Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Химический факультет
Кафедра органической химии

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГАК
Руководитель ООП
к.х.н, доцент
_____В.В. Шелковников
«_15_»_____06_____2020 г.

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

«ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОФИЛЯ ПРИМЕСЕЙ КОМБИНИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПИРИДОКСИНА»

по основной образовательной программе подготовки специалистов
04.05.01 – Фундаментальная и прикладная химия

Жирякова Арина Александровна

Зав. каф. органической химии
доцент, к.х.н.
_____ Ю.Г. Слижов

Руководитель ВКР
д.х.н. профессор
_____А.А. Бакибаев

Автор работы
студент группы 08503
_____ А.А. Жирякова

Томск – 2020

В соответствии с п. 3.2 «*Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки ТГУ*» выпускная квалификационная работа размещается в репозитории с изъятием некоторых разделов, в соответствии с решением правообладателя.

Руководитель ООП В.В. Шелковников

Национальный исследовательский Томский государственный университет
Химический факультет
Кафедра органической химии

«УТВЕРЖДАЮ»
Руководитель ООП, к.х.н., доцент
уч.степень, звание
_____ В.В. Шелковников
подпись инициалы, фамилия
«11» февраля 2020 г.

ЗАДАНИЕ НА ДИПЛОМНУЮ РАБОТУ

студентке Жиряковой Арине Александровне, группа 08503

1. Тема дипломной работы: Исследование профиля примесей комбинированных лекарственных препаратов пиридоксина.

2. Цели и задачи исследования

Цель: разработка методики анализа комбинированных лекарственных препаратов пиридоксина по показателю «Примеси» методом ВЭЖХ..

Задачи:

1 Провести поиск методов контроля пиридоксина по показателю «Примеси»;

2 Разработать условия хроматографического разделения примесей пиридоксина;

3 Провести исследование стабильности исследуемых препаратов;

4 Разработать способ выделения примесей в индивидуальной форме;

5 Идентифицировать выделенные примеси методами МС- и ЯМР-спектроскопии.

3. Объекты, методы исследования и оценка достоверности результатов

Объекты исследования:

Препарат I – таблетки, действующие вещества [пиридоксин + магния лактат];

Препарат II – таблетки, действующие вещества [придоксин + L-треонин];

Препарат III – таблетки, действующие вещества [лизоцим + пиридоксин].

Методы исследования: УФ-спектрофотомерия, QuEChERS, ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС, ЯМР.

4. Перечень основных этапов работы (сроки выполнения), ожидаемые результаты

1. Анализ литературы по теме работы (10.02.2020–10.03.2020).
2. Литературный обзор и представление результатов исследования (20.03.2020–21.05.2020).
3. Исследование стабильности исследуемых препаратов, разработка условий хроматографического разделения примесей пиридоксина (16.02.2020– 16.03.2020).
4. Идентификация и разработка способа выделения примесей пиридоксина (18.03.2020–5.05.2020).
5. Анализ полученных данных (05.05.2020–21.05.2020).

Ожидаемые результаты: хроматографическая система, обеспечивающая разделение примесей пиридоксина в его комбинированных препаратах.

5. Предприятие, организация, по заданию которого выполняется работа Химический факультет НИ ТГУ

Зав. кафедрой органической химии, доцент, к.х.н. _____ Ю. Г. Слижов

Руководитель дипломной работы, профессор, д.х.н _____ А.А. Бакибаев
подпись

Задание принял к исполнению «11» февраля 2020 _____ А.А. Жирякова
подпись

АННТОАЦИЯ

Целью работы является исследование профиля примесей комбинированных лекарственных препаратов пиридоксина. В соответствии с паспортом комбинированного лекарственного препарата пиридоксина (действующие вещества: [пиридоксин + магния лактат]) содержание неидентифицированных примесей превышает порог квалификации. Так как существующая методика анализа не позволяет идентифицировать все примеси, необходимо провести разработку новой методики, пригодной для анализа комбинированных препаратов пиридоксина по соответствующему показателю «Примеси».

В ходе работы проведен поиск известных методов анализа примесей пиридоксина, идентифицированы возможные примеси и описаны пути их образования. Проведен входной контроль пиридоксинсодержащих препаратов. Воспроизведена предложенная заводом методика анализа примесей комбинированного препарата пиридоксина с действующими веществами – [пиридоксин + магния лактат]. Показано, что методика непригодна для анализа комбинированных ЛС пиридоксина. Разработаны хроматографические условия, обеспечивающие разделение примесей пиридоксина и позволяющие выделять их в индивидуальной форме методом препаративной хроматографии. Используя метод ЯМР предположили структуру выделенной примеси пиридоксина.

При анализе препаратов согласно разработанным хроматографическим условиям удалось добиться большей эффективности, увеличить разрешение, а также сократить время проведения анализа.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1 Список обозначений и сокращений 3
2 Введение 4
3 Использованные материалы, образцы и средства измерения 7
4 Литературный обзор 9
4.1 Объекты исследования 9
4.2 Обзор методов анализа примесей пиридоксина 19
4.3 Препаративная ВЭЖХ 24
5 Практическая часть 26
5.1 Ион-парная ВЭЖХ 26
5.2 Разработка условий разделения методом ОФ ВЭЖХ 29
5.3 Выделение примесей методом препаративной ВЭЖХ 30
5.4 Анализ выделенной примеси методом ЯМР-спектроскопии 31
6 Заключение 34
7 Список источников 35

1 Список обозначений и сокращений

АФС	Активная фармацевтическая субстанция
ЛС	Лекарственное средство
ВЭЖХ	Высокоэффективно-жидкостная хроматография
МС	Масс-спектрометрия
ОФ ВЭЖХ	Обращено фазовая высокоэффективно-жидкостная хроматография
ПФ	Подвижная фаза
УФ, *UV*	Ультрафиолетовый
мин	Минута
ч	Час
С18	Неподвижная фаза (сорбент) н-октадецилсиликагель
PN	Пиридоксин
PL	Пиридоксаль
PM	Пиридоксамин
PNP	Пиридоксин-5'-фосфат
PLP	Пиридоксаль-5'-фосфат
PMP	Пиридоксамин-5'-фосфат
АТФ	Аденозинтрифосфат

2 Введение

Пиридоксин (лат. *Pyridoxinum*) – лекарственное вещество, относится к группе витаминов и витаминоподобных средств (витамин B_6). Играет важную роль в обмене веществ: необходим для нормального функционирования центральной и периферической нервной системы. Является коферментом белков, участвующих в переработке аминокислот и регулирующих усвоение белка. Участвует в равномерном снабжении клеток глюкозой. Применяется для лечения и профилактики недостаточности Витамина B_6 в результате неправильного питания и некоторых заболеваний [1, 2].

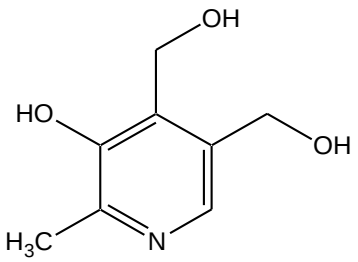


Рисунок 2.1 – Структурная формула пиридоксина

В качестве лекарственного препарата витамин B_6 используют в виде пиридоксина гидрохлорида. Также пиридоксин используется в комбинации с другими витаминами группы В, различными антибактериальными агентами, анестетиками и др. Основная цель комбинированных лекарственных средств заключается в повышении эффективности терапевтического действия и снижении или устранении побочных действий компонентов. Например: в магнийсодержащих препаратах (Магнистад, Магне B_6 и т.п.) пиридоксин улучшает всасывание магния из ЖКТ и его проникновение в клетки; L-треонин (рис. 2.2) в присутствии витамина B_6 (Биотредин) распадается с образованием аминокислоты глицина и ацетальдегида, которые стимулируют процессы торможения и одновременно окислительно-восстановительные реакции, процессы дыхания и синтеза АТФ в клетках, за счет чего препарат способен нормализовать уровень эндогенного ацетальдегида и тем самым повышать умственную работоспособность, понижать психоэмоциональное напряжение, уменьшать проявление влечения к алкоголю [3].

На витамин B_6 отрицательно воздействует витамин B_{12} при их одновременном присутствии в жидких формах витаминных препаратов: ион кобальта в молекуле B_{12} способствует разрушению витамина B_6 [4], за счет чего возникает риск уменьшения срока годности, образования примесей и др.

Примеси в препаратах возникают в результате: плохой очистки исходного сырья, возникновения побочных продуктов синтеза, механических загрязнений, остатков растворителей. Они могут накапливаться в ходе производства, хранения, различных побочных реакций и оказывают неблагоприятное воздействие на эффективность, безопасность, качество препаратов в целом. Пределы контроля, идентификации и квалификации родственных примесей для фармацевтических субстанций (в зависимости от максимальной суточной дозы лекарственного препарата) [5] приведены в таблице А.1.

Определение примесей производят методами масс-спектрометрии (МС), спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), ИК-Фурье спектроскопии (ИК-Фурье), а также их комбинациями. Метод ВЭЖХ по сравнению с другими имеет преимущества: одновременное разделение и анализ веществ; высокая эффективность разделения; не только разделение и анализ, но и препаративное выделение необходимых веществ.

Цель работы – исследование профиля примесей комбинированных лекарственных препаратов пиридоксина.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1 Провести поиск методов контроля пиридоксина по показателю «Примеси»;

2 Разработать условия хроматографического разделения примесей пиридоксина;

3 Провести исследование стабильности исследуемых препаратов;

4 Разработать способ выделения примесей в индивидуальной форме;

5 Идентифицировать выделенные примеси методом ЯМР-спектроскопии.

Актуальность работы:

Согласно требованиям ICH, ГФ РФ XIV должны контролироваться продукты деструкции фармацевтической субстанции и технологические примеси, обусловленные технологией производства. Все примеси с содержанием более 0,05% должны быть перечислены, более 0,1% – идентифицированы, более 0,15 % – квалифицированы (приложение А, табл. А.1). В соответствии с GMP для каждой АФС должен быть определен состав примесей (идентифицированных и неидентифицированных), присутствующих в обычной серии, произведенной в ходе конкретного контролируемого технологического процесса. Описание примесей должно включать в себя их идентификацию или какие-либо качественные аналитические параметры, позволяющие ее идентифицировать (например, время удерживания), диапазон содержания каждой выявленной примеси и их классификацию (неорганическая, органическая, растворитель) [6].

В соответствии с паспортом комбинированного лекарственного препарата пиридоксина, содержащего следующие действующие вещества: [пиридоксин + магния лактат], содержание неидентифицированных примесей превышает порог квалификации. Так как существующая методика анализа не позволяет идентифицировать все примеси, необходимо провести разработку новой методики, пригодной для анализа комбинированных препаратов пиридоксина по соответствующему показателю «Примеси» методом ВЭЖХ.

3 Использованные материалы, образцы и средства измерения

3.1.1 Исследуемый объект

Препарат I – таблетки, действующие вещества [пиридоксин + магния лактат]

3.1.2 Стандартные образцы

Стандартный образец пиридоксина гидрохлорида, CAS No: 58-56-0;
Стандартный образец магния лактата, CAS No: 18917-93-6.

3.1.3 Реактивы

Вода I типа, полученная с использованием системы очистки воды Simplicity-UV;
Ацетонитрил, for UV, IR, HPLC, ACS; CAS No.: 75-05-8, PanReac AppliChem;
Аммония дигидрофосфат, «ACS, Reagent grade, EP», CAS No.: 7722-76-1, Emsure;
Кислота ортофосфорная 85 %, х. ч., ГОСТ 6552-80, Компонент Реактив;
Кислота уксусная ледяная, х. ч., ГОСТ 61-75;
Кислота муравьиная 85 % х. ч., ГОСТ 5848-73;
Метанол, for Gradient HPLC, Baker, CAS No.: 67-56-1;
Раствор аммиака 25 %, х. ч., ГОСТ 3760-79;
Натрий 1-гептансульфоната моногидрат, ч., CAS: 207300-90-1;
Натрия гидрофосфат дигидрат;
Натрия хлорид.

3.1.4 Средства измерения и вспомогательное оборудование

Весы неавтоматического действия GR-200;
Полупрепаративный жидкостной хроматограф на базе Shimadzu LC-20;
Жидкостной хроматограф Ultimate 3000, Thermo Scientific;
Спектрофотометр Shimadzu UV-1800;
Жидкостной квадрупольный масс-спектрометр API 2000 («AB Sciex»);
ЯМР-спектрометр Bruker AVANCE III HD (400 МГц);
pH-метр/иономер ИТАН (ООО «НПП Томьаналит»);
Ультразвуковая ванна Elmasonic P10H.

3.1.5 Материалы

Колонка 4,6 × 250 мм, неподвижная фаза PerfectSil Target ODS-3 HD, 5 мкм;
Колонка 4,6 × 100 мм, неподвижная фаза Zorbax Extend, 3,5 мкм;

Колба мерная 2 – 10 – 2 по ГОСТ 1770-74;

Колба мерная 2 – 25 – 2 по ГОСТ 1770-74;

Колба мерная 2 – 100 – 2 по ГОСТ 1770-74;

Колба мерная 2 – 500 – 2 по ГОСТ 1770-74;

Колба мерная 2 – 1000 – 2 по ГОСТ 1770-74;

Пипетка на 2 – 1 – 2 по ГОСТ 1770-74;

Пипетка на 2 – 2 – 2 по ГОСТ 1770-74;

Пипетка на 2 – 5 – 2 по ГОСТ 1770-74;

Пипетка на 2 – 10 – 2 по ГОСТ 1770-74;

Пипетка на 2 – 25 – 2 по ГОСТ 1770-74;

Дозатор механический одноканальный 100–1000 мкл, LLG Labware;

Дозатор механический одноканальный 20–200 мкл, Thermo Scientific;

Цилиндр 1 – 500 – 1 по ГОСТ 1770-74;

Цилиндр 1 – 250 – 1 по ГОСТ 1770-74;

Цилиндр 1 – 10 – 1 по ГОСТ 1770-74;

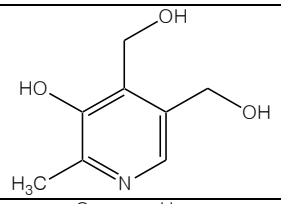
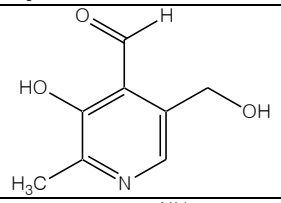
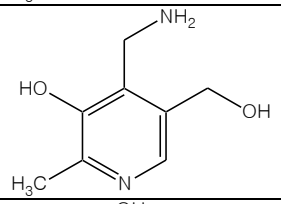
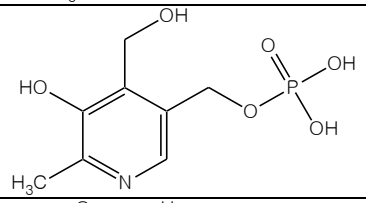
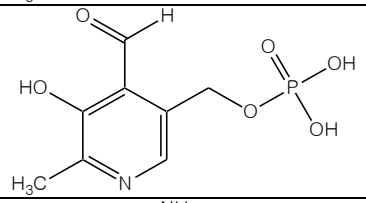
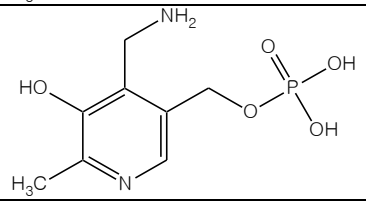
Виалы стеклянные прозрачные, 2 мл, резьба 9-425.

4 Литературный обзор

4.1 Объекты исследования

Основным объектом исследования является пиридоксин (витамин B_6) в составе комбинированных препаратов. Группа соединений, обладающих активностью пиридоксина включает в себя несколько родственных соединений: пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин и их фосфорилированные формы.

Таблица 4.1.1 – Соединения, обладающие активностью витамина B_6

Международное непатентованное название	Сокращение	Химическое название (IUPAC), CAS No.	Структурная формула
Пиридоксин	PN	2-метил-3-гидрокси-4,5-дигидроксиметилпиридин CAS No.: 65-23-6	
Пиридоксаль	PL	2 метил-3-гидрокси-5-гидроксиметил-4-карбоксипиридин CAS No.: 66-72-8	
Пиридоксамин	PM	2-метил-3-гидрокси-5-гидроксиметил-4-аминометилпиридин CAS No.: 66-72-8	
Пиридоксин-5'-фосфат	PNP	2-метил-3-гидрокси-5-[(фосфоокси)-метил]-4-гидроксиметил¬пиридин CAS No.: 447-05-2	
Пиридоксаль-5'-фосфат	PLP	2-метил-3-гидрокси-5-(фосфоокси)-метил]-гидроксиметил-4-карбоксипиридин CAS No.: 54-47-7	
Пиридоксамин-5'-фосфат	PMP	3-гидрокси-2-метил-5-[(фосфоокси)-метил]-4-аминометилпиридин CAS No.: 529-96-4	

В качестве самостоятельного лекарственного средства и в составе комплексных ЛС для внутреннего применения витамин B_6 используется в виде пиридоксина, так как эта

форма является наиболее стабильной. Некоторые комбинированные препараты, содержащие пиридоксин [3], представлены в табл. 4.1.2.

Таблица 4.1.2 – Комбинированные лекарственные формы пиридоксина

Действующие вещества	Торговое наименование	Фармакологическая группа
Бенфотиамин + Пиридоксин	Мильгамма композиитум Бенфо-Биновит Полиневрин	Витамины и витаминоподобные средства
Теризидон + Пиридоксин	Теризидон + Пиридоксин-Мак Резонизат плюс Теризидон плюс Локсидон плюс Тизидон Нео	Другие синтетические антибактериальные средства в комбинациях
Лизоцим + Пиридоксин	Лизобакт Лоролизин	Антисептики и дезинфицирующие средства в комбинациях
Пиридоксин + Треонин	Биотредин	Витамины и витаминоподобные средства в комбинациях Средства для коррекции нарушений при алкоголизме, токсико- и наркомании
Магния цитрат + Пиридоксин	Магний В6 Магвит	Витамины и витаминоподобные средства в комбинациях Макро- и микроэлементы в комбинациях
Магния лактат + Пиридоксин	Магнистад	Макро- и микроэлементы в комбинациях
Циклосерин + Пиридоксин	Коксерин Плюс Цикломицин плюс Цикло плюс	Другие антибиотики в комбинациях
Пиридоксин + Валерианы экстракт	Валерианы экстракт 20 мг + B_6	Витамины и витаминоподобные средства в комбинациях
Изониазид + Пиридоксин	Фтизоактив Изозид комп.	Другие синтетические антибактериальные средства в комбинациях
Этилметилгидроксипиридина сукцинат + [Пиридоксин]	МексиВ6	Антигипоксанты и антиоксиданты в комбинациях
Пиридоксин + Цианокобаламин + Фолиевая кислота	Медивитан Ангиовит	Витамины и витаминоподобные средства в комбинациях
Изониазид + Этамбутол + Пиридоксин	Фтизоэтам В6	Другие синтетические антибактериальные средства в комбинациях
Изониазид + Рифампицин + [Пиридоксин]	Рифакомб Тубавит	Другие синтетические антибактериальные средства в

Действующие вещества	Торговое наименование	Фармакологическая группа
	Протуб-2	комбинациях
Пиридоксин + Тиамин + Цианокобаламин + [Лидокаин]	Бинавит форте Комбилипен НЕО Нейробион Нейромультивит	Витамины и витаминоподобные средства в комбинациях
Пиридоксин + Пиразинамид + Протионамид + Рифабутин	Протубутин	Другие синтетические антибактериальные средства в комбинациях
Пиразинамид + Протионамид + Рифабутин + [Пиридоксин]	Комбилипен КомплигамВ Мильгамма Витаксон Тригамма Ларигама Витагамма Бинавит Эллигамин Сертогамма	Другие синтетические антибактериальные средства в комбинациях
Диклофенак + Пиридоксин + Тиамин + Цианокобаламин	Клодифен Нейро Нейродикловит	НПВС — Производные уксусной кислоты и родственные соединения в комбинациях Витамины и витаминоподобные средства в комбинациях
Изониазид + Пиразинамид + Рифампицин + Этамбутол + Пиридоксин	Протубвита	Другие синтетические антибактериальные средства в комбинациях
Изониазид + Пиразинамид + Рифампицин + Этамбутол + Пиридоксин	Ласлонвита Протуб-4 плюс Изокомб Репин В6	Другие синтетически антибактериальные средства в комбинациях
Ломефлоксацин + Пиразинамид + Протионамид + Этамбутол + Пиридоксин	Протуб-5 Протуб-Ломе Ломекомб	Другие синтетические антибактериальные средства в комбинациях
Изониазид + Левофлоксацин + Пиразинамид + Рифампицин + [Пиридоксин]	Левофлорипин	Хинолоны/фторхинолоны в комбинациях Другие синтетические антибактериальные средства в комбинациях
Пустырника трава+[Магния аспарагинат+Пиридоксин]	Пустырник Форте Эвалар Формула спокойствия	Другие нейротропные средства в комбинации
Ломефлоксацин + Пиразинамид + Протионамид + Этамбутол + Пиридоксин	Протиокомб	Хинолоны/фторхинолоны в комбинациях Другие синтетические антибактериальные средства в комбинациях

Пиридоксина гидрохлорид в свободном виде представляет собой белый или почти белый кристаллический порошок. Легко растворим в воде, мало растворим в спирте 96%, практически нерастворим в хлороформе.

В ходе исследований [7] по определению пиридоксина, отмечена заметная его нестабильность к свету при pH = 6,8 или выше. При pH = 1,0 он практически не подвержен влиянию. Но даже в отсутствие света пиридоксин постепенно разрушается во влажной атмосфере, причем разрушение ускоряется при повышении температуры [8].

Пиридоксин стабилен при нагревании до 100 °C в 5H серной или соляной кислоте или 5H гидроксиде натрия. Даже автоклавирование сильных кислотных или щелочных растворов пиридоксина под давлением не оказывает воздействия. Следовательно, пиридоксин стабилен в большинстве сильных кислот и оснований при нагревании. Однако во время кипения в азотной кислоте он подвергается окислительной деградации. Перманганат калия и пероксид водорода также способны разрушать пиридоксин даже при комнатной температуре. Диоксид марганца, с другой стороны, не оказывает никакого эффекта. В различных фармацевтических препаратах (мультивитаминные таблетки, капсулы или комплексные таблетки витамина B) количество пиридоксина уменьшалось лишь незначительно или совсем не уменьшалось, когда их держали при 45 °C в течение 500 ч [7]. Таким образом, можно сделать вывод, что пиридоксин стабилен в смешанных витаминных препаратах, подвергнутых ускоренным испытаниям на хранение.

Анализ препаратов пиридоксина с помощью ВЭЖХ в исследовании [9] показал, что при одинаковых условиях стабильность стандартных растворов витамина B_6 уменьшалась, а стандартных растворов отдельных форм пиридоксина (PN, PL, PM, PNP, PMP, PLP) оставалась в норме. Все формы были стабильны при индивидуальном хранении в темноте, кроме PLP. Растворы данной формы были стабильны при хранении в замороженном виде (–20 °C) в воде в концентрации 1 мг/мл (pH = 3,3). Однако хранение при комнатной температуре в темноте в течение суток, либо в натрий-ацетатном буфере (pH = 5,5), либо в дистиллированной воде (pH = 6,1) приводило к потере 20% или 95% PLP соответственно. Появление на хроматограмме пика, идентифицированного как PL по времени его удержания, предполагало, что фосфатный эфир (PLP) подвергается реакции гидролиза в этих условиях. Пик PL составил 85% потерянного PLP. При приготовлении в 0,01M HCl PLP был стабильным в течение по меньшей мере 2-х дней при комнатной температуре.

Соединения, влияющие на стабильность стандартных растворов витамина B_6, представляют собой альдегидные (PL и PLP) и аминные (PM и PMP) формы.

Рассмотрение химического состава этих форм предполагает, что при соответствующих условиях можно ожидать образования оснований Шиффа. Чтобы исследовать наблюдаемые явления, взаимодействие PLP исследовали отдельно на PM и PMP в отсутствие других форм витамина B_6. PLP обладает более высокой реакционной способностью [10, 11], чем PL, поскольку PL существует в растворе в виде циклического гемиацеталя [12].

Стабильность двух двойных стандартов (PLP и PM: PLP и PMP) исследована в следующих условиях: концентрированное (0,5 мг каждой формы B_6/мл; pH = 3,0) стандартное соединение, хранящееся при –20 °C, и рабочий стандартный раствор (0,5 пг/мл), хранящийся при комнатной температуре в темноте. Учитывая, что наблюдение проводили только за PLP, рабочий раствор готовили в исходном растворителе, необходимом для анализа ВЭЖХ (0,01M HCl). Оба рабочих раствора были стабильны в течение не менее 2-х дней при комнатной температуре в темноте. Хранение концентрированных двойных стандартов при –20 °C показало значительную потерю всех форм пиридоксина. В этих же условиях отдельные формы стабильны в течение многих месяцев. В течение 2-х дней хроматографический пики PLP и PMP снизились более чем на 40%, пик PM так же снизился, но в меньшей мере. Если стандарт соединения PLP-PM хранится при комнатной температуре в течение 2-х дней, наблюдаются следы как PL, так и PMP (идентифицированные по времени удерживания). Эти продукты могут возникнуть в результате переаминирования через промежуточное звено Шиффа.

Замороженные растворы PL с аминными формами демонстрируют свойства, аналогичные для PLP, но в значительно меньшей степени из-за более низкой реакционной способности PL по сравнению с PLP. Хранение в течение 4-х дней при –20 °C стандартов с концентрированными соединениями привело к снижению площадей пиков на 10% для отдельных форм, что значительно меньше, чем наблюдалось в растворах PLP.

Реакции образования оснований Шиффа и трансаминирования PLP и PL в растворах аминокислот [13, 14], растворах сложных эфиров аминокислот и модельных и реальных пищевых системах задокументированы в литературе [15]. В работе [9] показано, что эти реакции могут происходить между самими формами пиридоксина при комнатной температуре или ниже. Чтобы устранить эти эффекты, растворы витамина B_6 должны храниться отдельно, а составные стандарты должны быть приготовлены перед использованием в кислой среде.

В работе [38] разложение пиридоксина (PN), пиридоксаля (PL) и пиридоксамина (PM) во время термической обработки оценивали в жидких модельных пищевых системах

на основе казеина. Казеин – сложный белок (фосфопротеид), образующийся при створаживании молока Быстрых взаимопревращений PL и PM не наблюдалось. Кинетический анализ деградации витамина B_6 выявил примерно в 2,5-3,5 раза большую стабильность PN, по сравнению с другими нефосфорилированными формами витамина.

Кинетика деградации витамина B_6 исследованна с использованием модельной системы, содержащей: казеинат калия, сахарозу, аскорбиновую кислоту, железо и цинк, так как данная система обеспечивает промежуточную стабильность всех форм витаминов в композиции. Термическая обработка привела к значительному взаимопревращению форм PN. Небольшие количества PM были сформированы из PN, в то время как взаимное превращения PL и PM было более заметным.

Во время производства ЛС, субстанция подвергается различным воздействиям, в результате чего возможны побочные реакции или процессы распада. Согласно литературным данным, в субстанции и готовых лекарственных препаратах пиридоксина могут присутствовать примеси – продукты распада и технологические примеси.

Продукты распада – это соединения, полученные вследствие разложения объекта исследования или действующего вещества. Некоторые примеси могут появляться в процессе распада ФС или других взаимодействий при хранении, поэтому для обеспечения безопасности препарата существует потребность в изучении его стабильности. Продукты разложения могут быть результатами самого синтеза, хранения, производством лекарственной формы и ее старения.

Примеси в препаратах возникают главным образом в процессе синтеза из сырья, растворителей, промежуточных и побочных продуктов синтеза. Сырье, как правило, производится с гораздо меньшими требованиями к чистоте, чем ЛС, и, следовательно, оно может содержать ряд компонентов, влияющих на чистоту препаратов.

Некоторые примеси в препаратах или АФС могут возникать в результате взаимодействий с наполнителями, используемыми для приготовления ЛС. В процессе приготовления лекарственное вещество подвергается воздействию различных условий, которые могут привести к его разложению или другим реакциям. Например, использование высоких температур для сушки или по другим причинам, может способствовать разложению термолабильных компонентов состава. Растворы и суспензии подвержены деградации из-за гидролиза или сольволиза. Эти реакции также могут происходить в лекарственной форме в твердом состоянии, например, в случае капсул и таблеток, когда для грануляции используют воду или другие растворители [25]. Причиной

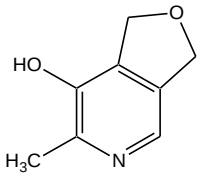
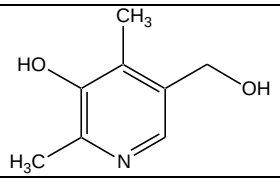
появления примесей старения являются некоторые взаимодействия, которые описаны ниже (табл. 4.1.3.).

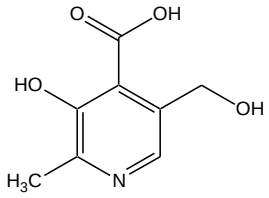
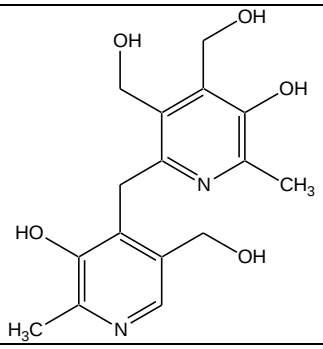
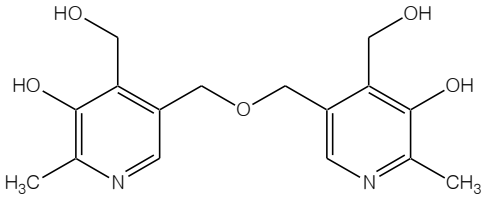
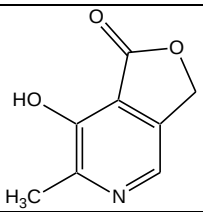
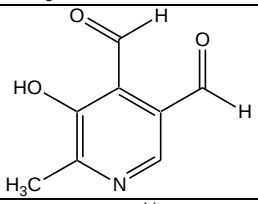
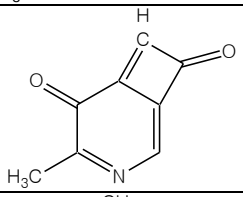
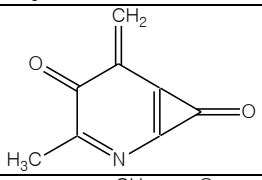
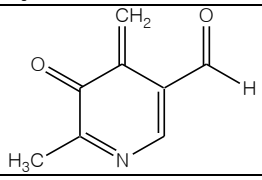
Таблица 4.1.3. – Причины появления примесей старения

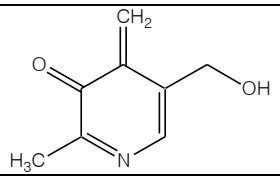
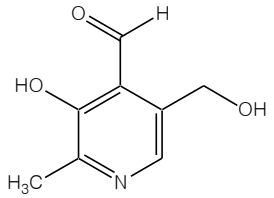
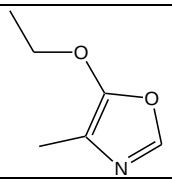
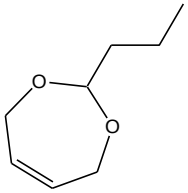
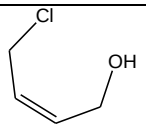
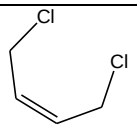
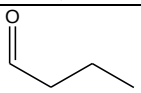
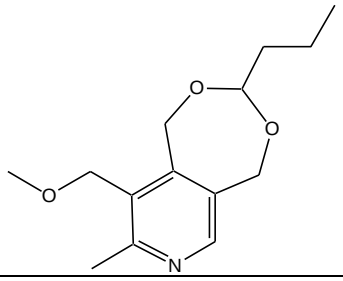
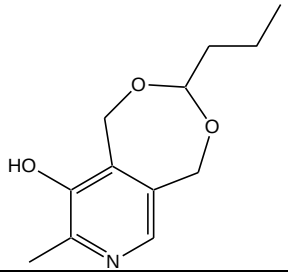
Взаимодействие	Описание
Взаимодействие между компонентами	В процессе старения витамины становятся очень неустойчивыми. Например, присутствие никотинамида в 4-х компонентной витаминной смеси (никотинамид, пиридоксин, рибофлавин и тиамин) вызывает распад тиамина к субстандартному уровню в течении первого года срока хранения [16].
Гидролиз	Большинство препаратов являются производными карбоновых кислот или содержат функциональные группы, которые чувствительны к кислотно-щелочному гидролизу.
Окисление	Наиболее распространенной формой окислительного разложения в ЛС является автоокисление через цепной, свободно-радикальный процесс. Препараты, которые склонны к окислению, включают метотрексат, адиназолам, катехоламины, сопряженные диены (например, витамин А), и нитрозо- и нитропроизводные.
Фотолиз	Фотолитическое расщепление продуктов старения происходит с ФС или лекарственными препаратами, которые склонны к распаду под воздействием ультрафиолетового излучения.
Декарбоксилирование	В основном происходит при нагревательных процессах.
pH	Крайние значения водородного паказателя, можгут способствовать гидролизу ФС, когда она находится в водном растворе в ионизированном состоянии. При производствах лекарственных форм, чувствительных к изменению pH, необходим буферный контроль.
Упаковочные материалы	При взаимодействиях ЛС с упаковочными материалами в процессе старения также возможно образование ряда примесей.

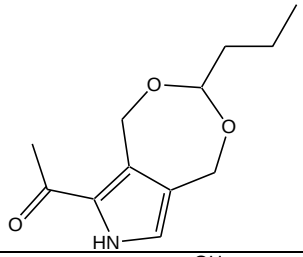
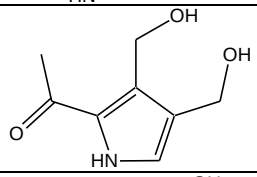
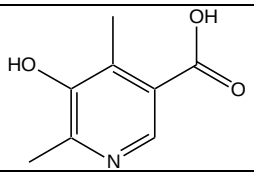
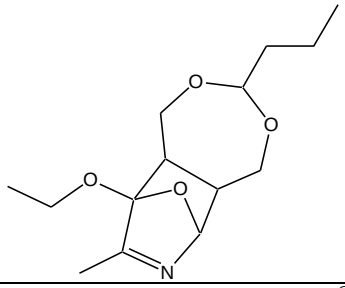
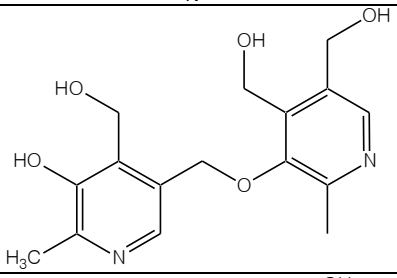
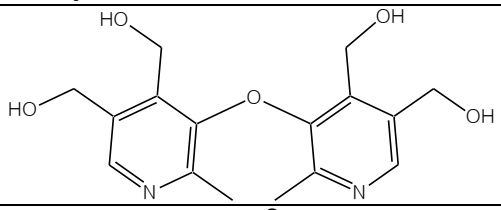
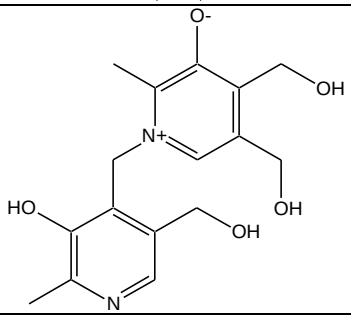
Теоретически в комбинированных лекарственных формах и АФС пиридоксина могут быть обнаружены следующие его примеси (табл. 4.1.4).

Таблица 4.1.4 – Примеси пиридоксина

№	Название примеси	Формула	CAS No., ссылка	Примечание
1	6-methyl-1,3-dihydrofuro[3,4-c]pyridin-7-ol; Impurity A		5196-20-3 [17, 18, 19]	Технологические примеси
2	5-(hydroxymethyl)-2,4-dimethylpyridin-3-ol; 4-deoxypyridoxine Impurity B		61-67-6 [17, 18, 19]	

№	Название примеси	Формула	CAS No., ссылка	Примечание
3	3-Hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methyl-4-pyridinecarboxylic Acid; 4-Pyridoxic Acid		82-82-6 [19]	Продукт окисления
4	Bispyridoxine; (5-Hydroxy-2-((3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-yl)methyl)-6-methylpyridine-3,4-diyl)dimethanol		19203-56-6 [19]	Продукты димеризации
5	5-({[5-hydroxy-4-(hydroxymethyl)-6-methylpyridin-3-yllmethoxy}methyl)-4-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-3-ol; Pyridoxine Impurity 8		- [20]	
6	7-hydroxy-6-methyl-3H-furo[3,4-c]pyridin-1-one; 4-Pyridoxic acid lactone		4753-19-9 [17, 21]	Продукты термической деградации (T > 150°C)
7	3-hydroxy-2-methylpyridine-4,5-dicarbaldehyde		19099-89-9 [17, 21]	
8	4-methyl-3-azabicyclo[4.2.0]octa-1,3,6-trien-5-one		- [17]	
9	3-methyl-5-methylene-2-azabicyclo[4.1.0]hepta-1(6),2-dien-4-one		- [17]	
10	6-methyl-4-methylene-5-oxo-4,5-dihydropyridine-3-carbaldehyde		- [17]	

№	Название примеси	Формула	CAS No., ссылка	Примечание
11	2-methyl-4-methylene-5-(hydroxymethyl)pyridin-3(4H)-one		- [17,21]	
12	Pyridoxal; Pyridoxaldehyde; 3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridine-4-carbaldehyde		66-72-8 [17,21]	
13	Pyridoxine Impurity 3; 5-Ethoxy-4-methyloxazole		5006-20-2 [17, 22]	Продукты окисления
14	Pyridoxine Impurity 4; 2-propyl-4,7-dihydro-1,3-dioxepine		4469-34-5 [21, 22]	
15	Pyridoxine Impurity 5		- [22]	
16	Pyridoxine Impurity 6; 1,4-dichloro-2-butene		1476-11-5 [21, 22]	
17	Pyridoxine Impurity 7; Butyraldehyde		123-72-8 [21, 22]	
18	Pyridoxine Impurity 8		- [22]	
19	Pyridoxine Impurity 9		1385767-86-1 [22]	

№	Название примеси	Формула	CAS No., ссылка	Примечание
20	Pyridoxine Impurity 10		- [22]	
21	Pyridoxine Impurity 11		- [22]	
22	Pyridoxine Impurity 12; 5-Hydroxy-4,6-dimethylpyridine-3-carboxylic acid		58947-70-9 [21, 22]	
23	Pyridoxine Impurity 13		1385767-85-0 [22]	Продукты димеризации
24	Pyridoxine Impurity 14		- [22]	
25	Pyridoxine Impurity 15		- [22]	
26	Pyridoxine Impurity 16		- [22]	

4.2 Обзор методов анализа примесей пиридоксина

Могут быть использованы различные методы разделения, в том числе тонкослойная хроматография (ТСХ), газовая хроматография (ГХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), капиллярный электрофорез (КЭ) и сверхкритическая жидкостная хроматография (СЖХ). Обзор этих методов приводится в литературном источинкие [23]. КЭ является методом электрофореза, который часто относят к хроматографическим методам, поскольку он использует много схожих общих хроматографических требований. При помощи ТСХ с использованием различных пластин и подвижных фаз может быть разделен широкий спектр соединений. ГХ является подходящим методом для количественного определения. Он может обеспечить необходимое разрешение, селективность и простоту определения. Этот метод подходит для определения летучих органических примесей. СЖХ имеет некоторые преимущества перед ГХ в плане определения и перед ВЭЖХ с точки зрения разделения [24].

Для разделения и количественного определения соединений витамина B_6 в биологических объектах использованы многие методы. Описаны методы ТСХ [26], ВЭЖХ [16, 17, 30–35] и МС [8].

4.2.1 Анализ примесей методом ТСХ

Хроматографическое разделение осуществляется в результате движения анализируемых веществ в тонком слое (неподвижной фазе), растворенных в растворителе или соответствующей смеси растворителей (подвижная фаза, элюент). При разделении вещества образуют на поверхности сорбента зоны адсорбции в виде пятен (круглых или эллипсовидных) или полос [25]. Тонкослойная хроматография (ТСХ) витамина B_6 удобнее, чем другие аналитические методы, и является предметом ряда исследований, включающих работу [26].

Проблема разделения нефосфорилированных форм витамина B_6 (PN, PL, PN и обычные метаболиты: 4-пиридоксиновая кислота и ее лактон) связана тем, что они относятся к двум разным классами соединений. Пиридоксамин легко отделяем от двух других нефосфорилированных форм витамина, тогда как отделение пиридоксаля от пиридоксина представляет некоторые трудности. Наиболее удовлетворительным методом разделения этих двух форм является превращение пиридоксаля в его этилацетат. Три формы разделены за один подход с использованием растворителя состава хлороформ:метанол 1:1. Пиридоксин образует комплекс с борной кислотой через фенольную ОН и 4-гидроксиметил- группы, в то время как другие формы витамина этого

не делают. Таким образом, пластины для ТСХ, обработанные борной кислотой, сильно тормозят пиридоксин, что позволяет отделить его от двух других простых форм витамина. Пиридоксин полностью задерживается полосой H_3BO_3, тогда как пиридоксаль задерживается лишь частично.

Для отделения пиридоксина от двух других простых форм на покрытые и активированные 2,5% борной кислотой в этаноле силикагелевые пластинки наносили несколько капель исследуемого раствора витамина B_6. От 0,5 до 20 мкг соединения было обнаружено на расстоянии около 2 см от нижнего края пластины. Пятна высушивали под феном при комнатной температуре. Для детекции использовали УФ-излучение при длине волны 254 нм.

4.2.2 Анализ примесей методом МС

Метод масс-спектрометрии – метод качественного и количественного анализа лекарственных средств, основанный на прямом измерении отношений массы к числу элементарных положительных или отрицательных зарядов ионов в газовой фазе, полученных из испытуемого вещества [27].

В работе [8] описан метод анализа продуктов деструкции пиридоксина в твердом виде методом EGA-IAMS. При скорости нагрева 128 °С/мин пиридоксин в основном испарялся в молекулярной форме и имел мало продуктов разложения. Обнаружили важный продукт деструкции о-хинонметид (№11 в табл. 4.1.3), который до этого исследования не определялся термическим разложением твердого пиридоксина. Измерения проводили на системе Li^+ IAMS (Canon ANELVA Corporation, Kanagawa, Japan) с использованием квадрупольного масс-анализатора с диапазоном масс до m/z 400. Анализ EGA-IAMS проводили с 0,1 мг твердого образца, который нагревали от 25 до 300 °С со скоростью 128 °С/мин. Молекулярные частицы (нейтральные молекулы или радикалы) присоединялись к Li^+ и образовывали соответствующие аддукты $[M + Li]^+$. Масс-спектры IAMS регистрировали непрерывно во время нагревания образца. Обнаружили 6 продуктов разложения пиридоксина (№ 6 – 12 табл. 4.1.3).

4.2.3 Анализ примесей методом ВЭЖХ

Анализ родственных примесей витамина B_6 проводят методами ион-парной и ОФ ВЭЖХ. В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами С4, С8, С18 и др.); подвижная фаза – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности

(неполярности). Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы [28].

Ион-парной хроматографией называется вариант жидкостной хроматографии, при котором в подвижную фазу добавляют реагент, в состав которого входит гидрофобный ион, хорошо адсорбирующийся на поверхности неподвижной фазы – силикагеля с привитыми алкильными группами. В качестве ион-парных реагентов при разделении катионов обычно используют алкилсульфаты или алкилсульфонаты, а при разделении анионов – ионы тетраалкиламмония [29].

В Государственной фармакопее РФ и Европейской фармакопее описана следующая методика анализа. Для идентификации примесей использовали стандартный образец Pyridoxine hydrochloride CRS, содержащий примеси А, В. Примеси А, В соответствуют примесям, описанным в [16]. Примесь А: 6-метил-1,3-дигидрофуро[3,4-с]пиридин-7-ол, CAS 5196-20-3; примесь В: 5-гидроксиметил-2,4-диметилпиридин-3-ол, CAS 61-67-6.

Процесс хроматографирования осуществляли на колонке размером 25 × 0,46 см, заполненной эндкеппированным октадецилсилиловым силикагелем, деактивиронным по отношению к основаниям (С18), 5 мкм. Подвижную фазу готовили следующим образом: точную навеску 2,72 г калия дигидрофосфата растворяли в 900 мл воды, доводили pH раствора до 3,0 ± 0,1 фосфорной кислотой разведенной 10%-ой и доводили объем раствора водой до 1000 мл. Испытуемый раствор: точную навеску 25,0 мг субстанции растворяли в 5,0 мл воды и доводили объем раствора тем же растворителем до 10,0 мл. Раствор сравнения А: 1,0 мл испытуемого раствора доводят водой до 100,0 мл; 1,0 мл полученного раствора доводят смесью растворителей до 10,0 мл. Раствор сравнения Б: точные навески 2,5 мг стандартного образца примеси А и 2,5 мг стандартного образца примеси В растворяют в 5,0 мл воды, доводят тем же растворителем до 10,0 мл; 2,0 мл полученного раствора доводят водой до 10,0 мл. Скорость потока - 1,0 мл/мин, объем пробы - 5 мкл. Детектирование: спектрофотометрический детектор при длине волны 210 нм. Время хроматографирования: 2,5-кратное от времени удерживания основного пика. Относительные времена удерживания соединений: пиридоксин – 1 (около 12 мин), примесь А – около 1,7; примесь В – около 1,9 [16, 17].

В работе [30] описан метод оценки продуктов деструкции пиридоксина гидрохлорида, образующихся под действием различных растворителей методом ОФ ВЭЖХ. Использованы различные типы подвижных фаз при разработке метода для оценки гидрохлорида пиридоксина и продуктов его разложения. Предпочтительными оказалось использование 0,015М дигидрофосфата калия (pH = 3 ± 0,2) и метанола в соотношении

70:30 соответственно, длиной волны детектирования 254 нм и скоростью потока 1,0 мл/мин для 30 мкл введенного образца. Приготовление 0,015М дигидрофосфата калия, pH = 3: точную навеску дигидрофосфата калия 2,055 г помещали в мерную колбу на 1000 мл, разбавляли до метки дистиллированной водой и обрабатывали ультразвуком. Уровень pH раствора доводили до 3 разбавленной ортофосфорной кислотой. Подвижную фазу готовили путем смешивания раствора 0,015М дигидрофосфата калия (pH = 3 ± 0,2) и метанола с соотношением 70:30 соответственно и дегазировали. Процесс хроматографирования пробы объемом 30 мкл осуществляли на колонке C18 (Thermo – hypersil GOLD), 250 × 4.6 мм, 5 мкм при скорости потока 1,0 мл/мин. Детектирование: УФ-детектор при длине волны 254 нм.

Исследования стабильности пиридоксина гидрохлорида [30], проведенные под воздействием кислотного растворителя (0,1М HCl в течение 8 ч), показали, что лекарственное средство полностью разрушилось и обнаружилось в виде одного ухудшенного пика. Препарат также вводили в щелочной растворитель (0,1М NaOH в течение 8 ч), в результате все лекарственное средство разложилось, на хроматограмме получили 2 пика, один из которых связан с обнаруженным в кислотном растворителе. В ходе испытаний сделан вывод, что препарат более стабилен в нейтральном растворителе.

В ходе исследований [31] определены и разделены производные витамина B_6 с удовлетворительной чувствительностью и точностью. Хроматографическая система состояла из модели Tosho HLC-803, оснащенной универсальным жидкостным инжектором модели U6K с петлей объемом 200 мкл (Waters Assoc., Milford, Conn., USA), используемым в сочетании с флуоресцентным спектрофотометром Hitachi Model F-1000 с 12 мкл проточной ячейкой и ксеноновой лампой мощностью 150 Вт. Хроматографирование проводили на колонке с обращенной фазой TSK-гель ODS-120A (250 × 4,6 мм). Флуоресцентный спектрофотометр устанавливали на длине волны излучения 390 нм с длиной волны возбуждения 305 нм. Разделение проводили при 30 °C, используя изократический растворитель (растворитель A), состоящий из 1% ацетонитрила, 0,1М перхлората натрия и 0,1М калий-фосфатного буфера (pH = 3,5). Скорость потока для разделения составляла 0,5 мл/мин. Чтобы смыть медленно движущиеся соединения, систему промывали растворителем A в течение 40 мин при скорости потока 1 мл/мин после каждого определения. Растворителем B, состоящим из 10% ацетонитрила, 0,1М перхлората натрия и 0,1М калий-фосфатного буфера (pH = 3,5), иногда промывали в течение 20 мин.

В работе [32] представлен метод разделения родственных соединений витамина B_6. Для анализа использовали насос LKB HPLC (модель 2150), оснащенный инертным инжектором (модель 2154-002 LKB) и самодельной петлей. Аналитическую колонку LKB размером 4,6 × 250 мм, размер частиц 5 мкм с обращенной фазой (TSK ODS-120T), использовали вместе с защитной колонкой 3 см, содержащей аналогичный силикагель (либо LKB Spherisorb Guard, либо Lichrosorb RP18). Элюент представлял собой: 75мМ NaH_2PO_4-буфер, содержащий 75 ммоль $NaClO_4$, 8,5 мл ацетонитрила и 0,5 мл триэтаноламина на литр, доведенный до pH = 3,38 концентрированной HClO. Скорость потока составляла 1,2 мл/мин при постоянном давлении около 12000 кПа. Постколоночный реагент состоял из буфера Na_2HPO_4 (250мМ, pH = 11,7), содержащего 1 г метабисульфита натрия на литр. Скорость потока постколоночного реагента поддерживали на уровне 6 мл/ч. Выбросы колонок контролировали с помощью атомного спектрофлуориметра Baird (Fluoricord RC200; Baird & Tatlock Ltd., Romford, Essex RM1 1HA, U.K.) или более чувствительного флуориметра модели L5-20, оснащенного капиллярной проточной кюветой на 50 мкл. Длины волн возбуждения и испускания устанавливали на 325 и 400 нм соответственно. Хотя можно ввести до 200 мкл образца без значительного расширения пика, обнаружили, что поддержание объема впрыска при 100 мкл сводит к минимуму исходные сносы и загрязнение колонки. При указанных выше условиях хроматографии полный профиль компонентов, содержащих витамин B_6, может быть получен за 25 мин.

Для разделения родственных соединений пиридоксина в работе [33] использовали программу двоичного градиента. Линейный градиент изменяли от 100% подвижной фазы А до 100% подвижной фазы В через 10 мин после инъекции, оставляли при 100% В в течение 15 мин, затем возвращали к 100% А. Скорость потока составляла 1,2 мл/мин. Подвижную фазу А готовили следующим образом: буферный раствор 0,033М фосфорной кислоты и 0,008М 1-октансульфоновой кислоты доводили до pH = 2,2 с помощью 6Н КОН. Подвижная фаза В: буферный раствор 0,033М фосфорной кислоты и 10% ацетонитрила доводили до pH = 2,2 с помощью 6Н КОН. Постколоночный реагент: 1,0 мг/мл бисульфита натрия в 1,0М калий-фосфатном буфере доводили до pH = 7,5 с помощью 6Н КОН. Подвижные фазы готовили свежими ежедневно. Буферизованные растворы фильтровали, используя полностью стеклянный микрофильтр, оснащенный 0,2 мкм мембранами из нейлона-66 (Chrom Tech). Постколоночный реагент использовали для усиления флуоресценции и перекачивали в элюат со скоростью 0,2 мл/мин.

Определение и разделение производных витамина B_6 в работе [34] проводили методом ОФ ВЭЖХ. Аппаратура: HPLC Hitachi Model 655, оснащенный УФ-монитором Hitachi Model 638 с переменной длиной волны, или флуоресцентный спектрофотометр Hitachi Model F-I000, соединенный с процессором данных Hitachi Model 833. Анализы проводились при комнатной температуре на колонке (250 × 4,6 мм), заполненной гелем TSK ODS-120A (размер частиц 5 мкм). Использовалась изократическая система растворителей. Растворитель готовили путем смешивания CH_3CN (0,4%), 0,1М $NaClO_4$ и 0,1М калий-фосфатного буфера (pH = 3,0 – 4,0), за 1 ч до использования их дегазировали. Скорость потока для разделения составляла 0,5 мл/мин. Длину волны УФ-детектора устанавливали на 290 нм, длину волны флуоресцентного детектора на 305 нм для возбуждения и на 390 нм для излучения. Времена удерживания производных пиридоксина несколько изменялись в зависимости от температуры окружающей среды и были чувствительны к концентрации CH_3CN: сокращались с увеличением его концентрации. Напротив, к pH раствора время удерживания было практически нечувствительным.

В исследовании [35] достигнуто разделение PN и его родственного соединения PL методом ОФ ВЭЖХ с ион-парными реагентами в присутствии других витаминов группы В, а именно: тиамина (B_1), никотиновой кислоты (B_3), рибофлавина (B_2). Использовали короткую колонку (С18, 150 × 3,9 мм; размер частиц 3 мкм, содержание углерода 15%) и добавляли ион-парный реагент (5мМ натриевой соли октансульфоновой кислоты) в подвижную фазу (метанол: вода (30:70) и 0,1% триэтиламин). Детектирование: УФ-детектор, длина волны 254 нм. Полного разделения достигли за 20 мин. Время удерживания для каждого компонента составило: 2,34 мин (B_3), 3,46 мин (PL), 4,12 мин (PN), 7,51 мин (B_1) и 13,59 мин (B_2).

Для определения количества нанограмм всех семи распространенных метаболитов витамина B_6 в различных биологических образцах в работе [36] представлена процедура катионного обмена. Используют градиентное элюирование на одной колонке для разделения семи соединений в течение 40-60 мин, в зависимости от сложности образца. Добавление в колонку буфера и бисульфит-иона позволило проводить чувствительное флуорометрическое обнаружение всех соединений на одной и той же длине волны.

4.3 Препаративная ВЭЖХ

Высокая эффективность хроматографии как метода разделения сложных смесей вызвала стремление использовать ее не только для анализа, но и для выделения чистых веществ из смеси в препаративных целях. Препаративная хроматография позволяет получать в чистом виде вещества из природных смесей или производственных продуктов.

В настоящее время препаративная хроматография превратилась в самостоятельный метод разделения смесей веществ. Она применяется для решения следующих задач:

1) получение вещества в достаточных для идентификации количествах;

2) получение веществ высокой степени чистоты, стандартные соединения;

3) выделение целевого продукта из реакционной массы при синтезе;

4) очистка основного вещества от примесей;

5) выделение примесей.

Основными достоинствами препаративной хроматографии как метода разделения смесей являются универсальность, высокие селективность и эффективность разделения, возможность полной автоматизации разделительного процесса.

Недостатками метода являются малая производительность и низкая степень использования объема хроматографической колонки.

5 Практическая часть

5.1 Ион-парная ВЭЖХ

Ион-парной хроматографией называется вариант жидкостной хроматографии, при котором в подвижную фазу добавляют реагент, в состав которого входит гидрофобный ион, хорошо адсорбирующийся на поверхности неподвижной фазы – силикагеля с привитыми алкильными группами. В качестве ион-парных реагентов при разделении катионов обычно используют алкилсульфаты или алкилсульфонаты, а при разделении анионов – ионы тетраалкиламмония [29].

Изначально для хроматографического разделения примесей пиридоксина в Препарате I использовали ион-парную ВЭЖХ. Этот метод должен был подойти, так как пиридоксин и его родственные соединения являются полярными веществами.

Хроматографические условия:

Для анализа использовали жидкостной хроматограф Ultimate 3000, колонку Perfectsil Target ODS-3 HD 250 × 4.6 мм, 5 мкм с защитной предколонкой. Подвижная фаза состояла из буферного раствора и метилового спирта в отношении 13:7.

Буферный раствор готовили следующим образом: 0,09% гептансульфоната моногидрат (ион-парный реагент) растворяли в 10 мл воды, доводили до pH = 2,3 ледяной уксусной кислотой и доводили объем раствора водой до 100 мл.

Подготовка образца: таблетки Препарата I отмывали от оболочки, измельчали в порошок. Навеску 1 г помещали в мерную колбу на 10 мл, доводили до метки водой. Полученную смесь обрабатывали ультразвуком, затем центрифугировали и пропускали через фильтр 0,45 мкм.

В результате получили плохое разделение, наложение пиков основного вещества и Примеси 3 на хроматограмме (рис. 5.1.1).

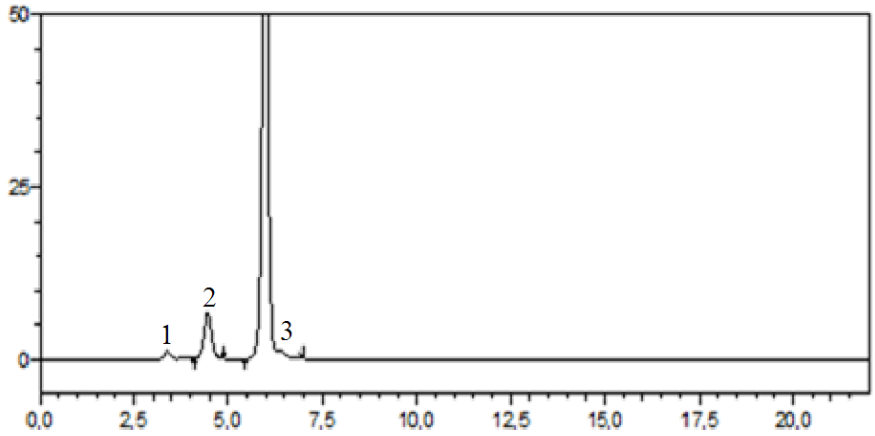


Рисунок 5.1.1 – Хроматограмма Препарата I полученная в соответствии с условиями п. 5.1

Таблица 5.1.1 – Относительные времена удерживания компонентов

Время удерживания	Соединение	Обозначение на хроматограмме
3,4	Примесь А	1
4,4	Примесь Б	2
6	Пиридоксин	-
6,3	Неизвестная примесь	3

При тех же условиях с ион-парным реагентом получены хроматограммы стандартных образцов родственных соединений пиридоксина: пиридоксаля (рис. 5.1.2), пиридоксамина (рис. 5.1.3) и пиридоксиновой кислоты (рис. 5.1.4).

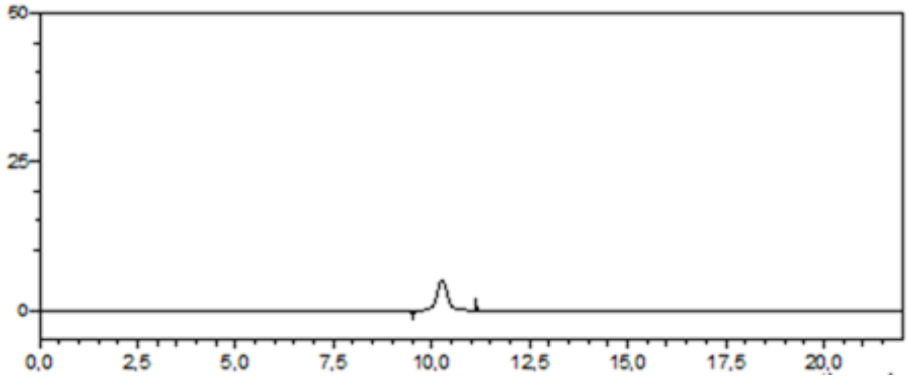


Рисунок 5.1.2 – Хроматограмма стандартного образца пиридоксаля полученная в соответствии с условиями п. 5.1

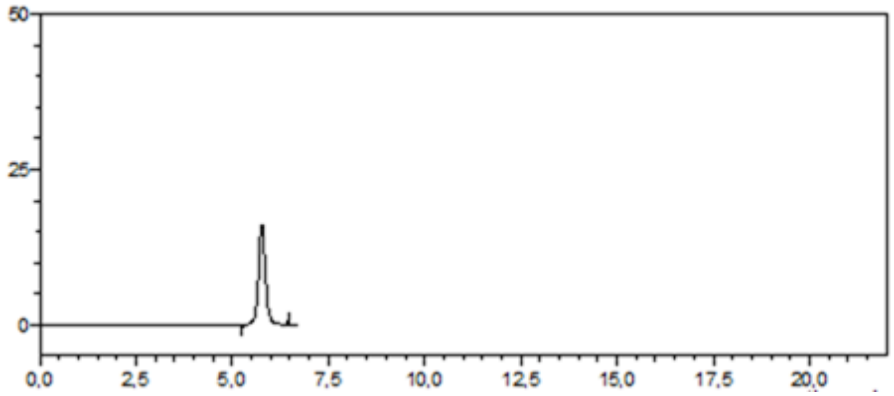


Рисунок 5.1.3 – Хроматограмма стандартного образца пиридоксамина полученная в соответствии с условиями п. 5.1

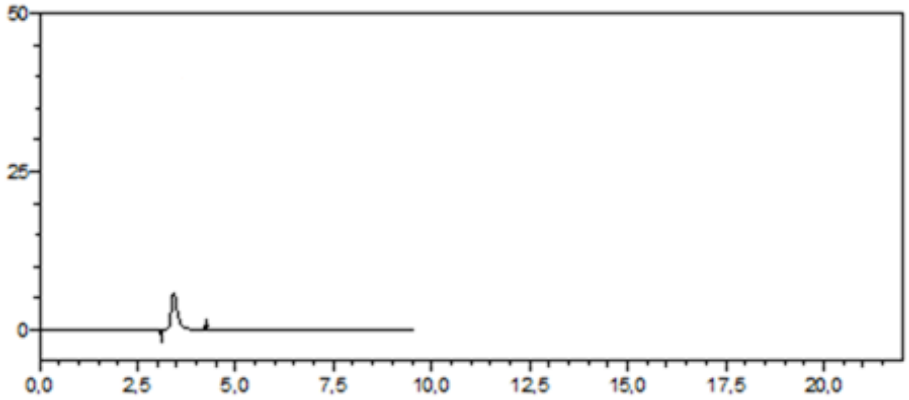


Рисунок 5.1.4 – Хроматограмма стандартного образца пиридоксиновой кислоты полученная в соответствии с условиями п. 5.1

Примесь 3 не является пиридоксалем, пиридоксиновой кислотой или пиридоксамином и требует дальнейшего исследования физико-химическими методами, в частности, спектральными.

В ходе проведенного исследования установлены основные недостатки метода ион-парной ВЭЖХ:

1) сильная зависимость от внешних факторов (pH, температура и т. д.);

2) образование «хвостов» (за счет диссоциация ионных пар, неправ ильной концентрации буфера и т. п.);

3) плохая совместимость с градиентным элюированием;

4) появление «лишних», системных пиков на хроматограмме;

5) необходимость выделения отдельной колонки для анализа;

6) сложно отмыть систему хроматографа от ион-парного реагента.

В связи с вышеперечисленным принято решение перейти на ОФ ВЭЖХ

5.2 Разработка условий разделения методом ОФ ВЭЖХ

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами С4, С8, С18 и др.); подвижная фаза – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность по-движной фазы [28].

Подготовка образца см. п. 5.1.

В качестве подвижной фазы использовали буферный раствор 20мМ NH_3, 35мМ HCOOH; pH = 4. Приготовление буферного раствора: 1,5 мл р-ра аммиака и 1,57 мл р-ра муравьиной кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 1 л, доводили до метки водой. Хроматограф Ultimate 3000, колонка Zorbax Extend C18 100 × 4.6 мм, 3,5 мкм, скорость потока 1 мл/мин.

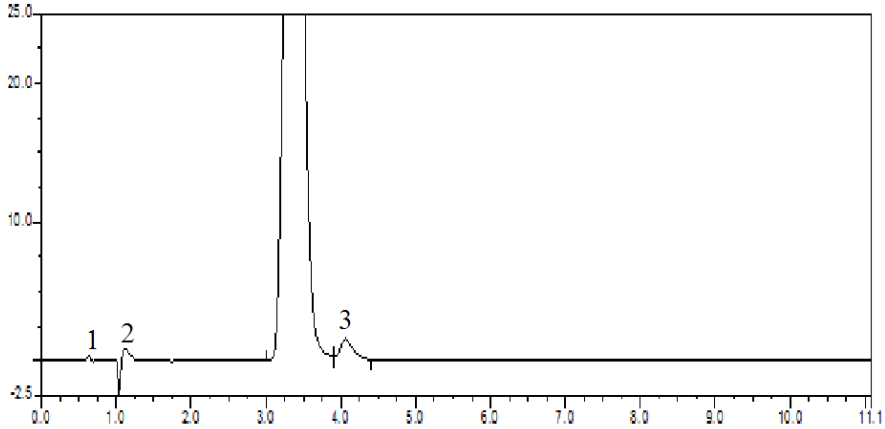


Рисунок 5.2.1 – Хроматограмма Препарата I полученная в соответствии с разработанными условиями

Таблица 5.1.2 – Относительные времена удерживания компонентов

Время удерживания	Соединение	Обозначение на хроматограмме
0,6	Примесь А	1
1,2	Примесь Б	2
3,4	Пиридоксин	-
4,1	Неизвестная примесь	3

Разработанная хроматографическая система позволила добиться полного разделение пиков примесей и основного компонента.

5.3 Выделение примесей методом препаративной ВЭЖХ

Разработанные условия хроматографирования п.5.2 позволили выделять компоненты Препарата I препаративно.

Выделение и накопление Примеси 3 для последующего ЯМР-анализа производили с помощью полупрепаративного жидкостного хроматографа на базе Shimadzu LC-20.

Если аналитическая и препаративная колонки имеют разные химические составы, становится очень трудно предсказать препаративное разделение на основе результатов анализов. Подобрали колонку схожего состава и произвели пересчет условий разделения из п. 5.2 на препаративную колонку [37].

Для колонок с одинаковым размером частиц используется следующее уравнение для пересчета скорости потока:

$$F_{преп} = F_{аналитич} \times \frac{D^2_{преп}}{D^2_{аналитич}},$$

где F – скорость потока (мл/мин), D – внутренний диаметр колонки (мм).

Использование в качестве ПФ смесь растворов аммиака и муравьиной кислоты обусловлено их летучестью, что позволяет при необходимости упарить фракцию, содержащую необходимый компонент.

5.4 Анализ выделенной примеси методом ЯМР-спектроскопии

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – метод, основанный на поглощении радиочастотного электромагнитного излучения ядрами образца с ненулевым магнитным моментом, помещенного в постоянное магнитное поле. Ненулевые магнитные моменты имеют изотопы ядер элементов с нечетной атомной массой (^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{31}P и др.).

Импульсный спектрометр ЯМР (ЯМР-спектрометр) с высокой разрешающей способностью состоит из:

– магнита для создания постоянного магнитного поля B_0;

– термостатируемого датчика с держателем образца для подачи радиочастотного импульса и определения излучения, испускаемого образцом;

– электронного устройства для создания радиочастотного импульса, регистрации, усиления и преобразования сигнала спада свободной индукции в цифровую форму;

– устройства для настройки и регулировки электронных контуров;

– устройства сбора и обработки данных (компьютер);

и также может также включать:

– проточную кювету для проведения жидкостной хроматографии ядерного магнитного резонанса или проточно-инъекционного анализа;

– систему для создания импульсного градиента магнитного поля.

Для идентификации выделенной Примеси 3 в данной работе использовали ЯМР-спектрометр Bruker AVANCE III HD (400 МГц). Получены спектры Примеси 3 пиридоксина в комбинированном Препарате I на ядрах ^{1}H в двух разных растворителях: ДМСО (рис. 5.4.1) и дейтерированной воде (рис. 5.4.2).

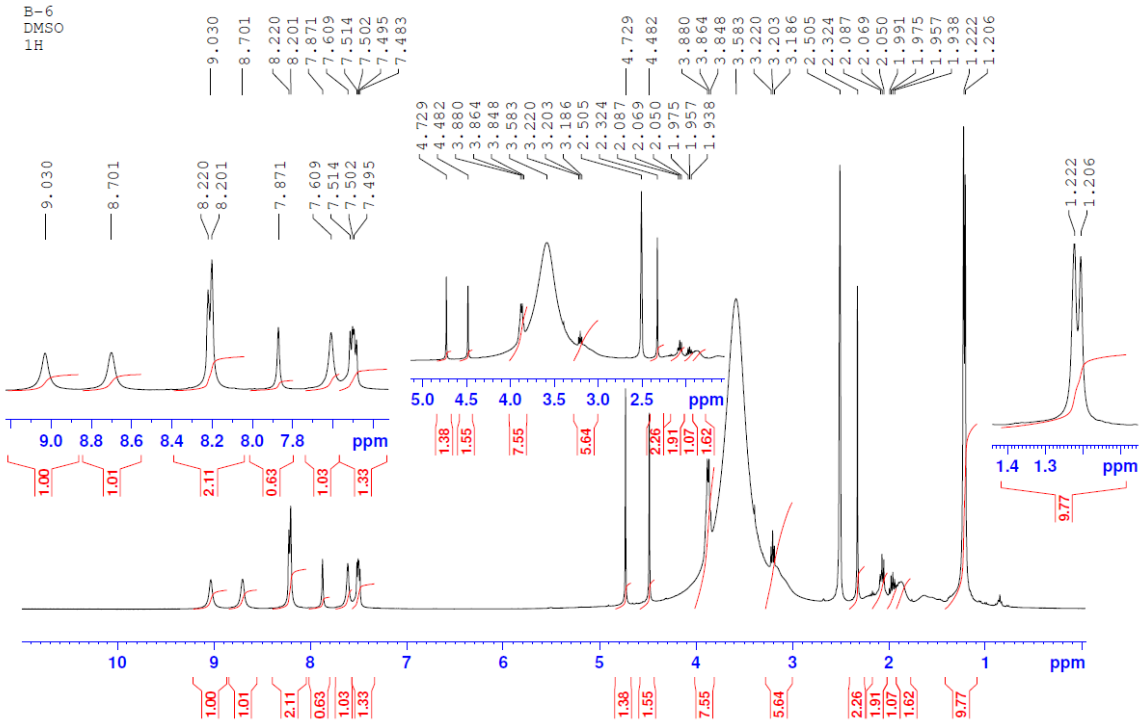


Рисунок 5.4.1 – ^{1}H-ЯМР-спектр Примеси 3 пиридоксина в Препарате I, растворитель ДМСО

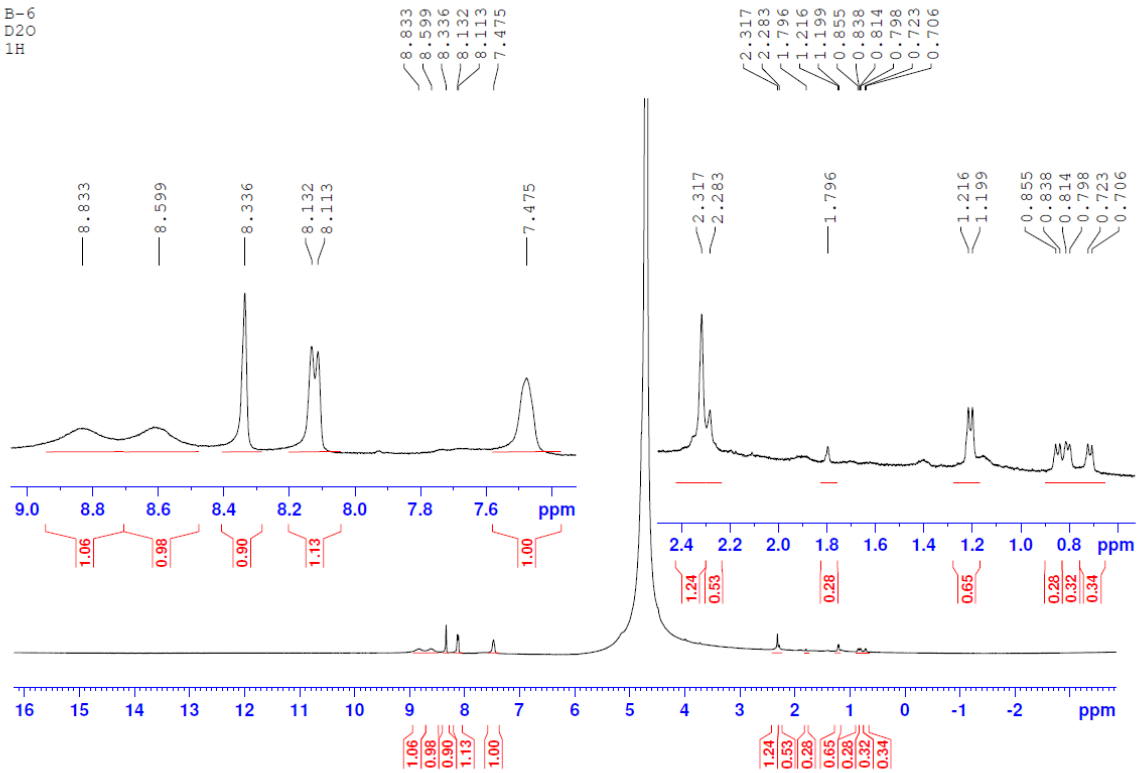


Рисунок 5.4.1 – ^{1}H-ЯМР-спектр Примеси 3 пиридоксина в Препарате I, растворитель дейтерированная вода

По полученным ПМР-спектрам предположена следующая структура примеси пиридоксина – Рис. 5.5.3. Название по номенклатуре ИЮПАК: 3-гидрокси-2-метилпиридин-4,5-дикарбальдегид.

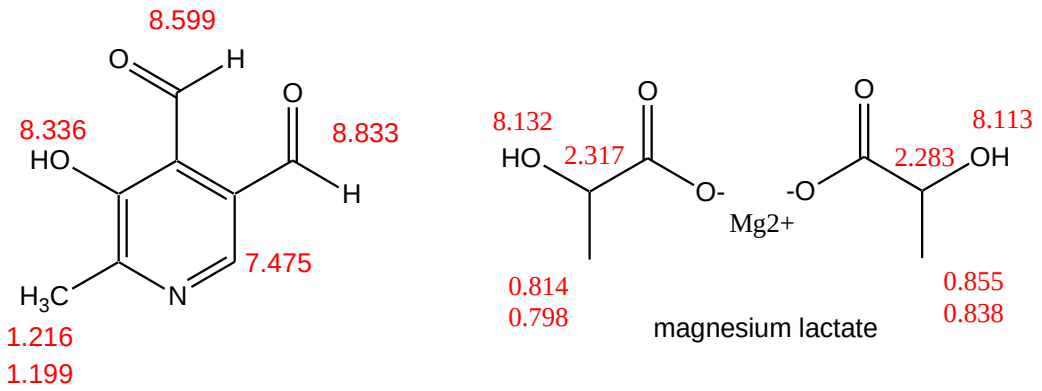


Рисунок 5.5.3 – Химические сдвиги, соответствующие фрагментам молекулы Примеси 3

Примесь 3 не является пиридоксалем, пиридоксиновой кислотой или пиридоксамином и требует дальнейшего исследования физико-химическими методами, в частности, спектральными.

6 Заключение

Проведен литературный обзор существующих методик анализа пиридоксина по показателю «Примеси». Воспроизведена методика анализа Препарата I методом ион-парной ВЭЖХ. Показано что методика не позволяет добиться полного разделения пиридоксина и его примесей. Разработаны новые условия разделения методом ОФ ВЭЖХ, позволяющие перейти на препаративную хроматографию.

В ходе анализа в исследуемом препарате была обнаружена примесь, не описанная в фармакопейных статьях. Данная примесь выделена препаративно и исследована методом ЯМР-спектроскопии. По ПМР-спектрам предположена структура выделенной примеси: примесь не является пиридоксалем, пиридоксиновой кислотой или пиридоксамином и требует дальнейшего исследования различными методами.

При анализе препарата согласно разработанным хроматографическим условиям удалось добиться большей эффективности, увеличить разрешение, а также сократить время проведения анализа.

7 Список источников

[1] Бурбелло А. Т., Шабров А. В., Денисенко П. П. Современные лекарственные средства: Клинико-фармакологический справочник практического врача 2-е изд. – СПб.: Издательский Дом «Нева»; М.: Издательство «ОЛМА-ПРЕСС Звездный мир», 2003. – 864 с.

[2] Pyridoxine [Электронный ресурс] // https://en.wikipedia.org/wiki/Pyridoxine

[3] Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента [Электронный ресурс] // https://www.rlsnet.ru/

[4] Витамин B_6 [Электронный ресурс] // http://vitaport.ru/encyclopedia/vitamins/Vitamin_V6/

[5] ОФС.1.1.0006.15 Фармацевтические субстанции [Электронный ресурс] // https://pharmacopoeia.ru/gosudarstvennaya-farmakopeya-xiii-online-gf-13-online/ofs-1-1-0006-15-farmatsevticheskie-substantsii/

[6] Правила производства и контроля качества лекарственных средств ГОСТ Р 52249-2009, Москва, «Стандартинформ», 2010. – 132 с.

[7] Hochberg M., Melnick D., Oser B. L. On the stability of pyridoxine, J. Biol. Chem. 1944, 155: 129-136.

[8] Thermal decomposition of pyridoxine: an evolved gas analysis-ion attachment mass spectrometry studyю Márta Juhász, Seiji Takahashi, Yuki Kitahara, Toshihiro Fujii. Article in Rapid Communications in Mass Spectrometry, April 2012.

[9] Degradation of vitamin B6 standard solutions. G.S. Shephard, D. Labadarios Clinrcu Chimica Acta, 160 (1986) 307-312.

[10] The enzymatic oxidation of pyridoxine and pyridoxamine phosphates. Wada H, SneII EE, J Biol Chem 1961; 236: 2089-2095.

[11] Estimation of vitamin B_6 compounds in human blood and urine. Contractor SF, Shane B. Clin Chim Acta 1968; 21: 71-77.

[12] Fluorescence studies on some hydroxypyridines including compounds of the vitamin Be, group. Bridges JW, Davies DS, Williams RT. Biochem J 1966; 98: 451-468.

[13] PyridoxaI catalysis of non-enzymatic transamination in ethanol solution. Matsuo Y. J Amer Chem Sot 1957; 79: 2016-2019.

[14] The vitamin B_6 group. V. The reversible interconversion of pyridoxal and pyridoxamine by transamination reactions. Snell EE. J Amer Chem Sot 1945; 67: 194-197.

[15] Metal ion independent non-enzymic transamination between pyridoxal and amino acid ester. Cennamo C. Biochim Biophys Acta 1964: 93: 323-332.

[16] J. Roy et al., Drug Dev. Ind. Pharm.20 (13), 2157–2163 (1994).

[17] Государственная фармакопея РФ XIV издание Том III. - М.: Научный центр экспертизы средств медицинского назначения, 2018 - 704 с.

[18] European Pharmacopoeia 8.0 Pyridoxine hydrochloride 01/2010:0245.

[19] Pyridoxine [Электронный ресурс] // https://www.pharmaffiliates.com/en/search?s=Pyridoxine&submit=

[20] Pyridoxine Impurity 8 [Электронный ресурс] // https://www.clearsynth.com/en/CSO15890.html

[21] U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information PubChem [Электронный ресурс] // https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

[22] Pyridoxine [Электронный ресурс] // http://www.standardpharm.com/portal/search/index.html?keyword=Pyridoxine&submit=

[23] S. Ahuja and M.Dong, Eds., Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC: Volume 6 Academic Press, 2005.

[24] Evaluating Impurities in Drugs (Part III of III). By Pharmaceutical Technology Editors Pharmaceutical Technology Volume 36, Issue 4, 2012.

[25] ОФС.1.2.1.2.0003.15 Тонкослойная хроматография [Электронный ресурс] // https:// pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-2-0003-15-tonkoslojnaya-hromatografiya/

[26] Pyridoxine Chemistry XXI. Thin-layer Chromatogrqhy and Thin-layer Electrophoresis of Compounds in the Vitamin B_6 Group. H. Ahrens, W. Korytnyk. ANALYTICAL BIOCHEMIBTRY 30, 413-420, 1969.

[27] ОФС.1.2.1.1.0008.15 Масс-спектрометрия [Электронный ресурс] // https:// https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-1-0008-15-mass-spektrometriya//

[28] Жерносек А.К., Талуть И.Е. Аналитическая химия для будущих провизоров. Часть 1. Учебное пособие / А.К. Жерносек, И.Е. Талуть; Под ред. А.И. Жебентяева. – Витебск, ВГМУ, 2003. – 362 с.

[29] ОФС.1.2.1.2.0005.15 Высокоэффективная жидкостная хроматография [Электронный ресурс] // https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-2-0005-15-vysokoeffektivnaya-zhidkostnaya-hromatografiya/

[30] Development and validation of a RP-HPLC method for simultaneous estimation of pyridoxine hydrochloride (Vitamin B_6) and its degraded products formed under effect of different solvents. Elsadig H. Kh. Adam, Ramadan I. Al-Shdefat, 2015.

[31] Determination of Vitamin B_6 Derivatives in Foods and Biological Materials by Reversed-Phase HPLC. Toshikatsu Toukairin-oda, Eiko Sakamoto, Naoyuki Hirose, Mitsuaki Mori, Takeshi Itoh, Haruhito Tsuge, J. Nutr. Sci. Vitaminol., 35, 171-180, 1989.

[32] A Simple Liquid-Chromatographic Method for Measuring Vitamin B_6 Compounds in Plasma. Paul Edwards, Peter K. S. Liu, G. Alan Rose, Clin. Chem. 35/2, 241-245, 1989.

[33] Analysis of Free and Glycosylated Vitamin B_6 in Wheat by High-Performance Liquid Chromatography. Sampson D. A., Eoff L. A., Yan X. L., Lorenz K.. Cereal Chem. 72(2): 217-221, 1994.

[34] Separation and Determination of Vitamin B6 Derivatives by Reversed-phase HPLC. Haruhito Tsuge, Toshikatsu Oda, Hideo Miyata. Agricultural and Biological Chemistry, 50:1, 195-197, 1986.

[35] Sensitivity of UV detection in simultaneous separation and detection of B-vitamins using HPLC. Osman Hassan, Mok Jee Chee. Malaysian Journal of Analytical Sciences, Vol. 7, No. 1 251-255, 2001.

[36] A Versatile Cation-Exchange Procedure for Measuring the Seven Major Forms of Vitamin B6 in Biological Samples Stephen. P., J. Dennis Mahuren. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 129, 310 – 317, 1983.

[37] Analytical HPLC to Preparative HPLC: Scale-Up Techniques using a Natural Product Extract. Andrew Aubin, Ronan Cleary. Waters Corporation June 2009 720003120EN.

[38] Thermal Degradation Kinetics of Pyridoxine Hydrochloride in Dehydrated Model Food Systems S. R. Evans, J. F. Gregory Ill, and J. R. Kirk Volume 46 JOURNAL OF FOOD SCIENCE-563, 1981.

7 Приложения

Приложение А

Таблица А.1 – Пределы контроля, идентификации и квалификации родственных примесей для фармацевтических субстанций

Максимальная суточная доза	Контролируемый предел*	Предел идентификации**	Предел квалификации***
< 2г/сут	0,05 %	1,0 мг/сут.	0,15 % или 1,0 мг/сут.
> 2г/сут	0,03 %	0,05 %	0,05 %

* – предел, выше которого примесь должна контролироваться;
** – предел, выше которого примесь должна быть идентифицирована;
*** – предел, выше которого должна быть установлена биологическая безопасность примеси.

Поиск заимствований в научных текстах[β]

Введите текст:

...или загрузите файл:

Файл не выбран... **Выбрать файл...**

Укажите год публикации: **2020**

Выберите коллекции

- **Все**
- **Рефераты**
- **Авторефераты**
- **Иностранные конференции**
- **PubMed**
- **Википедия**
- **Российские конференции**
- **Иностранные журналы**
- **Российские журналы**
- **Энциклопедии**
- **Англоязычная википедия**

Анализировать

Проверить по расширенному списку коллекций системы Руконтекст (http://text.rucont.ru/like)

Год публикации: 2020.

Оценка оригинальности документа - 96.61%

Процент условно корректных заимствований - 0.0%

Процент некорректных заимствований - 3.39%

Время выполнения: 19 с.

Документы из базы

Источники заимствования	В списке литературы	Источники Заимствования
1. Применение методики ВЭЖХ для анализа бензалкония хлорида в глазных каплях с рабочим названием «АкваВит» (http://cyberleninka.ru/article/n/primenenie-metodiki-vezhh-dlya-analiza-benzalkoniya-hlorida-v-glaznyh-kaplyah-s-rabochim-nazvaniem-akvavit) Авторы: Жилякова Е. Т., Зинченко А. А., Придачина Д. В.. Год публикации: 2013. Тип публикации: статья научного журнала. http://cyberleninka.ru/article/n/primenenie-metodiki-vezhh-dlya-analiza-benzalkoniya-hlorida-v-glaznyh-kaplyah-s-rabochim-nazvaniem-akvavit (http://cyberleninka.ru/article/n/primenenie-metodiki-vezhh-dlya-analiza-benzalkoniya-hlorida-v-glaznyh-kaplyah-s-rabochim-nazvaniem-akvavit) Показать заимствования (5)	–	1.68%

2. Контроль сопутствующих примесей в субстанции кокарбоксилаза гидрохлорид методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (http://cyberleninka.ru/article/n/kontrol-soputstvuyuschih-primesey-v-substantsii-kokarboksilaza-gidrohlorid-metodom-vysokoeffektivnoy-zhidkostnoy-hromatografii)

Авторы: Зинченко А. А..
Год публикации: 2013. Тип публикации: статья научного журнала.
http://cyberleninka.ru/article/n/kontrol-soputstvuyuschih-primesey-v-substantsii-kokarboksilaza-gidrohlorid-metodom-vysokoeffektivnoy-zhidkostnoy-hromatografii (http://cyberleninka.ru/article/n/kontrol-soputstvuyuschih-primesey-v-substantsii-kokarboksilaza-gidrohlorid-metodom-vysokoeffektivnoy-zhidkostnoy-hromatografii)
Показать заимствования (4)

1.32%

3. Количественное определение цианокобаламина в глазных каплях методом ТСХ (http://cyberleninka.ru/article/n/kolichestvennoe-opredelenie-tsianokobalamina-v-glaznyh-kaplyah-metodom-tsh)

Авторы: ЗИНЧЕНКО А.А., ЖИЛЯКОВА Е.Т., АНДРЮЩЕНКО Т.Л..
Год публикации: 2015. Тип публикации: статья научного журнала.
http://cyberleninka.ru/article/n/kolichestvennoe-opredelenie-tsianokobalamina-v-glaznyh-kaplyah-metodom-tsh (http://cyberleninka.ru/article/n/kolichestvennoe-opredelenie-tsianokobalamina-v-glaznyh-kaplyah-metodom-tsh)
Показать заимствования (4)

1.32%

4. Разработка комплекса физико-химических методик, обеспечивающих создание и контроль качества оригинальных отечественных препаратов, производных 1,2,4-триазола (http://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-kompleksa-fiziko-himicheskih-metodik-obespechivayuschih-sozdanie-i-kontrol-kachestva-originalnyh-otechestvennyh)

Авторы: Георгиевский Г. В..
Год публикации: 2011. Тип публикации: статья научного журнала.
http://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-kompleksa-fiziko-himicheskih-metodik-obespechivayuschih-sozdanie-i-kontrol-kachestva-originalnyh-otechestvennyh (http://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-kompleksa-fiziko-himicheskih-metodik-obespechivayuschih-sozdanie-i-kontrol-kachestva-originalnyh-otechestvennyh)
Показать заимствования (4)

1.18%

5. Изучение растворимости ацикловира в модельных смесях с солюбилизатором бета-циклодекстрином (http://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-rastvorimosti-atsiklovira-v-modelnyh-smesyah-s-solyubilizatorom-beta-tsiklodekstrinom)

Авторы: Жилякова Е. Т., Новиков О. О., Новикова М. Ю., Баскакова А. В..
Год публикации: 2014. Тип публикации: статья научного журнала.
http://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-rastvorimosti-atsiklovira-v-modelnyh-smesyah-s-solyubilizatorom-beta-tsiklodekstrinom (http://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-rastvorimosti-atsiklovira-v-modelnyh-smesyah-s-solyubilizatorom-beta-tsiklodekstrinom)
Показать заимствования (4)

1.17%

6. Разработка комплексного подхода к обнаружению фальсифицированных лекарственных средств группы цефалоспоринов (http://dlib.rsl.ru/loader/view/01004846221?get=pdf)

Авторы: Лебедева, Наталья Николаевна.
Год публикации: 2011. Тип публикации: автореферат диссертации.
http://dlib.rsl.ru/loader/view/01004846221?get=pdf (http://dlib.rsl.ru/loader/view/01004846221?get=pdf)
Показать заимствования (5)

1.16%

7. Разработка методов контроля качества лоратадина (http://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-metodov-kontrolya-kachestva-loratadina)

Авторы: Новиков О. О., Жилякова Е. Т., Сабельникова Н. Н..
Год публикации: 2010. Тип публикации: статья научного журнала.
http://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-metodov-kontrolya-kachestva-loratadina (http://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-metodov-kontrolya-kachestva-loratadina)
Показать заимствования (4)

1.13%

8. Изучение стабильности капсулированных лекарственных форм циклоспорина а (http://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-stabilnosti-kapsulirovannyh-lekarstvennyh-form-tsiklosporina-a)

Авторы: Арзамасцев А. П., Садчикова Н. П., Нечаева Е. Б..
Год публикации: 2006. Тип публикации: статья научного журнала.
http://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-stabilnosti-kapsulirovannyh-lekarstvennyh-form-tsiklosporina-a (http://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-stabilnosti-kapsulirovannyh-lekarstvennyh-form-tsiklosporina-a)
Показать заимствования (3)

0.99%

9. Использование хроматографических методов в анализе лоратадина (http://cyberleninka.ru/article/n/ispolzovanie-hromatograficheskih-metodov-v-analize-loratadina)

Авторы: Новиков О. О., Жилякова Е. Т., Сабельникова Н. Н..
Год публикации: 2011. Тип публикации: статья научного журнала.
http://cyberleninka.ru/article/n/ispolzovanie-hromatograficheskih-metodov-v-analize-loratadina (http://cyberleninka.ru/article/n/ispolzovanie-hromatograficheskih-metodov-v-analize-loratadina)
Показать заимствования (3)

0.94%

10. Валидация методики количественного определения схизандрина в извлечениях лимонника китайского (http://cyberleninka.ru/article/n/validatsiya-metodiki-kolichestvennogo-opredeleniya-shizandrina-v-izvlecheniyah-limonnika-kitayskogo)

Авторы: Ёршик В. М., Фадеев В. И., Петухова А. Д..
Год публикации: 2014. Тип публикации: статья научного журнала.
http://cyberleninka.ru/article/n/validatsiya-metodiki-kolichestvennogo-opredeleniya-shizandrina-v-izvlecheniyah-limonnika-kitayskogo (http://cyberleninka.ru/article/n/validatsiya-metodiki-kolichestvennogo-opredeleniya-shizandrina-v-izvlecheniyah-limonnika-kitayskogo)
Показать заимствования (3)

0.8%

11. Результаты сравнительных исследований варианта внутреннего стандарта maldi/tof/ms с другими методами количественного анализа резвератрола (http://cyberleninka.ru/article/n/rezultaty-sravnitelnyh-issledovaniy-varianta-vnutrennego-standarta-maldi-tof-ms-s-drugimi-metodami-kolichestvennogo-analiza)

Авторы: Писарев Д. И., Новиков О. О., Васильев Г. В..
Год публикации: 2012. Тип публикации: статья научного журнала.
http://cyberleninka.ru/article/n/rezultaty-sravnitelnyh-issledovaniy-varianta-vnutrennego-standarta-maldi-tof-ms-s-drugimi-metodami-kolichestvennogo-analiza (http://cyberleninka.ru/article/n/rezultaty-sravnitelnyh-issledovaniy-varianta-vnutrennego-standarta-maldi-tof-ms-s-drugimi-metodami-kolichestvennogo-analiza)
Показать заимствования (3)

0.8%

12. Разработка методики количественного определения рибавирина в субстанции и мази (http://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-metodiki-kolichestvennogo-opredeleniya-ribavirina-v-substantsii-i-mazi)

Авторы: Марченко С. И., Трухачева Т. В., Петров П. Т., Жебентяев А. И..
Год публикации: 2005. Тип публикации: статья научного журнала.
http://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-metodiki-kolichestvennogo-opredeleniya-ribavirina-v-substantsii-i-mazi (http://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-metodiki-kolichestvennogo-opredeleniya-ribavirina-v-substantsii-i-mazi)
Показать заимствования (3)

0.66%

13. Разработка технологии и методов контроля таблеток пролонгированного действия (на примере таблеток дифетура 0,05 г) (http://dlib.rsl.ru/loader/view/01000272186?get=pdf)

Авторы: Денисов, Антон Александрович.
Год публикации: 2002. Тип публикации: автореферат диссертации.
http://dlib.rsl.ru/loader/view/01000272186?get=pdf (http://dlib.rsl.ru/loader/view/01000272186?get=pdf)
Показать заимствования (3)

0.64%

Дополнительно

Общеизвестные фрагменты

Значимые оригинальные фрагменты

Библиографические ссылки

Искать в Интернете

© 2015 2020 Институт системного анализа Российской академии наук (http://www.isa.ru/index.php?lang=ru)