая плотность растворов плацебо при 285 нм была равна 0,019, т.е. составляла около 6% от оптической плотности испытуемых растворов кемантана. Был сделан вывод о необходимости учета вклада плацебо в оптическую плотность изучаемых растворов – водных извлечений из таблеток.

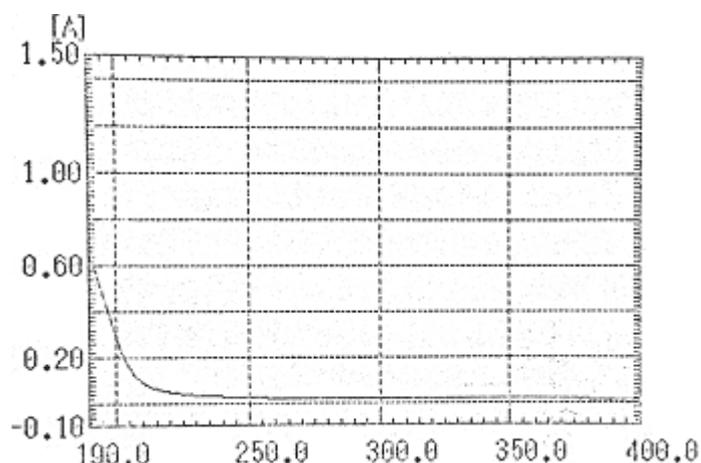


Рисунок 51 - УФ-спектр извлечения из плацебо. Растворитель – вода очищенная. $\lambda_{\max}=285$ нм, $A=0,019$

С целью определения полноты извлечения кемантана из таблеточной массы, были приготовлены и проанализированы 9 модельных смесей кемантана и вспомогательных веществ (плацебо).

Методика приготовления модельных растворов: около $0,05 \pm 0,01$ г ($100 \pm 20\%$) субстанции кемантана (точные навески) и 0,05 г плацебо помещали в мерные колбы вместимостью 25 мл, растворяли в 15 мл воды очищенной, помещали в УЗВ на 15 мин, доводили объем растворов тем же растворителем до метки и тщательно перемешивали. Параллельно аналогичным образом готовили раствор РСО кемантана с концентрацией 2 мг/мл в воде очищенной. Измеряли оптическую плотность испытуемых растворов и раствора РСО кемантана при 285 нм в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см против раствора сравнения – воды очищенной.

Расчет содержания кемантана в испытуемых растворах проводили по формуле:

$$X = \frac{(D_{\text{п}} - D_{\text{плац.}}) \times a \times V_{\text{кем}}}{D_{\text{рсо}} \times V_{\text{рсо}}}, \quad (20)$$

где $D_{\text{п}}$ – оптическая плотность испытуемого раствора;

$D_{\text{плац.}}$ – оптическая плотность раствора плацебо;

$D_{\text{с}}$ – оптическая плотность РСО;

a – навеска кемантана в растворе РСО, в граммах;

$V_{\text{кем}}$ – объем разбавления кемантана в испытуемом растворе, мл;

$V_{\text{рсо}}$ – объем разбавления кемантана в РСО, мл.

Результаты анализа модельных смесей приведены в Таблице 65.

Таблица 65

Результаты анализа модельных смесей кемантана и плацебо

Навеска кемантана (m_1), г	$D_{\text{раствора}} - D_{\text{плацебо}}$	Найдено кемантана, (m_2), г	Абсолютная ошибка ($d = m_2 - m_1$), г	Относительная ошибка $X = (d \times 100 / m_1), \%$	Найдено, %	Метрологические характеристики ($P=95\%, n=9$)
0,0403	0,237	0,0407	+0,0004	0,99	100,99	$\bar{X} = 102,47\%$ $S^2 = 6,33$ $S = 2,52$ $S\bar{x} = 0,84$
0,0425	0,251	0,0431	+0,0006	1,41	101,41	
0,0451	0,264	0,0454	+0,0003	0,67	100,67	
0,0474	0,280	0,0481	+0,0007	1,48	101,48	
0,0502	0,301	0,0517	+0,0015	2,99	102,99	

Навеска кемантана (m_1), г	$D_{\text{раствора}} -$ $D_{\text{плацебо}}$	Найдено кемантана, (m_2), г	Абсолютная ошибка ($d = m_2 - m_1$), г	Относительная ошибка $X = (d \times 100 / m_1), \%$	Найдено, %	Метрологические характеристики ($P=95\%, n=9$)
0,0526	0,303	0,0521	-0,0005	0,95	99,05	$\Delta \bar{X} = 1,94$ $RSD = 2,46$ $\bar{E} = 1,89\%$ $t_{\text{выч.}} > t_{\text{табл}}$ $(2,94 > 2,36)$
0,0552	0,343	0,0589	+0,0037	6,70	106,70	
0,0575	0,355	0,0610	+0,0035	6,09	106,09	
0,0600	0,359	0,0617	+0,0017	2,83	102,83	

Согласно приведенным в Таблице 65 данным, относительная ошибка отдельного определения превышала 5% и составляла 6,7%; $t_{\text{выч.}} > t_{\text{табл.}} (2,94 > 2,36)$, что свидетельствует о том, что получаемые по данной методике результаты отягощены систематической ошибкой, равной 2,47%.

Представленную выше методику УФ-СФМ было предложено использовать для анализа подлинности таблеток кемантана ($\lambda_{\text{max}} = 285,0 \pm 2$ нм, $D \approx 0,280 \pm 0,010$). Однако, в связи с низкой чувствительностью и воспроизводимостью методики спектрофотометрического количественного определения кемантана, а также необходимостью применения большого количества таблеток для приготовления одной пробы, было принято решение разработать альтернативную методику посредством газожидкостной хроматографии (ГЖХ-ПИД) [82].

Разделение было проведено на кварцевой капиллярной колонке Zebron «ZB-624» длиной 30 м и внутренним диаметром 0,53 мм с нанесенной неподвижной фазой - 6% цианопропилфенил, 94% диметилполисилоксан (толщина слоя - 3,0 мкм) (Phenomenex, США).

Объектами исследования являлись серийные образцы таблеток кемантана дозировкой 100 мг, разработанные и полученные в лаборатории технологии готовых лекарственных форм ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В Закусова».

В качестве свидетелей использовали образцы субстанции кемантана, а также образцы технологических примесей кемантана: адамантан-2,6-дион (ГЖХ, $> 99,0\%$) и адамантан-2-он (99,8%, АО «Олайнский химико-фармацевтический завод», Латвия). В качестве внутренних стандартов использовали адамантан (100277 Aldrich), адамантан-2-он (99,8%, АО «Олайнский химико-фармацевтический завод», Латвия).

В результате проведенных исследований были выбраны следующие условия: температура испарителя – 220°C, температура детектора - 250°C, градиентное повышение температуры термостата: изотерма при 180°C – 13 мин, затем повышение до 200°C со скоростью 5°C/мин; изотерма при 200°C – 13 мин. Общее время анализа пробы - 30 мин. Газ-носитель – азот, 1,5мл/мин, в детекторе: скорость газа-поддува (азота) – 25 мл/мин, скорость водорода – 30 мл/мин, скорость воздуха – 300 мл/мин. Объем вводимой пробы – 1 мкл, деление потока – 1:5.

В качестве растворителя был выбран ацетон, поскольку, как показали наши исследования, некоторые вспомогательных вещества, входящие в состав таблеток кемантана, хорошо растворимы в воде, хуже - в этаноле и не растворимы в ацетоне.

Пробоподготовка сопровождается сменой растворителя с воды на ацетон, при этом наблюдается помутнение раствора в результате выделения нерастворяющихся в ацетоне вспомогательных веществ из растворившихся в среде теста «Растворение» (вода очищенная) таблеток кемантана. Последующее фильтрование пробы через фильтр типа «Миллипор» с размером пор 0,22 мкм позволяет избавиться от влияния данных вспомогательных веществ на результаты анализа.

Специфичность методики доказана путем анализа модельной смеси, состоящей из адамантана (внутренний стандарт), адамантан-2-она и адамантан-2,6-диона (технологические примеси) и кемантана. На рисунке 52 представлена хроматограмма данной модельной смеси (концентрация всех компонентов - 0,04 мг/мл). Времена удерживания, параметры разделения компонентов смеси представлены в Таблице 66.

Адамантан-2-он и адамантан-2,6-дион относятся к технологическим примесям в субстанции кемантана. Однако, согласно разработанным нормам качества, в субстанции кемантана, применяемой для изготовления таблеток, не допускается наличие примеси адамантан-2-она. Была изучена возможность

применения адамантан-2-она в качестве внутреннего стандарта вместо адамантана (как альтернатива).

Линейный характер зависимости площадей пиков от концентрации растворов кемантана и внутренних стандартов подтвержден в интервале концентраций от 0,008 до 0,08 мг/мл, значения коэффициентов корреляции были равны 0,999 (Рисунок 53).

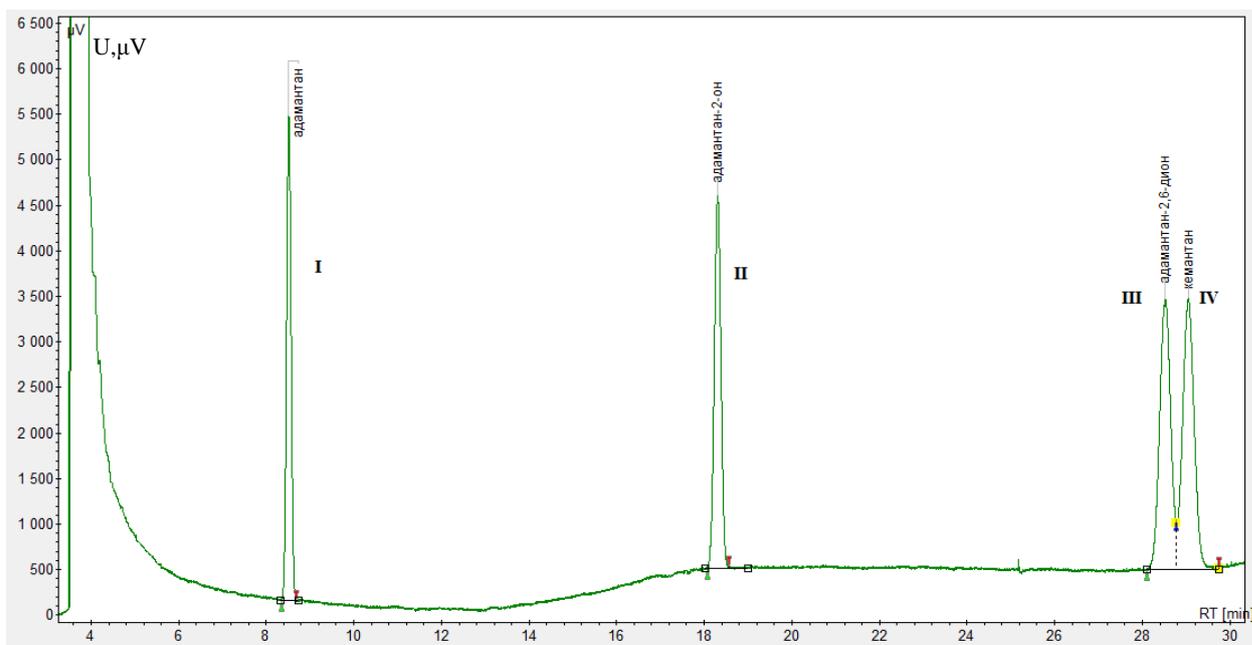


Рисунок 52 - Модельная смесь: I - адамантан, II – адамантан-2-он, III – адамантан-2,6-дион; IV – кемантан

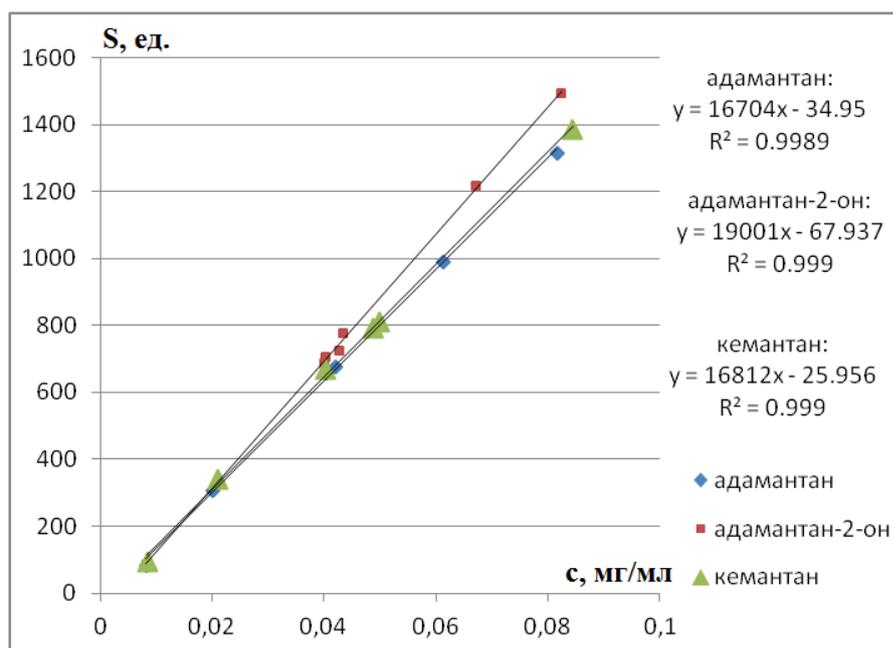


Рисунок 53 - Зависимость площади пиков (S) от концентрации веществ (с) в модельных смесях

На основании проведенных исследований выбрали в качестве рабочей концентрацию растворов кемантана и внутренних стандартов – 0,04 мг/мл.

Как видно из Таблицы 66, разделение пиков кемантана и адамантан-2,6-диона – неполное (менее 1,5). Однако ввиду низкого содержания данной примеси в субстанции (нормируемая предельно допустимая концентрация адамантан-2,6-диона в субстанции кемантана – 2,5 %) при выбранной рабочей концентрации испытуемых растворов доля пика примеси не вносит значительной ошибки в расчеты (Рисунки 54, 55).

Таблица 66

Времена удерживания и параметры разделения кемантана и его технологических примесей

№	Соединение	RT, мин	RRT	Rs
1	адамантан	8,50 ± 0,05	-	-
2	адамантан-2-он	18,30 ± 0,05	2,15 ± 0,02	41,50
3	адамантан-2,6-дион	28,52 ± 0,02	3,36 ± 0,02	27,58
4	кемантан	29,05 ± 0,05	3,42 ± 0,02	1,13

RT – время удерживания пика вещества, мин; RRT – относительное время удерживания, рассчитанное по формуле: $RRT = RT \text{ компонента} / RT \text{ адамантана}$; Rs – разрешение между пиками двух соседних компонентов смеси

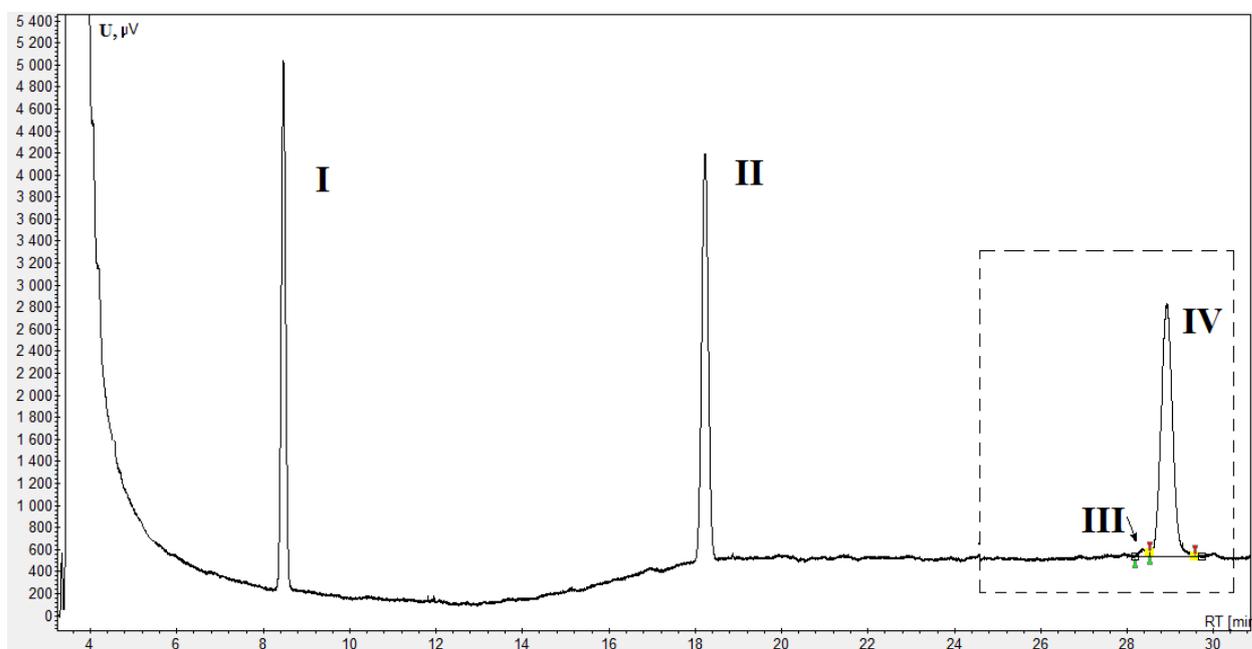


Рисунок 54 - Хроматограмма модельной смеси, содержащей субстанцию кемантана (IV), примесь в ней адамантан-2,6-диона (III; 2,51%, метод ГЖХ), адамантан (I) и адамантан-2-он (II) в концентрации по 0,04 мг/мл каждого соединения

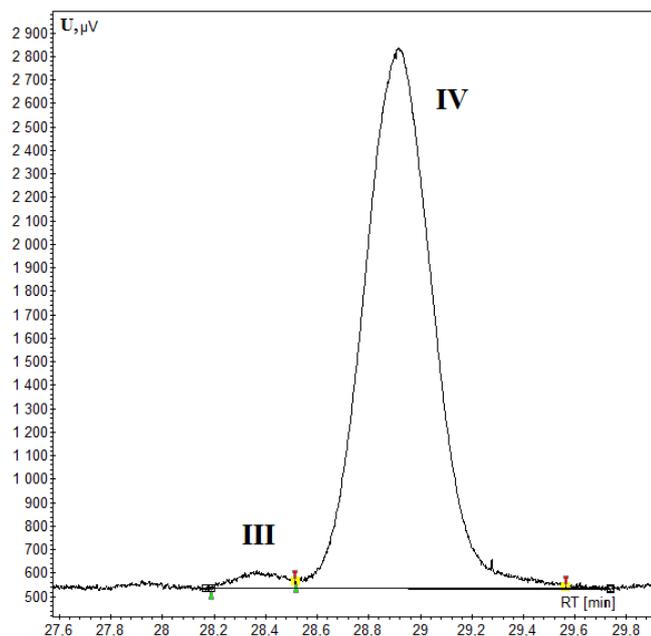


Рисунок 55 - Увеличенное изображение фрагмента рисунка 54.

III - адамантан-2,6-дион, IV – кемантан

Оценку правильности и прецизионности разработанной методики проводили одновременно, анализируя модельные смеси, содержащие внутренние стандарты (адамантан, адамантан-2-он), плацебо и кемантан (от 50 до 120 % от номинального содержания кемантана в таблетках).

Исходный раствор смеси стандартов: в мерную колбу вместимостью 100 мл помещали по 0,02 г (точные навески) адамантана и адамантан-2-она, прибавляли 50 мл ацетона, помещали в УЗВ на 5 мин. Доводили объем раствора до метки тем же растворителем и тщательно перемешивали.

Испытуемые растворы: в колбу вместимостью 100 мл помещали от 0,01 г до 0,025 г (точные навески) субстанции кемантана, прибавляли по 0,1 г плацебо, прибавляли 50 мл воды очищенной и помещали в УЗВ на 10 мин. Затем содержимое колб доводили водой до метки, тщательно перемешивали и фильтровали через фильтр типа «Миллипор» с диаметром пор 0,22 мкм. 2 мл фильтрата переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 2 мл исходного раствора смеси стандартов (приготовление см. выше), доводили объем раствора ацетоном до метки и тщательно перемешивали.

Раствор для расчета поправочного коэффициента готовили аналогичным образом, концентрация всех компонентов составляла 0,04 мг/мл.

Приготовленные растворы хроматографировали, получая не менее 3 хроматограмм для каждого, результаты усредняли.

Поправочный коэффициент вычисляли по следующей формуле:

$$K = \frac{S_{st} \times C_{кем} \times P_1}{S_{кем} \times C_{st} \times P_2}, \quad (21)$$

где S_{st} – площадь пика внутреннего стандарта, мВ x мин;

$S_{кем}$ – площадь пика РСО кемантана, мВ x мин;

C_{st} – концентрация раствора внутреннего стандарта, мг/мл;

$C_{кем}$ – концентрация раствора РСО кемантана, мг/мл;

P_1 – содержание основного вещества в СО кемантана, в десятичных долях.

P_2 – содержание основного вещества в СО внутреннего стандарта, в десятичных долях.

Расчет содержания кемантана в модельном растворе (мг/мл) проводили по следующей формуле:

$$X = \frac{S_x \times K \times C_{st} \times P}{S_{st}}, \quad (22)$$

где S_x – площадь пика кемантана в испытуемом растворе, мВ x мин;

S_{st} – площадь пика внутреннего стандарта в испытуемом растворе, мВ x мин;

C_{st} – концентрация внутреннего стандарта в испытуемом растворе, мг/мл;

K – поправочный коэффициент;

P – содержание основного вещества в СО внутреннего стандарта (адамантиана / адамантиан-2-она), в десятичных долях.

Полученные результаты представлены в Таблицах 67, 68.

Таблица 67

Результаты количественного определения кемантана в модельных растворах
(расчет по внутреннему стандарту – адамантиану)

Взято (c_1), мг/мл	Найдено (c_2), мг/мл	Абсолютная ошибка, ($d = c_2 - c_1$)	Относительная ошибка результата $X = (d \times 100 / c_1)$, %	Найдено, %	Метрологические характеристики ($P = 95\%$, $n = 10$)
0,0210	0,0210	0	0	100	$\bar{X} = 100,51\%$ $S^2 = 2,16$
0,0240	0,0236	-0,0004	1,67	98,33	
0,0398	0,0409	+0,0011	2,76	102,76	

Взято (c_1), мг/мл	Найдено (c_2), мг/мл	Абсолютная ошибка, ($d= c_2-c_1$)	Относительная ошибка результата $X=(d \times 100/c_1)$, %	Найдено, %	Метрологические характеристики ($P=95\%$, $n=10$)
0,0400	0,0401	+0,0001	0,25	100,25	$S = 1,47$ $\bar{Sx} = 0,46$ $\Delta\bar{X} = 1,05$ $RSD = 1,46$ $t_{\text{выч.}} = 1,10$ $t_{\text{табл.}} = 2,26$ $\bar{\mathcal{E}} = 1,04\%$
0,0402	0,0413	+0,0011	2,74	102,74	
0,0416	0,0412	-0,0004	0,96	99,04	
0,0420	0,0419	-0,0001	0,24	99,76	
0,0486	0,0491	+0,0005	1,03	101,03	
0,0488	0,0495	+0,0007	1,43	101,43	
0,0498	0,0497	-0,0001	0,20	99,80	

Таблица 68

Результаты количественного определения кемаданта в модельных растворах
(расчет по внутреннему стандарту – адамантан-2-ону)

Взято (c_1), мг/мл	Найдено (c_2), мг/мл	Абсолютная ошибка, ($d= c_2-c_1$)	Относительная ошибка результата $X=(d \times 100/c_1)$, %	Найдено, %	Метрологические характеристики ($P=95\%$, $n=10$)
0,0210	0,0210	0	0	100	$\bar{X} = 100,93\%$ $S = 2,03$ $\bar{Sx} = 0,64$ $\Delta\bar{X} = 1,45$ $RSD = 2,01$ $t_{\text{выч.}} = 1,45$ $t_{\text{табл.}} = 2,26$ $\bar{\mathcal{E}} = 1,44\%$
0,0240	0,0252	+0,0012	5,00	105	
0,0398	0,0392	-0,0006	1,51	98,49	
0,0400	0,0393	-0,0007	1,75	98,25	
0,0402	0,0409	+0,0007	1,74	101,74	
0,0416	0,0420	+0,0004	0,96	100,96	
0,0420	0,0418	-0,0002	0,48	99,52	
0,0486	0,0495	+0,0009	1,85	101,85	
0,0488	0,0501	+0,0013	2,66	102,66	
0,0498	0,0502	+0,0004	0,80	100,80	

Результаты анализа модельных растворов показали, что отклонение среднего результата измерения от истинного значения не превышало 2,8% (2,76%) и 5% при расчетах по внутреннему стандарту – адамантану или адамантан-2-ону, соответственно.

Оценка прецизионности методики как сходимости получаемых результатов: значения коэффициента вариации (RSD) находятся в пределах 2 % (1,46 % и 2,01, соответственно расчетам по адамантану и адамантан-2-ону). Результаты, получаемые по данной методике, не отягощены систематической ошибкой, о чем свидетельствуют неравенства: $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$ ($1,10 < 2,26$ и $1,45 < 2,26$, соответственно расчетам по адамантану и адамантан-2-ону).

Как видно из данных, приведенных в Таблицах 67 и 68, применяемая методика количественной оценки содержания кемантана в таблетках правильна, прецизионна. Доказано отсутствие влияния вспомогательных веществ на получаемые результаты.

Оценку пригодности хроматографической системы проводили на растворах, содержащих внутренний стандарт (адамantan или адамantan-2-он, соответственно) и кемантан в концентрации каждого компонента – 0,04 мг/мл. На основании представленных в Таблице 69 данных выбраны следующие критерии пригодности хроматографической системы: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику кемантана должна быть не менее 25000 теоретических тарелок; факторы асимметрии пиков кемантана, адаманта, адамantan-2-она - не более 1,5 для каждого соединения; относительное стандартное отклонение площадей пиков – не более 5 % для каждого соединения.

Таблица 69

Параметры пригодности хроматографической системы

Параметр пригодности / компонент модельной смеси	As	N	RSD, %
адамantan	1,00 ± 0,10	31 000 ± 2000	3,29
адамantan-2-он	1,00 ± 0,10	66 000 ± 2000	3,19
кемантан	1,00 ± 0,10	50 000 ± 20000	4,01
Критерии приемлемости:	не более 1,5	не менее 20 000	не более 5%

Разработанная методика валидирована в соответствии с требованиями руководства ICH Q2(R1) [124]. Определены параметры пригодности системы. Оценка методики по основным валидационным характеристикам показала, что она обладает приемлемой специфичностью, в аналитической области (от 50 до 120 % от номинального содержания кемантана в таблетках) получаемые результаты имеют приемлемый уровень правильности и внутрилабораторной прецизионности, доказана линейность методики в пределах аналитической области определения. Математически обоснована возможность применения в качестве внутреннего стандарта как адаманта, так и адамantan-2-она.

Дальнейшие исследования были проведены с применением в качестве внутреннего стандарта – адаманта.

Разработку теста «Растворение» таблеток кемантана проводили в соответствии с требованиями ОФС 42 0003-04 на приборе «Лопастная мешалка», скорость вращения – 50 об/мин, температура – $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. В качестве среды растворения была выбрана вода очищенная, объем среды растворения - 500 мл.

Нами была изучена кинетика высвобождения кемантана из таблеток. Пробы были отобраны через 5, 10, 15, 20, 30, 45 минут, объем проб составлял 5 мл. После отбора пробы фильтровали через фильтр типа «Миллипор» с диаметром пор 0,22 мкм. 2 мл профильтрованной пробы помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 2 мл исходного раствора внутреннего стандарта (адамантина) в ацетоне и доводили объем раствора до метки ацетоном (испытываемые растворы).

Около 0,02 г (точная навеска) РСО кемантана помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 50 мл воды очищенной и доводили объем раствора до метки тем же растворителем. Затем 2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 2 мл ацетонового раствора смеси стандартов (адамантина и адамантин-2-она с концентрациями исходных растворов 0,2 мг/мл*) и доводили объем раствора до метки ацетоном (раствор для оценки поправочного коэффициента).

*Исходный раствор смеси стандартов: около 0,02 г адамантина и 0,02 г адамантин-2-она (точные навески) помещали в мерную колбу на 100 мл, прибавляли 50 мл ацетона, помещали в УЗВ на 5 мин, затем доводили объем раствора до метки тем же растворителем и тщательно перемешивали.

Результаты исследования показали, что за 15 минут в раствор высвобождается не менее 99% кемантана, для построения кривой зависимости высвобождения кемантана в раствор от времени было решено отбирать пробы через более короткие интервалы времени: 3, 5, 10, 15, 20 минут.

Результаты исследования показали, что за 5 минут в раствор высвобождается не менее 64 % кемантана, а за 15 минут в раствор переходит не менее 90 % препарата (Рисунок 56).

Количество кемантана, высвободившегося в раствор (%), вычисляли по формуле:

$$X = \frac{k \times S_{\text{кем}} \times m_{\text{ст}} \times 500 \times 10 \times 2 \times P \times 100\%}{S_{\text{ст}} \times N \times 10 \times 100 \times 2}, \quad (23)$$

после сокращения:

$$X = \frac{k \times S_{\text{кем}} \times m_{\text{ст}} \times P \times 500}{S_{\text{ст}} \times N}, \quad \%, \quad (24)$$

где K – поправочный коэффициент,

$S_{\text{кем}}$ – площадь пика кемантана на хроматограмме испытуемого раствора, мВ х мин;

$m_{\text{ст}}$ – навеска внутреннего стандарта, в граммах;

$S_{\text{ст}}$ – площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора, мВ х мин;

a – содержание кемантана в одной таблетке, в граммах;

P – содержание основного вещества в стандартном образце адамантана в десятичных долях.



Рисунок 56 - Кинетика высвобождения кемантана из таблеток в водной среде

В выбранных условиях был проведен анализ серийных образцов таблеток кемантана.

Испытуемый раствор и раствор РСО готовили так же, как и при изучении кинетики высвобождения кемантана из лекарственной формы.

Как видно из данных Таблицы 70, за 15 мин из всех образцов таблеток в раствор переходило не менее 90% действующего вещества.

Таблица 70

Результаты анализа серийных образцов таблеток

№ Серии / Содержание кемантана, высвободившегося из таблеток, %	117.12	756.12	724.12
за 10 мин	85,84	74,77	71,47
за 15 мин	90,62	99,79	91,64

На основании полученных данных было определено время проведения теста – 15 минут, а также количество вещества, которое должно перейти в раствор по истечении заданного промежутка времени – не менее 80% (Q).

5.1.7. Изучение стабильности таблеток кемантана 100 мг при хранении, установление срока годности

Изучение стабильности лекарственной формы кемантана проводили методом «ускоренного старения» в соответствии с инструкцией И-42-2-82 [19]. Таблетки термостатировали при температуре 40°C и 60°C в течение срока, эквивалентного 1 и 2 годам хранения в естественных условиях. По истечении сроков хранения проводили анализ по всем фармакопейным показателям качества.

Контроль качества таблеток кемантана осуществляли в соответствии с требованиями ГФ XI, вып. 2, с. 154 [25] и по разработанным методикам анализа. Результаты анализа представлены в таблицах 71 и 72.

В процессе хранения таблеток кемантана 100 мг методом «ускоренного старения» при 60°C наблюдалось появление бесцветных прозрачных кристаллов на стенках тары (Рисунки 57, 58). По истечении 23 суток был проведен микроскопический и хроматографический анализ образовавшихся кристаллов. Как видно из рисунка 58, кристаллы в основной своей массе представляют собой единичные образования с четкими контурами, что не совпадает с характером организации и формой кристаллов исходной очищенной субстанции кемантана (Рисунок 41). Однако при последующем анализе методом ГЖХ на колонке «VF-

624 ms» было установлено, что кристаллы принадлежат не только субстанции кемантана, но и ее технологической примеси, адамантан-2,6-диону, одновременно с кемантаном подвергающейся возгонке в условиях исследования. Нужно отметить, что наблюдаемая возгонка в виде отдельных кристаллов при хранении не оказала заметного влияния на качество готового продукта: таблетки после срока, эквивалентного 2 годам хранения при температуре 60°C, соответствовали по всем показателям качества установленным нормам.

Явление возгонки не наблюдалось при хранении таблеток кемантана 100 мг при температуре 40°C. Таблетки после срока, эквивалентного 2 годам хранения при температуре 40°C, также соответствовали по всем показателям качества установленным нормам.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что таблетки кемантана 100 мг, полученные прямым прессованием, выдерживают хранение методом «ускоренного старения».

На основании проведенного эксперимента установлен предварительный срок годности таблеток кемантана 100 мг – 2 года и рекомендован температурный режим хранения – от +15°C до +25°C.

Таблица 71

Результаты хранения таблеток кемантана 100 мг методом «ускоренного старения» при температуре 60°C

№ серии	Срок хранения	Внешний вид	Подлинность	Средняя масса таблетки, г	Отклонение от средней массы, %	Распадаемость	Посторонние примеси	Растворение	Количественное определение, г/таблетка
Норма	23сут. – 1 год; 46 сут. – 2 года	Таблетки белого или почти белого цвета, двояковыпуклой формы	ГЖХ (RT пика кемантана должно соответствовать RT пика стандарта)	От 0,185 г до 0,215 г (0,2 ± 7,5%)	18/20: ± 7,5%; 2/20: ± 15%	Не более 15 мин	ГЖХ: адамантан-2,6-дион - не более 2,5 %	Не менее 80% (Q) за 15 минут	От 0,095 до 0,105
117.12	0	Таблетки белого или почти белого цвета, двояковыпуклой формы	соответствует	0,2022	2,87	8 мин 00 сек	1,32	90,62	0,1013
	23	-//-	соответствует	-	-	7 мин 30 сек	1,24	-	0,1042
	46	-//-	соответствует	-	-	9 мин 16 сек	1,31	-	0,1046
724.12	0	-//-	соответствует	0,2028	2,66	7 мин 57 сек	1,26	91,64	0,1011
	23	-//-	соответствует	-	-	8 мин 28 сек	1,45	-	0,0969
	46	-//-	соответствует	-	-	7 мин 40 сек	1,46	-	0,1011
756.12	0	-//-	соответствует	0,2050	2,39	8 мин 37 сек	1,32	99,79	0,1002
	23	-//-	соответствует	-	-	9 мин 00 сек	1,29	-	0,1006
	46	-//-	соответствует	-	-	10 мин 50 сек	1,21	-	0,0997

Таблица 72

Результаты хранения таблеток кемантана 100 мг методом «ускоренного старения» при температуре 40°C

№ серии	Срок хранения	Внешний вид	Подлинность	Средняя масса таблетки, г	Отклонение от средней массы, %	Распадаемость	Посторонние примеси	Растворение	Количественное определение, г/таблетка
Норма	91 сут. – 1 год; 182 сут. – 2 года	Таблетки белого или почти белого цвета, двояковыпуклой формы	ГЖХ (RT пика кемантана должно соответствовать RT пика стандарта)	От 0,185 г до 0,215 г (0,2 ± 7,5%)	18/20: ± 7,5%; 2/20: ± 15%	Не более 15 мин	ГЖХ: адамantan -2,6-дион - не более 2,5 %	Не менее 80% (Q) за 15 минут	От 0,095 до 0,105
117.12	0	Таблетки белого или почти белого цвета, двояковыпуклой формы	соответствует	0,2022	2,87	8 мин 00 сек	1,31	90,62	0,1013
	91	-//-	соответствует	-	-	8 мин 00 сек	1,29	-	0,1013
	182	-//-	соответствует	-	-	9 мин 13 сек	1,31	-	0,1018
724.12	0	-//-	соответствует	0,2028	2,66	3 мин 57 сек	1,26	91,64	0,1004
	91	-//-	соответствует	-	-	4 мин 21 сек	1,26	-	0,0999
	182	-//-	соответствует	-	-	5 мин 42 сек	1,33	-	0,1006
756.12	0	-//-	соответствует	0,2050	2,39	8 мин 37 сек	1,32	99,79	0,1002
	91	-//	соответствует	-	-	7 мин 11 сек	1,34	-	0,1011
	182	-//-	соответствует	-	-	8 мин 05 сек	1,30	-	0,1017

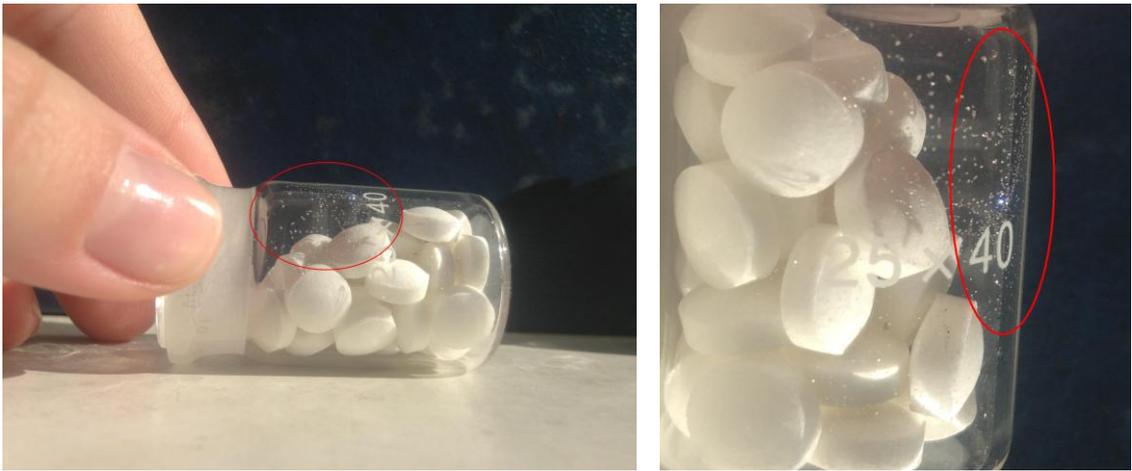


Рисунок 57 - Кристаллы адамантана и адамантан-2,6-диона, образовавшиеся в результате возгонки

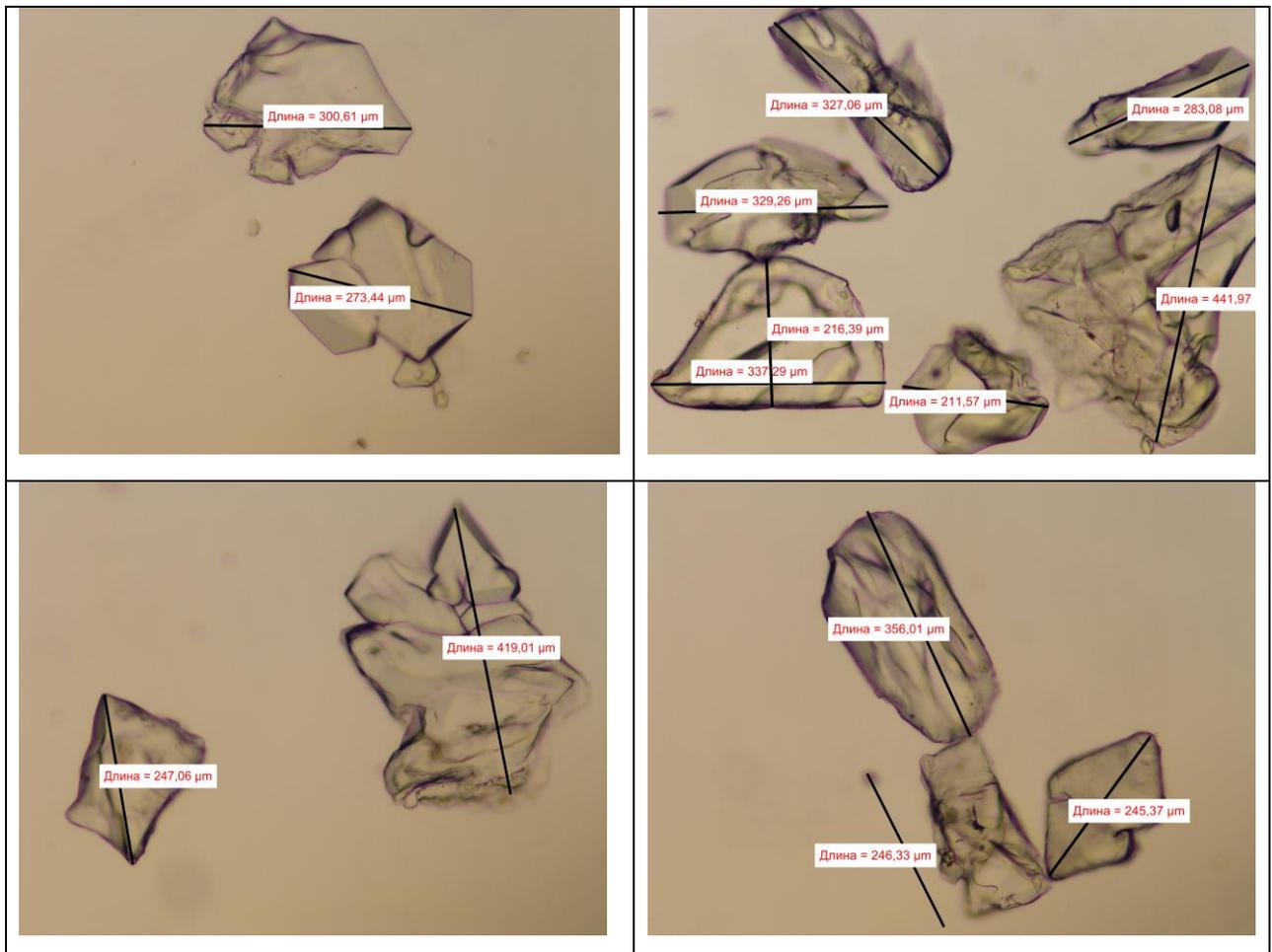


Рисунок 58 - Кристаллы кемантана и адамантан-2,6-диона после возгонки при хранении методом «ускоренного старения» при 60°C.

5.2. Установление норм качества таблеток кемантана

На основе проведенных исследований и полученных результатов были установлены нормы качества твердой дозированной лекарственной формы - таблетки кемантана дозировкой 100 мг, полученные прямым прессованием. Данные представлены в Таблице 73.

Таблица 73

Нормы качества таблеток кемантана

Показатели	Метод испытания	Результаты анализа	Нормы
Описание	Визуально	Таблетки белого или почти белого цвета, плоскоцилиндрической формы, без риски	Таблетки белого или почти белого цвета, плоскоцилиндрической формы, без риски
Подлинность	УФ-СФМ	Наличие в области от 250 до 350 нм максимума поглощения при 285 ± 2 нм	УФ-спектр испытуемого водного раствора в области от 250 до 350 нм должен иметь максимум поглощения при длине волны (285 ± 2) нм
	ГЖХ (методика «Посторонние примеси»)	Относительное время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора совпадало с относительным временем удерживания пика кемантана на хроматограмме раствора стандарта	Относительное время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора должно совпадать с относительным временем удерживания пика кемантана на хроматограмме раствора стандарта
Средняя масса	ГФ XI, вып.2, с.154	От 0,1995 г до 0,2050 г	От 0,185 г до 0,215 г ($0,2 \pm 7,5\%$)
Отклонение от средней массы	ГФ XI, вып.2, с.154	отклонение от средней массы не более $\pm 3,86\%$	18/20: $\pm 7,5\%$; 2/20: $\pm 15\%$
Распадаемость	ГФ XI, вып.2, с.154	Не более 11 мин	Не более 15 мин
Посторонние примеси	ГЖХ	адамantan-2-он – отсутствие; адамantan-2,6-дион – не более 2,5 %	адамantan-2-он – должен отсутствовать; адамantan-2,6-дион – не более 2,5 %
Микробиологическая чистота	ГФ XII, ч. 1, с. 160	препарат соответствует категории 3А	Категория 3А
Растворение	ГФ XI, вып.2, с.154 и ОФС 42-0003-04, ГЖХ	Более 90 % за 15 минут	Не менее 80% (Q) за 15 минут
Количественное определение	ГЖХ	от 0,0971 г до 0,1050 г	от 0,095 г до 0,105 г ($0,1 \pm 5\%$)

Упаковка	По 10 таблеток в банки оранжевого стекла типа БВ 10-28 по ОСТ 64-2-71-80 с навинчиваемыми крышками по ОСТ 64-2-87-81. Свободное от таблеток пространство в банках заполняют ватой медицинской гигроскопической по ГОСТ 5556-81. На банки наклеивают этикетки из бумаги писчей по ГОСТ 18510-87 или этикеточной по ГОСТ 7625-86. Каждую банку вместе с инструкцией по применению помещают в пачку из картона коробочного марки А или типа хром-эрзац по ГОСТ 7933-75. Пачки помещают в групповую упаковку. Групповая и транспортная упаковка в соответствии с ГОСТ 17768-80.
Маркировка	На этикетке, наклеиваемой на банку, и на пачке на русском языке указывают торговое название таблеток, МНН, наименование компании-владельца регистрационного удостоверения, ее товарный знак, адрес, количество таблеток в упаковке, номер серии, дату выпуска, срок годности, условия хранения, назначение, «Применять по назначению врача», «Хранить в недоступном для детей месте», условия хранения и штрих-код. Маркировка групповой и транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96 и МУ 9467-015-05749470-98
Хранение	В сухом, защищенном от света месте, при температуре от +15°C до + 25°C.
Срок годности	2 года

По итогам проведенных исследований на базе разработанных и представленных в Главе 5 аналитических методик, а также на основе совокупности данных по анализу серийных образцов, был разработан проект Фармакопейной статьи предприятия на таблетки кемантана 100 мг, получаемые прямым прессованием (Приложение Б).

ВЫВОДЫ ПО ГЛАВЕ 5

1. Проведен анализ серийных образцов таблеток кемантана 100 мг. Определены основные фармакопейные показатели качества и спектральные характеристики таблеток методом УФ-СФМ.

2. Изучены хроматографические характеристики кемантана и его примесей в таблетках 100 мг. Разработана методика определения примесей в таблетках кемантана 100 мг с помощью ГЖХ.

3. Разработана методика количественного определения кемантана в таблетках с помощью ГЖХ. Показано, что разработанная методика обладает большей специфичностью, правильностью и воспроизводимостью, чем методика УФ-спектрофотометрии.

4. Разработана методика количественного определения кемантана при проведении теста «Растворение». Посредством метода ГЖХ показано, что через 15 минут в среду растворения высвобождается не менее 80 % действующего вещества (кемантана).

5. Изучена стабильность таблеток кемантана 100 мг методом «ускоренного старения» при 40°C и 60°C. Установлен предварительный срок годности таблеток - 2 года, рекомендуемая температура хранения – от +15°C до + 25°C.

6. Установлены нормы качества таблеток кемантана, разработан проект ФСП на таблетки кемантана 100 мг.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Для постадийного контроля производства субстанции кемантана предложен комплекс методик, включающий определение качества исходных и вспомогательных веществ, контроль критических этапов получения кемантана из адамантан-2-она, очистки технической субстанции и стандартизацию готового продукта. Обоснована необходимость проведения дополнительной стадии очистки субстанции кемантана кристаллизацией из смеси толуол-хлороформ.

2. Изучены физико-химические свойства и спектральные характеристики субстанции кемантана методами ИК-, УФ- и ЯМР ^1H - спектроскопии. Показано, что эти методы могут быть использованы в контроле качества субстанции.

3. Изучено хроматографическое поведение кемантана и его примесей на набивных и капиллярных колонках различной полярности. Установлено, что наилучшее разделение кемантана и основной примеси, адамантан-2,6-диона, достигается на колонках со среднеполярной и полярной неподвижной фазой. Разработана и валидирована методика определения посторонних примесей в субстанции кемантана методом ГЖХ-ПВД. Обоснованы нормы их содержания.

4. Разработана и валидирована методика количественного определения субстанции кемантана методом ГЖХ с ПВД. Доказаны ее преимущества по сравнению с ранее предложенной методикой оксимирования.

5. Определены фармакопейные показатели и нормы качества таблеток кемантана 100 мг, предложен комплекс испытаний подтверждения подлинности, определения посторонних примесей и высвобождения действующего вещества в тесте «Растворение» с помощью метода ГЖХ-ПВД.

6. Изучена стабильность фармацевтической субстанции и таблеток кемантана при хранении методом «ускоренного старения». Доказано, что

предварительный срок годности субстанции и таблеток составляет 2 года.

7. Разработаны проекты Фармакопейных статей предприятия на субстанцию и таблетки кемантана 100 мг, а также раздел «Контроль производства» лабораторного регламента на производство субстанции кемантана.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдюнина, Н. И. Синтез и постадийный контроль субстанции кемантан / Н. И. Авдюнина, А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская и др. // Материалы сборника тезисов докладов IV Съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии»: сб. ст. / Казань – Казань, 2012. – С. 7.
2. Аксенова, Э. Н. Руководство к лабораторным занятиям по фармацевтической химии / Э. Н. Аксенова, О. П. Адрианова, А. П. Арзамасцев и др. – М. : Медицина, 2001. – 384 с.
3. Арзамасцев, А. П. Ультрафиолетовые и инфракрасные спектры лекарственных веществ: Атлас. / А. П. Арзамасцев. – М. : Медицина, 1981. 176 с.
4. Арзамасцев, А. П. Выявление фальсифицированных лекарственных средств с использованием современных аналитических методов / А. П. Арзамасцев, В. Л. Дорофеев, А. А. Коновалов и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, № 3. – С. 48–51.
5. Арзамасцев, А. П. Государственные стандартные образцы лекарственных веществ. Проект общей фармакопейной статьи / А. П. Арзамасцев, В. Л. Дорофеев, Н. П. Садчикова // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. – 2000. – № 3. – С. 24–26.
6. Арзамасцев, А. П. Современное состояние проблемы применения ИК-спектроскопии в фармацевтическом анализе лекарственных средств / А. П. Арзамасцев, Н. П. Садчикова, А. В. Титова // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т.42, № 8. – С. 26–30.
7. Артемьева, Н. Н. Руководство к лабораторным занятиям по органической химии / Н. Н. Артемьева, В. Л. Белобородов, С. Э. Зурабян и др. ; под. ред. Н. А. Тюравкиной. – М. : Дрофа, 2002. – 384 с.
8. Арцимович, Н. Г. Синдром хронической усталости : монография / Н. Г. Арцимович, Т. С. Галушина. – М. : Научный мир, 2001. – 221с.

9. Арцимович, Н. Г. Экспериментальное изучение иммуотропной активности нового лекарственного препарата кемантан / Н. Г. Арцимович, Т. Г. Фадеева, Т. С. Галушина и др. // Иммунология. – 1990. – № 6. – С. 21–23.
10. Багрий, Е. И. Адамтананы: Получение, свойства, применение / Е. И. Багрий. – М. : Наука, 1989. – 264 с.
11. Балыклова, Кс. С. Новые методы в оценке качества сульфаниламидов. Дифференциальная сканирующая калориметрия, термогравиметрический анализ, нарушенное полное внутреннее отражение, ближняя инфракрасная спектроскопия : дис. ... канд. фарм. наук : 14.04.02 / Ксения Сергеевна Балыклова – М., 2011. – 171 с. - илл.
12. Белобородов, В. Л. Органическая химия : учеб. для вузов : В 2 кн. / В. Л. Белобородов, С. Э. Зурабян, А. П. Лузин, Н. А. Тюкавкина ; под ред. Н. А. Тюкавкиной. – 4-е изд., стереотип. - Кн. 1 : Основной курс. – М. : Дрофа, 2003. – 638 с.
13. Бёккер, Ю. Спектроскопия / Ю. Бёккер. – М. : Техносфера, 2009. – 528с.
14. Бёккер, Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза. / Ю. Бёккер. – М. : Техносфера, 2009. – 472 с.
15. Бойко, С. С. Использование метода газо-жидкостной хроматографии для изучения фармакокинетики и метаболизма производных адамантана / С. С. Бойко, В. П. Жердев, Н. А. Кисляк // Химико-фармацевтический журнал. – 1991. – Т.54, №1. – С. 76–78.
16. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / под ред. В.В. Береговых. – М. : Литтерра, 2008. — 132 с.
17. Витенберг, А. Г. Статический парофазный газохроматографический анализ. Физико-химические основы и области применения / А. Г. Витенберг // Журн. Рос. о-ва им. Д. И. Менделеева. – 2003. – Т. XLVII, № 1. – С. 7–22.

18. Волкова М. Ю., Меринова С. В., Степаненко О. Б. А.С. 1482392 СССР, МКИ4 А61К31/00, G 01№31/00. Способ количественного определения кетонов; Бюл. изобрет. № 43-44. – 1993.
19. Временная инструкция по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе метода «ускоренного старения» при повышенной температуре: И-42-8-82 : утв. М-ом здравоохранения СССР. – М. : 1982. – С. 13.
20. Государственный стандарт качества лекарственных средств, Общая фармакопейная статья 42-0003-04 «Растворение» - Москва, 2004.
21. Государственная Фармакопея Российской Федерации XII издания. Ч. 1. / Минздравсоцразвития России ; изд. XII. – М. : Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – 704 с.
22. Государственная фармакопея Республики Беларусь. В 3 т. Т. 3. Контроль качества фармацевтических субстанций / УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». – Минск : Минский ГПТК полиграфии им. В. Хоружей, 2009. – 728 с.
23. Государственная Фармакопея СССР X издания / МЗ СССР ; изд. X. – М. : Медицина, 1968. – 1078 с.
24. Государственная Фармакопея СССР XI издания в 2 вып. Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР; изд. XI. – М. : Медицина, 1987. – 336 с.
25. Государственная Фармакопея СССР XI издания в 2 вып. Вып. 2. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР ; изд. XI. – М. : Медицина, 1989. – 400 с.
26. Дегтерев, Е. В. Анализ лекарственных средств в исследованиях, производстве и контроле качества / Е. В. Дегтерев // Журнал рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева. – 2002. – Т. XLVI, № 4. – С. 43–51.
27. Денеш, И. Титрование в неводных средах / И. Денеш. – М. : Мир, 1971. – 386 с.
28. Дёрффель, К. Статистика в аналитической химии / К. Дёффель ; пер. с нем. Петровой Л.Н. – М. : Мир, 1994. – 268 с.

29. Джемилев, У. М. Пат. 2342358 Рос. Федерация, МПК C070C 49/513, C07C 45/64. Способ получения 1-гидроксиадаматан-4-она / Джемилев У.М., Хуснутдинов Р.И., Щаднева Н.А., Мухаметшина Л.Ф., Ошнякова А.М., Атнабаева А.М. - №2007104483/04 ; заявитель и патентообладатель Институт нефтехимии и катализа РАН ; заявл. 05.02.07 ; опубл. 27.12.08, Бюл. № 36. – 6 с.
30. Долбнев, Д. В. Идентификация лекарственных средств методом ближней инфракрасной спектроскопии : автореф. дис. ... канд. фарм. наук : 14.04.02 / Дмитрий Владимирович Долбнев. – М., 2010. – 24 с.
31. Дуденкова, М. Е. Фармацевтический анализ и стандартизация лекарственных форм тропоксина и ладастена – препаратов нейротропного действия : дисс...канд. фарм. наук : 14.04.02 / Мария Евгеньевна Дуденкова. – М., 2012. – 202 с.
32. Елизарова, Т. Е. Спектрофотометрия в ближней инфракрасной области как метод контроля качества лекарственных средств : дисс. ... канд. биол. наук : 15.00.02 / Татьяна Евгеньевна Елизарова – М., 2009. – 169 с.
33. Караванова, Д. Е. Фармацевтический анализ нового психотропного средства «Ладастен» и комбинированной лекарственной формы на его основе. : дис. ... канд. фарм. наук. : 15.00.02 / Дарья Евгеньевна Караванова – М., 2004. – 169 с.
34. Кисляк, Н. А. Создание твердых дозированных лекарственных форм производных адамантана : дис. ... канд. фарм. наук. 15.00.01 / Николай Александрович Кисляк. – М., 1989. – 168 с.
35. Климова, Н. В. Пат. 2104994 Рос. Федерация. Способ получения 1-гидроксиадамантан-4-она. Лекарственное средство «Кемантан» / Климова Н.В., Авдюнина Н.И., Пятин Б.М., Пушкарь Г.В., Самсонова О.Л., Ефимовцева М.Б., Большакова Р.Ф., Середенин С.Б. ; заявитель и патентообладатель Научно-исследовательский институт фармакологии РАМН. - № 94023807/04 ; заявл. 23.06.94 ; опубл. 20.02.98, Бюл. № 3. – 5 с.

36. Ковалев, И. Е. Влияние производного адамантана, обладающего анти-ВИЧ активностью, на окислительно-восстановительные процессы в системе цитохрома P-450 / И. Е. Ковалев, Н. В. Шипулина // Доклады РАН. – 2001. – Т. 378. – № 6. – С. 819–822.
37. Ковалев, И. Е. Производное адамантана как принципиально новое средство терапии хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей / И. Е. Ковалев, В. М. Кошкин, Н. В. Шипулина // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, № 3. – С. 3–5.
38. Колосова, Е. А. Топология полиэдрических молекул на примере производных адамантана. / Е. А. Колосова, С. В. Курбатова, Н. В. Соловьева // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. – 2001. – № 2 (20). – С.178–187.
39. Константинова, К. К. Исследование взаимосвязи между физико-химическими свойствами и хроматографическим удерживанием некоторых производных адамантана / К. К. Константинова, В. Г. Березкин. С. В. Курбатова и др. // Журнал прикладной химии. – 2005. - № 78 (9). – С. 1522–1526.
40. Константинова, К. К. Физико-химические закономерности удерживания производных адамантана в высокоэффективной газовой хроматографии : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 02.00.04 / Ксения Константиновна Константинова ; – Саратов, 2006. – 175 с.
41. Кудашева, Н. В. Исследование термодинамики сорбции производных адамантана на полимерных неподвижных фазах различной полярности в условиях газожидкостной хроматографии / Н. В. Кудашева, С. Н. Яшкин, А. А. Светлов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т. 10. – Вып. 5. – С. 685–694.
42. Кудашева, Н. В. Исследование сорбции производных адамантана в условиях ГЖХ на неполярном сорбенте OV-101 / Н. В. Кудашева, А. А. Светлов // Проблемы теоретической и экспериментальной химии. Тезисы докладов

- XVII Российской молодёжной конференции / Екатеринбург. – Екатеринбург, 2007. – С. 98–99.
43. Курбатова, С. В. Исследование "эффекта клетки" в производных адамантана методом газожидкостной хроматографии / С. В. Курбатова, С. Н. Яшкин, И. К. Моисеев и др. // Журнал физической химии. – 1999. – Т. 73, № 9. – С. 1654–1657.
44. Курбатова, С. В. Газовая хроматография производных адамантана : дис. ... д-ра хим. наук : 02.00.20 / Светлана Викторовна Курбатова – Самара, 2000. – 295 с.
45. Курбатова, С. В. Исследование хроматографического поведения кислородсодержащих производных адамантана / С. В. Курбатова, Е. А. Колосова, Н. В. Соловова // Вестник СамГУ. – 2000. – №4 (18). – С.167–172.
46. Курбатова, С. В. Метод структурной аналогии в исследовании адамантана и его производных / С. В. Курбатова, Е. Е. Финкельштейн, Е. А. Колосова // Журнал структурной химии. – 2004. – Т. 4, № 1. – С. 150–157.
47. Курбатова, С. В. Исследование взаимосвязи между структурой и хроматографическим поведением карбонильных производных адамантана в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ / С. В. Курбатова, Н. Ю. Шуская // Вестник СамГУ - Естественнонаучная серия. Второй спецвыпуск – 2004. – С. 123–130.
48. Литвин, Е. А. Биотрансформация и фармакокинетика нового противопаркинсонического препарата гимантана. (Экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 14.03.06 / Евгений Александрович Литвин. – М., 2012. – 24 с.
49. Литвин, Е. А. Биотрансформация и фармакокинетика нового противопаркинсонического препарата гимантана. Экспериментальное исследование : дис. ... канд. биол. наук : 14.03.06 / Евгений Александрович Литвин – М., 2012. – 94 с.

50. Литвин, Е. А. Биотрансформация и фармакокинетика производных адамантана / Е. А. Литвин, Г. Б. Колыванов, В. П. Жердев // Фармакокинетика и фармакодинамика. – № 1. – 2012. – С. 18–24.
51. Маркина, М. Л. Иммунокоррекция с применением тактивина и кемантана в комплексном лечении больных с переломами нижней челюсти, осложненными воспалительными процессами : дис. ... канд. мед. наук : 14.00.21, 14.00.16 / Марина Львовна Маркина. – М., 2001. – 111 с.
52. Машковский, М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский ; 16-е изд., перераб., исп. и доп. – М. : 2012. – 1216 с.
53. Мирозоян, Р. С. Производное адамантана усиливает кровоснабжение ишемизированного мозга / Р. С. Мирозоян, Т. С. Ганьшина, Д. В. Масленников // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – Т. 75, № 6. – С. 27–30.
54. Морозов, И. С. Актопротекторные и адаптогенные свойства производных адамантана. Обзор / И. С. Морозов, Т. А. Иванова, Т. А. Лукичева // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 3–5.
55. Морозов, И. С. Фармакология адамантанов / И. С. Морозов, В. И. Петров, С. А. Сергеева – Волгоград : Волгоградская медицинская академия, 2001. – 320 с.
56. Морозова, М. А. Новые подходы к контролю качества лекарственных средств на основе спектрометрии в ближней ИК-области : дис...канд. хим. наук : 14.04.02 / Мария Андреевна Морозова. – М., 2012. – 180 с.
57. Новаков, И. А. Пат. 2319688 Рос. Федерация, МПК C07C 49/513, C07C 45/28. Способ получения 1-гидроксиадамантан-4-она / Новаков И.А., Орлинсон Б.С., Савельев Е.Н.; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО ВолгГТУ. – 2006133675/04 ; заявл. 20.09.06 ; опубл. 20.03.08, Бюл. № 8 – 7 с.
58. Отто, М. Современные методы аналитической химии / М. Отто ; 3-е изд. – М. : Техносфера, 2008. – 544с.
59. Петренко, Е. С. Экспериментальное изучение фармакокинетики оригинального противопаркинсонического препарата гимантана : автореф.

- дис. ... канд. биол. наук : 14.00.25 / Евгения Сергеевна Петренко. – М., 2003. – 25 с.
60. Петухов, Д. И. Методическая разработка. Хроматография и хроматомасс-спектрометрия / Д. И. Петухов, А. А. Елисеев - М.: Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова. Факультет наук о материалах, 2011. - 110 с.
61. Правила производства и контроля качества лекарственных средств : ГОСТ Р 52249-2009 : утв. Фед. агентством РФ по тех. регулированию и метрологии 20.05.09. – М. : Ростехрегулирование, 2009. – 10 с.
62. Приказ Об утверждении Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств : № 916 : утв. М-ом. промышленности и торговли РФ 14.06.13.. – М. : Минпромторг РФ, 2013. - 295 с.
63. Прокопов, С. В. Закономерности сорбции азотсодержащих производных адамантана на сверхсшитых полимерных сорбентах : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 02.00.04 / Сергей Валерьевич Прокопов. – Самара, 2012. – 23 с.
64. Рекалова, Е. М. Клинико-иммунологические нарушения при хроническом бронхите и их иммунокоррекция кемантаном : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.43, 14.00.36 / Елена Михайловна Рекалова. – Киев, 1990. – 19 с.
65. Рудакова, Л. В. Применение хроматографии в фармацевтическом анализе / Л. В. Рудакова, О. Б. Рудаков, А. М. Григорьев // Материалы сборника тезисов докладов Всероссийской конференции «Хроматография – народному хозяйству» / Дзержинск. – Дзержинск, 2010. – С. 65.
66. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств : Методические рекомендации / под ред. Н.В. Юргеля. – М., 2007. – 48 с.
67. Сакаева, И. В. Изложение методик высокоэффективной жидкостной хроматографии в стандартах качества лекарственных средств / И. В.Сакаева, А. И. Лутцева, О. А. Ваганова // Ведомости Научного Центра Экспертизы Средств Медицинского Применения. – 2014. – № 1. – С. 4–14.
68. Сергеева, М. С. Анализ и стандартизация новых лекарственных форм гимантана и кардиоциклида - препаратов нейротропного и кардиотропного

- действия : дис. ...канд. фарм. наук : 14.04.02 / Мария Сергеевна Сергеева – М., 2011. – 182 с.
69. Слепенькин, А. В. Метаболизм адамантана и его производных бактериями рода *Pseudomonas*, несущими плазмиду биодegradации камфоры : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.23 / Анатолий Владимирович Слепенькин – Пущино, 2000. – 141 с.
70. Смехова, И. Е. Тест «Растворение» и современные подходы к оценке эквивалентности лекарственных препаратов. Обзор // Журнал «Разработка и регистрация лекарственных средств» №1(2) февраль 2013. [Электронный ресурс]. – Электрон. журн. - № 1(2). – С. 50 - 61. – Режим доступа : <http://pharmjournal.ru/articles/stati/test-rastvorenie-i-sovremennyye-podxodyi-k-oczenke-ekvivalentnosti-lekarstvennyix-preparatov-obzor>.
71. Сноу, Н. Новые направления в газохроматографическом анализе фармацевтических препаратов / Н. Сноу // Журнал рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева. – 2003. – Т. XLVII, № 1. – С. 49–54.
72. Спасов, А. А. Фармакологические и токсикологические свойства производных адамантана // Химико-фармацевтический журнал. – 2000. – Т. 34, № 1. – С. 3–9.
73. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения: Отраслевой стандарт : ОСТ 91500.05.001.00 : утв. М-ом здравоохранения РФ 01.11.2001. – М. : 2001.
74. Стыскин, Е. Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е. Л. Стыскина, Л. Б. Ициксон, Е. В. Брауде. – М. : Химия, 1986. – 288 с.
75. Сычев, К. С. Подготовка пробы в газовой и жидкостной хроматографии / К. С. Сычев. – Орел : КОКОРО, 2012. – 155 с.
76. Сычев, К. С. Практический курс жидкостной хроматографии / К. С. Сычев. - Орел : Кокоро, 2013. - 261 с., [16] л. ил. : ил.

77. Ся Юй. Физико-химические методы в анализе водорастворимых витаминов. (Сравнительная оценка) : автореф. дис. ... канд. фарм. наук : 14.04.02 / Юй Ся. – М., 2010. – 24 с.
78. Терехова, Н. В. Лечение кемантаном больных с рецидивирующим афтозным стоматитом / Н. В. Терехова // Стоматология – 1990 – №1. – С.31–33.
79. Титова, А. В. Анализ римантадина гидрохлорида методом ближней ИК-спектроскопии / А. В. Титова, А. П. Арзамасцев, С. В. Григорьев // Химико-фармацевтический журнал. – Т. 43 – № 9 – 2009. – С. 53–56.
80. Толкачева, А. В. Количественное определение субстанции кемантана химическим методом и методом газожидкостной хроматографии / А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская, Н. И. Авдюнина и др. / Материалы сборника тезисов докладов XXI Российского нац. конгресса «Человек и лекарство» / Москва. – М., 2014. – С. 340.
81. Толкачева, А. В. Разработка и валидация методики количественного определения действующего вещества в таблетках кемантана методом газожидкостной хроматографии / А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская, Н. И. Авдюнина и др. // Вестник ВолГМУ. – 2014. – Вып. 1(49). – С. 97–100.
82. Толкачева, А. В. Разработка и валидация методики количественного определения действующего вещества в таблетках кемантана методом газожидкостной хроматографии в тесте «Растворение» / А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская, Н. И. Авдюнина и др. // Естественные и технические науки. – 2014. – №8. – С. 62 – 67.
83. Толкачева, А. В. Разработка и валидация методики количественного определения кемантана в таблетках методом газовой хроматографии / А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская, Н. И. Авдюнина и др. // Материалы сборника тезисов докладов XXI Российского нац. конгресса «Человек и лекарство» / Москва. – М., 2014. – С. 339–340.
84. Толкачева, А. В. Разработка и валидация методики количественного определения остаточных органических растворителей в фармацевтической

- субстанции кемантана методом ГЖХ-ПИД / А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская, Н. И. Авдютина и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49, № 1. – С. 42-47.
85. Толкачева, А. В. Разработка и валидация методики количественного определения посторонних примесей в фармацевтической субстанции кемантана методом ГЖХ-ПИД / А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская, Н. И. Авдютина и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47, № 6. – С.44–50.
86. Толкачева, А. В. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции кемантана с помощью газожидкостной хроматографии / А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская, Н. И. Авдютина и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2013. – Т. 47, № 12. – С.42–47.
87. Толкачева, А. В. Определение содержания посторонних примесей в субстанции кемантана / А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская, Л. М. Гаевая и др. // Материалы сборника тезисов докладов XIX Российского национального конгресса «Человек и лекарство» / Москва. – М., 2012. – С. 429–430.
88. Толкачева, А.В. Применение метода газожидкостной хроматографии в анализе остаточных органических растворителей в субстанции кемантана / А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская, Л. М. Гаевая и др. // Материалы сборника тезисов докладов IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» / Казань. – Казань, 2012. – С. 179.
89. Толкачева, А. В. Установление подлинности лекарственного средства кемантан методом инфракрасной спектроскопии в ближнем диапазоне/ А. В. Толкачева, К. С. Балыклова, Л. Н. Грушевская и др. // Материалы сборника тезисов докладов XIV Всероссийского научно-практического семинара «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств» / Волгоград. – Волгоград, 2012. – С. 72–73.
90. Толкачева, А. В. Применение метода ИК-спектроскопии в анализе субстанции кемантана / А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская, А. Д. Малинкин

- и др. // Материалы сборника тезисов докладов XIX Российского национального конгресса «Человек и лекарство» / Москва. – М., 2012. – С. 430.
91. Финкельштейн, Е. Е. Хроматографическая идентификация промежуточных продуктов синтеза некоторых кетонов адамантанового ряда / Е. Е. Финкельштейн, С. В. Курбатова, О. И. Маряшина // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. - 2002. - № 4(26). - С.129-136.
92. Хенке, Х. Жидкостная хроматография / Х. Хенке. – М. : Техносфера, 2009. – 264 с.
93. Хуснутдинов, Р.И. Пат. №2491270 Рос. Федерация, МПК С07С 49/513, С07С 45/30. Способ получения 1-гидроксиадамантан-4-она / Хуснутдинов Р.И., Джемилев У.М., Щаднева Н.А., Маякова Ю.А., Сагитова З.Р. ; заявитель и патентообладатель Институт нефтехимии и катализа РАН. – № 2011101003/04 ; заявл. 12.01.11 ; опубл. 27.08.13, Бюл. № 24. – 7 с.
94. Царев, Н. И. Практическая газовая хроматография: Учебно-методическое пос. / Н. И. Царев, В. И. Царев, И. Б. Катраков. — Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2000. - 156 с.
95. Цветкова, Е. А. Фармацевтический анализ и стандартизация нового антипаркинсонического средства гимантан : дис...канд. фарм. наук : 15.00.02 / Евгения Анатольевна Цветкова. – М., 2002. – 196 с.
96. Шмидт, В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов / В. Шмидт. – М. : Техносфера, 2007. – 368 с.
97. Шумская, Н. Ю. Физико-химические закономерности удерживания производных адамантана в жидкостной хроматографии : дис. ... канд. хим. наук : 02.00.04 / Н. Ю. Шумская. – Саратов, 2005 – 156 с.
98. Яшин, Я. И. Газовая хроматография / Я. И. Яшин, Е. Я. Яшин, А. Я. Яшин. – М. : ТрансЛит, 2009. – 528 с.
99. Яшкин, С. Н. Исследование физико-химических закономерностей адсорбции производных адамантана в условиях газовой хроматографии: автореф. дис.

- ... канд. хим. наук : 02.00.04 / Сергей Николаевич Яшкин. – Саратов, 2000. – 21 с.
100. Яшкин, С. Н. Хроматографическое разделение и термодинамика сорбции производных адамантана : дис. ... д-ра хим. наук : 02.00.04, 02.00.02 / Сергей Николаевич Яшкин. – Саратов, 2014. – 497 с.
101. Abdullah, E. S. A. Synthesis and biological testing of new 1-adamantyl derivatives. PhD thesis / E. S. A. Abdullah – Riyadh : KSU, 2007. – 168 p.
102. Askal, H. F. Quantitative Thin-Layer Chromatographic Method for Determination of Amantadine Hydrochloride / H. F. Askal, A. S. Khedr, I. A. Darwish et al. // International Journal of Biomedical Science. – 2008. – Vol. 4 – Is. 2 – P.155–160.
103. Bell, St. G. A cytochrome P450 class I electron transfer system from *Novosphingobium aromaticivorans* // St. G. Bell, D. Alison, N. H. Rees // ChemBioChem. – 2010. – № 86. – P. 163–175.
104. Blumenstein, M. NMR Studies of Drugs. Rimantadine. Rigorous ¹H and ¹³C Assignments and Applications of Lanthanide Shift Reagents / M. Blumenstein, J. Ross, R. Rothchild // Spectroscopy Letters: An International Journal for Rapid Communication. – 2003. – Vol. 23. – Iss. 3. – P. 301–331.
105. British Pharmacopoeia 2009 / H.M. Stationary Office. – London: H.M. Stationary Office, 2009. – 10952 p.
106. Chan, Le Q. Capillary gas chromatographic procedure for the analysis of nine common residual solvents in water-insoluble bulk pharmaceuticals / Q. Chan Li, K. A. Cohen, G. Zhuang // Journal of Chromatographic Science. – 1998. – Vol. 36. – P. 119–124.
107. Changqin, H. Quality Control in Pharmaceuticals: Residual Solvents Testing and Analysis, Wide Spectra of Quality Control / H. Changqin, L. Ying ; ed. by I. Akyar. – [Electronical resource]. – Electronical data. – InTech. cop. 2011. – Made access:<http://www.intechopen.com/books/wide-spectra-of-quality-control/quality-control-in-pharmaceuticals-residualsolvents-testing-and-analysis>.
108. Dou, Y. Simultaneous non-destructive determination of two components of combined paracetamol and amantadine hydrochloride in tablets and powder by

- NIR spectroscopy and artificial neural networks // Y. Dou, Y. Sun, Y. Ren // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2005. – Vol. 37. – Iss. 3. – P. 543–549.
109. European Pharmacopeia. 7th edition / European Department for Quality of Medicines ; ed. 7th. – Strasbourg : EDQM - 2010.
 110. European Pharmacopeia. 8th edition / European Department for Quality of Medicines ; ed. 8th. – Strasbourg : EDQM - 2013.
 111. Fieser, L. F. Naphthoquinone antimalarials. XXX. 2-hydroxy-3-[omega-(1-adamantyl)-alkyl-1,4-naphthoquinones / F. L. Fieser, M. Z. Nazer, D. A. Berberian // Journal of the Medical Chemistry, 1967. – №. 10. – P. 517–521.
 112. Fort, R. C. Adamantane. The Chemistry of Diamond Molecules / R. C. Fort. – N.Y. : Marcell Dekker, 1976. – 385 p.
 113. Fujino, H. Determination of Amantadine in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection // Analytical Sciences. – 1997. – Vol. 13. – P. 467-470.
 114. Geluk, H.W. Stable nitric acid complexes of adamantanes / H. W. Geluk // Tetrahedron Letters. – 1971. – № 47. – P. 4473–4476.
 115. Geluk, H. W. Hydride transfer reactions of the adamantyl cation—II : Synthesis of 1,3- and 1,4-disubstituted adamantanes / H. W. Geluk, J. L. M. Schlatman // Tetrahedron. – 1968. - № 24. – P. 5369–5377
 116. Geluk, H. W. An Improved Synthesis of 1,4-Disubstituted Adamantanes / H. W. Geluk // Synthesis. – 1972. - № 7. – P. 374-375.
 117. Gerzon, K. The adamantyl group in medicinal agents. I. Hypoglycemic N-arylsulfonyl-N'-adanatylureas / K. Gerzon, E. V. Krumkalns, R. L. Brindle // Journal of the Medical Chemistry. –1963. – № 6. – P. 760–763.
 118. Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics : U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration 02.14. – Rockville : FDA, CDER, CBER, 2014. – 18 p.

119. Guidance for industry: Q3C Impurities: Residual Solvents. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Evaluation and Research (CDER). 2012
120. Guidance for industry: Q3C Impurities: Residual Solvents. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Evaluation and Research (CDER). 1997
121. Grodowska, K. Analytical methods for residual solvents determination in pharmaceutical products / K. Grodowska, A. Parczewski // *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug research*. – 2010. – Vol. 67. – № 1. – P. 13–26.
122. Groman, A. Validation of an analytical procedure – control of residual solvents in pharmaceutical substance / A. Groman, A. Kampe-Skaduda // *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. – 2008. – Vol. 65. – №. 6. – P. 783–787.
123. Hlavatý J., Vodička L. Způsob výroby 5-hydroxyadamantan-2-onu. Československa Socialistická Republika AO №163671; MPT C 07 c 49/38. MDT 547.518 – 1976.
124. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2(R1) [Electronic resource]. – Electronical data. Geneva cop. 2005. – Mode access: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>
125. ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients Q7. – 43p. – [Electronic resource]. – Electronical data. Geneva cop. 2000. – Mode access : <http://www.gmp-compliance.org/guidemgr/files/3-1-18.PDF>
126. Identification and Determination of Impurities in Drugs / Görög S. – Netherlands : Elsevier Science B.V., 2000. – 747 p.
127. Jacq, K. A Generic Method for the Analysis of Residual Solvents in Pharmaceuticals Using Static Headspace-GC-FID/MS / K. Jacq, Fr. David, S. Pat / Agilent Technologies publication. – 2008. - 5989-9726EN. – P. 1-12.

128. Jagathi, V. Spectrophotometric determination of memantine in bulk and in pharmaceutical formulations / V. Jagathi, B. Anupama, S. Praveen // International Journal of current pharmaceutical research. – 2004. – Vol. 2. – Is. 4. – P. 17–18.
129. Lamoureux, G. Use of the Adamantane Structure in Medicinal Chemistry. / G. Lamoureux, G. Artavia // Current Medical Chemistry. – 2010. – Vol. 17. – № 26. – P. 2967–2978.
130. Lokhande, M. V. Structural elucidation of process related impurity in memantine hydrochloride bulk drug bt GCMS, NMR and IR techniques / M. V. Lokhande, M. K. Gupta, N. G. Rathod // International journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences (IJMPS). – 2013. – Vol. 3. – Iss. 3. – P. 107–114.
131. Mahmoud, A. M. Selective Spectrophotometric and Spectrofluorometric Methods for the Determination of Amantadine Hydrochloride in Capsules and Plasma via Derivatization with 1,2-Naphthoquinone-4-sulphonate / A. M. Mahmoud, N. Y. Khali, I. A. Darwish // International Journal of the Analytic Chemistry. – 2009. – № 1. – P. 1-8.
132. Mansoori, G. A. Diamondoid Molecules / G. A. Mansoori / Advances in Chemical Physics. – 2007. – Vol. 136. – P. 207–258.
133. Michail, K. Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of memantine hydrochloride in bulk and pharmaceutical preparations / K. Michail, H. Daabees, Y. Beltagy // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2011. – Vol. 3. – Issue 3. – P. 180–185.
134. Michael, W. D. Modern HPLC for practicing scientists / W. D. Michael. – New Jersey : John Wiley & Sons Inc., 2006. – 304 p.
135. Modern Practice of Gas Chromatography / ed. R. L. Grob, E. F. Barry ; 4th edition. – New York : John Wiley & Sons Inc., 2004. – 1064 p.
136. Mudasir, M. Qualitative and quantitative estimation by HPLC method in transdermal formulation. A technical note / M. Mudasir, N. Tabassum, J. Ali // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2011. – Vol. 2. – Issue 1. – P. 231–241.

137. Narola, Bh. A validated stability-indicating Reverse Phase HPLC Assay Method for the Determination of Memantine Hydrochloride Drug Substance with UV-Detection Using Precolumn Derivatization technique / Bh. Narola, A.S. Singh, P. R. Santhakumar // *Analytical Chemistry Insights*. – 2010. – № 5. – P. 37-45.
138. Nomenclature of Organic Chemistry. IUPAC Recommendations and Preferred Name / Favre, Henri A. and Powell, Warren H. 2013. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 2013. ISBN 978-0-85404-182-4.
139. Omara, H. A. Spectrophotometric microdetermination of anti-Parkinsonian and antiviral drug amantadine HCl in pure and in dosage forms / H. A. Omara, A. S. Amin. – *Arabian Journal of Chemistry*. – 2011. – Vol. 4. – Iss. 3. – P. 287–292.
140. Reddy, P. B. Residual Solvents Determination by HS-GC with Flame Ionization Detector in Omeprazole Pharmaceutical formulations / P. B. Reddy, M. S. Reddy // *International Journal of PharmTech Research*. – 2009. – Vol. 1. – № 2. – P. 230–234.
141. Schleyer, P. R. The Preparation and Reactivity of 2-Substituted Derivatives of Adamantane / P. R. Schleyer, R. D. Nicholas // *Journal of the American Chemistry Society*. – 1961. - № 83 (1). – P. 182–187.
142. Siddappa, K. Development and validation of a gas chromatographic method for the assay of memantine hydrochloride in pure and tablet dosage forms / K. Siddappa, M. Mallikarjun, T. Mahesh // *Facta universitatis. Series: Physics, Chemistry and Technology*. – 2011 – Vol. 9 – № 1. – P. 1–8.
143. Sobczak, A. Determination of adamantane derivatives in pharmaceutical formulations by using spectrophotometric UV-Vis method / A. Sobczak, I. Muszalska, P. Rohowska // *Drug development and industrial pharmacy*. – 2013. – 39(5). – P. 657-661.
144. Spectral Database for Organic Compounds SDBS [Electronic resource]. – Electronic data. – National Institute of Advanced Industrial Science and Technology : SDBSWeb cop. (2012). – Mode access : <http://sdb.db.aist.go.jp>.
145. Stridevi, H. N. Synthesis, characterization and kinetic studies on complex formed between amantadine hydrochloride and sodium molybdate at physiological / H. N

- Sridevi, K. K. M. Yusuff // *Indian Journal of Chemistry*. – 2008. – Vol. 47A. – P. 836–842.
146. *The Japanese Pharmacopoeia*, 15th edition, 2006.
147. *The United States Pharmacopoeia*. 29th revision. National formulary 24th edition / USP 29 – NF 24; ed. 24th. – 2009.
148. *The United States Pharmacopoeia*. 37th revision. National formulary 32th edition / USP 37 – NF 32 ; ed. 32th. – 2014.
149. Westrum, E. F. Jr. The thermophysical properties of three globular molecules. / E. F. Jr. Westrum // *Journal of the Physical Chemistry Solids*. 1961. – Vol. 18. – № 1. – P. 83–85.
150. Zacharis, C. K. Determination of rimantadine in human urine by high performance liquid chromatography using a monolithic stationary phase and on-line post-column derivatization / C. K. Zacharis, D. P. Tzanavaras, G. A. Vlessidis // *Journal of Separation Science*, 2013. – Vol. 36. – Iss. 11. – P. 1720–1725 [Electronic resource]. – Electronic data. – cop. 2013. – Made access : <http://www.chemie.de/fachpublikationen/536067/determination-of-rimantadine-in-human-urine-by-high-performance-liquid-chromatography-using-a-monolithic-stationary-phase-and-on-line-post-column-derivatization.html>
151. [Electronic resource]. – Electronic data. – cop. 2014. – Made access : <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>
152. [Electronic resource]. – Electronic data. – cop. 2014. – Made access : <http://www.rlsnet.ru/>
153. [Electronic resource]. – Electronic data. – cop. 2014. – Made access : <http://www.vidal.ru/>

ПРИЛОЖЕНИЯ



OlainFarm

АО «Олайнский химико-фармацевтический завод»

Рег. № 000300724

ул. Рупницу 5, Олайне, LV-2114, Латвия,
тел.371 7013700, факс: + 371 7013777, + 371 7963089

Сертификат анализа No 8

КОПИЯ-1
22.08.2001
GPN kravu notormētāja
J. Staņukeviča

2 - Адамантанон

CAS No 700-58-3
Серия No. 8042001
Дата анализа 24.04.2001.
Количество 20 кг

Наименование показателей	Требования спецификации	Результаты анализов
Внешний вид	Кристаллический порошок белого цвета с кремовым оттенком	Кристаллический порошок с кремовым оттенком
Вода	Не более 0,5 %	0,09 %
1-Адамантанол	Не более 0,5 %	0,10 %
Количественное определение	Не менее 99,0 %	99,8 %

Соответствует спецификации



AK «Olainfarm»
KKN vadītāja
N. Veršilovska

Производственный
департамент

RD direktore

J. Čudinovska

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБНУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова», академик РАН

С.Б. Середенин

«*12*» *февраля* 2015 г



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: Методики постадийного контроля производства субстанции кемантана, методики стандартизации субстанции и таблеток кемантана 100 мг.

Кем предложен: Толкачевой А.В., аспирантом 2010-2014 гг. кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России заочной формы обучения, младшим научным сотрудником аналитической группы опытно-технологического отдела ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

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

Цель внедрения: Обеспечение надлежащего контроля производства субстанции, создание нормативных документов для стандартизации субстанции и таблеток кемантана 100 мг в виде Фармакопейных статей предприятия «Кемантан, субстанция», «Кемантан, таблетки 100 мг».

Результаты внедрения: Предложенные методики включены в лабораторный регламент на производство субстанции кемантана, в нормативную документацию на субстанцию и таблетки кемантана 100 мг, предназначенную для использования промышленными предприятиями.

Руководитель ОТО ФГБНУ
«НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова».

Б. М. Пятин

Пятин Б. М.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность моим научным руководителям: доктору фармацевтических наук, профессору Прокофьевой Вере Ивановне и доктору фармацевтических наук Грушевской Любови Николаевне за постановку задачи, научное руководство и поддержку на всех этапах выполнения работы.

Также выражаю благодарность руководителю ОТО ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», доктору фармацевтических наук, профессору Пятину Борису Михайловичу, ведущему научному сотруднику Авдюниной Нине Ивановне и всем сотрудникам ОТО за помощь при выполнении эксперимента.

Отдельная благодарность за ценные советы и помощь при выполнении исследования сотрудникам других лабораторий: Балыкловой Ксении Сергеевне, Малинкину Алексею Дмитриевичу, Ребеко Алексею Геннадьевичу.