

4. Gulyaev D. K., Belonogova V. D., Bokov D. O., Bessonov V. V. The composition and antioxidative activity of spruce roots' extract. Khimiya rastitel'nogo syr'ya. 2020;4:195–202. doi: 10.14258/jcprm.2020047676(in Russ.)
5. OFS 1.5.3.008.18. «Opredelenie soderzhaniya dubil'nykh veshchestv v lekarstvennom rastitel'nom syre i lekarstvennykh rastitel'nykh preparatakh» (Determination of the content of tannins in medicinal plant raw materials and medicinal plant preparations) [Elektronnyi resurs]. Gosudarstvennaya farmakopeya Rossiiskoi Federatsii 14 izd. Vol 2. URL: <http://www.femb.ru> (date of application: 10.02.22) (in Russ.)
6. Gulsoy S.K., Ozturk F. Kraft pulping properties of european black pine cone. Maderas Cienc. Y Tecmol. 2015;17(4):875–882. (in Engl.).
7. Hofmann T. [et al.] Antioxidant capacity and tentative identification of polyphenolic compound of cones of selected coniferous species. Acta Silvatica et Lignaria Hungarica. 2020;16(2):79–94. (in Engl.).
8. Kupeta A.J., Naidoo E.B., Ofomaja A.E. Kinetics and equilibrium study of 2-nitrophenol adsorption onto polyurethane cross-linked pine cone biomass. J. Clean. Prod. 2018;179: 191–209. doi: 10.1016/j.jclepro.2018.01.034 (in Engl.)
9. Hofman T., Visi-Rajiczi E., Levente A. Antioxidant properties assessment of the cones of conifers through the combined evaluation of multiple antioxidant assays. Industrial Crops and Products. 2019;145:111935. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111935 (in Engl.)
10. Hofmann T. [et al.] Antioxidant and Antibacterial Properties of Norway Spruce (*Picea abies* H. Karst.) and Eastern Hemlock (*Tsuga canadensis* (L.) Carrière) Cone Extracts. Forests. 2021;12(9):1189–1211. doi: 10.3390/f12091189 (in Engl.)

УДК 615.074

© Ю.А. Труханова, Г.М. Алексеева, И.П. Яковлев, 2022

Ю.А. Труханова, Г.М. Алексеева, И.П. Яковлев
**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
 ДЛЯ АТТЕСТАЦИИ ПЕРВИЧНОГО СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА
 НОВОГО АНАЛЬГЕЗИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА -
 1-(ФЕНИЛ[ФЕНИЛИМИНО]МЕТИЛ)ПИРРОЛИДИН-2,5-ДИОНА
 ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический
 университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург**

Цель. В статье представлен подход к разработке методики количественного определения для аттестации первичного стандартного образца нового анальгезирующего средства – 1-(фенил[фенилимино]метил)пирролидин-2,5-диона (ФФМП) путем титрования по методу Кильдаля. Ввиду неспецифичности данного метода и большой вероятности наличия в аттестуемой субстанции азотсодержащих примесей было предложено провести очистку аттестуемого вещества до максимально возможной степени чистоты. Для подтверждения чистоты субстанции была разработана и валидирована методика анализа по показателю «Предельное содержание родственных примесей» методом высокоспецифичной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Материал и методы. Хроматографическое разделение на фазах ацетонитрил / 0.15% водный раствор муравьиной кислоты (рН 2.5) в градиентном режиме на колонке Tosoh ODS (4,6×250 мм, 5 мкм) со скоростью потока 1,0 мл/мин достигалось за 35 минут. Регистрация сигнала осуществлялась с помощью многоволнового УФ-детектора при длине волн 257 нм.

Выводы. С помощью валидированной методики было доказано, что чистота субстанции составляет 100,0%. По методу Кильдаля проведена количественная оценка содержания основного вещества в очищенной субстанции ФФМП, аттестованное значение его составило 99,7±0,2%.

Ключевые слова: 1-(фенил[фенилимино]метил)пирролидин-2,5-диона, метод Кильдаля, стандартный образец, аттестация, высокоспецифичная жидкостная хроматография.

Yu.A. Trukhanova, G.M. Alekseeva, I.P. Yakovlev
**DEVELOPMENT OF A QUANTITATIVE DETERMINATION METHODOLOGY
 FOR THE CERTIFICATION OF THE PRIMARY STANDARD SAMPLE
 OF A NEW ANALGESIC AGENT –
 1-(PHENYL[PHENYLIMINO]METHYL)PYRROLIDINE-2,5-DIONE**

Aim. The article presents an approach to the development of a quantitative determination technique for the certification of the primary standard sample of a new analgesic agent – 1-(phenyl[phenylimino]methyl)pyrrolidine-2,5-dione (PPMP) by titration using the Kjeldahl method. Due to the non-specificity of this method and the high probability of the presence of nitrogen-containing impurities in the substance certified, it was proposed to purify the substance certified to the maximum possible degree of purity. To confirm the purity of the substance, a method of analysis for the indicator "Limit content of related impurities" with high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed and validated.

Material and methods. Chromatographic separation in acetonitrile / 0.15% aqueous formic acid solution (pH 2.5) phases in gradient mode on a Tosoh ODS column (4.6×250 mm, 5 microns) with a flow rate of 1.0 ml/min was achieved in 35 minutes. The signal was recorded using a multi-wave UV detector at a wavelength of 257 nm.

Conclusions. Using a validated technique, it was proved that the purity of the substance is 100.0%. According to the Kjeldahl method, a quantitative assessment of the content of the main substance in the purified FFMP substance was carried out, its certified value was 99.7 ± 0.2%.

Key words: 1-(phenyl[phenylimino]methyl)pyrrolidine-2,5-dione, Kjeldahl method, standard sample, certification, high performance liquid chromatography.

Разработка новых биоактивных молекул является актуальным вопросом развития сферы здравоохранения. Решение данной нетривиальной задачи требует большого количества ресурсов. В силу этого актуальна минимизация ошибок, связанных с ложной интер-

претацией начальных данных, для дальнейшего этапа разработки. Если пройдены первые этапы разработки и проведен целенаправленный синтез новой биоактивной молекулы, разработчики сталкиваются с проблемой отсутствия стандартных образцов для аналити-

ческого контроля содержания основного вещества в исследуемой молекуле, которые важно оценивать уже на этапе доклинических исследований. Данная проблема может быть решена путем аттестации первичного стандартного образца новой молекулы.

Основным методом аттестации первичных стандартных образцов является метод баланса масс [1,2,3]. В ходе аттестации при анализе содержания родственных примесей методом высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Согласно Фармакопее Евразийского экономического союза [3] необходимо идентифицировать примеси аттестуемого вещества (при их наличии) с целью дальнейшего синтеза и установления коэффициентов чувствительности и коэффициентов пересчета каждой отдельной примеси для их количественной оценки в аттестуемом образце. В результате появляются множество недостатков – увеличение времени и затрат на аналитическую разработку. Более того, при применении данного подхода любое количественное определение единичной примеси вносит свой вклад в неопределенность аттестованного значения.

Для решения данного вопроса наиболее оптимальным, с нашей точки зрения, является первоначальная доочистка аттестуемого образца до 100,0% чистоты или до такой степени чистоты, чтобы содержание примесей в сумме было не выше относительного стандартного отклонения (% RSD) сходимости результатов используемого абсолютного метода количественного определения. Для доказательства чистоты необходимо разработать и валидировать методику анализа для определения предельного содержания примесей. Одним из наиболее удобных вариантов является применение ВЭЖХ [4].

Стоит отметить, что применяемая методика прямого количественного определения пригодна лишь для определения содержания основного вещества только в очищенном образце, что является недостатком данного подхода. Однако в рутинном анализе для нахождения количественного содержания можно использовать уже разработанную методику ВЭЖХ с доказанной специфичностью и применением аттестованного стандартного образца [5].

Целью нашего исследования стала очистка аттестуемого образца субстанции ФФМП до максимально возможной чистоты с доказательством ее по разработанной и валидированной методике предельного содержания родственных примесей количественным методом Кельдаля.

Материал и методы

1(фенил[фенилимино]метил)пирролидин-2,5-дион (ФФМП) синтезирован на кафедре органической химии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета по внутреннему протоколу 03122021/ТЯ-1 [6] и дополнительно перекристаллизован из спирта этилового. Все анализы выполнены на стандартном лабораторном сырье квалификации «ВЭЖХ» и «х.ч.».

Анализ методом ВЭЖХ-УФ осуществлялся на жидкостном хроматографе Agilent 1100 с УФ-детектором. Хроматографическое разделение проводили на колонке с обращенной фазой, Tosoh ODS (4,6×250 мм, размер частиц 5 мкм). Подвижная фаза состояла из 0,15 % раствора муравьиной кислоты (А) ($\text{pH } 2,5\pm0,1$) и ацетонитрила (Б). Программа градиентного элюирования была подобрана следующим образом (Время, Фаза А, %): 0 (90), 10(50), 25 (50), 30 (10), 32 (10), 33 (90), 35 (90). Скорость потока – 1,0 мл/мин. Температура колонки – 40 °C. Объем инъекции – 6 мкл, УФ-детектирование проводили при длине волны 257 нм.

Испытуемый раствор ФФМП для анализа методом ВЭЖХ готовили в концентрации 0,5 мг/мл. Растворитель – ацетонитрил.

Для построения калибровочного графика и определения предела обнаружения методики готовили растворы с концентрациями 0,05%, 0,08%, 0,10%, 0,12%, 0,15% от номинальной концентрации испытуемого раствора путем разбавления испытуемого раствора.

Для валидации разработанной методики ВЭЖХ по показателю «Предельное содержание родственных примесей» было необходимо оценить следующие валидационные характеристики: специфичность, правильность и предел обнаружения родственных примесей (ОФС.1.1.0012.15) [7].

Специфичность устанавливали, исходя из условий: на хроматограмме бланк-раствора (ацетонитрил) не должно быть пика, время удерживания которого совпадает с временем удерживания пика стандартного образца ФФМП; на хроматограммах стресс-тестирования при добавлении перекиси водорода и соляной кислоты разрешение между пиком основного вещества и пиком ближайшей к нему примеси должно быть не менее 1,5 (ОФС.1.2.1.2.0001.15) [7].

Для нахождения предела обнаружения родственных примесей анализировали пять калибровочных растворов с трехкратной инъекцией в диапазоне концентраций от 0,05 до 0,15 мг/мл. Значение предела обнаружения рассчитывали согласно ОФС.1.1.0013.15 [7].

Правильность оценивали по свободному члену линейной регрессии (коэффициент а) при условии линейности калибровочного графика. Заключение о правильности методики устанавливали при статистической незначимости свободного члена линейной регрессии ($a < \Delta a$).

Для анализа субстанции ФФМП по показателю «Количественное определение» методом Кельдаля 200 мг (точная навеска) испытуемой субстанции помещали в плоскодонную колбу со шлифом, добавляли 1,0 г растертой смеси меди сернокислой пятиводной, селена и сульфата калия (1:1:4), вносили 7 мл концентрированной серной кислоты и взбалтывали. Количественное определение методом Кельдаля проводили согласно ОФС.1.2.3.0011.15 [7].

Результаты и обсуждение

Разработка методики анализа предельного содержания родственных примесей осуществлялась на технических образцах ФФМП. Для анализа была выбрана гидрофилизированная колонка Tosoh ODS (4,6×250 мм, 5 мкм), так как в испытуемом образце присутствовали гидрофильные примеси, элюирующиеся в мертвом объеме. Скорость потока подвижной фазы, условия градиентного режима и время анализа были подобраны таким образом, чтобы наблюдалось наилучшее разрешение между пиками основного вещества и сопутствующих примесей (более 1,5, согласно [7]).

На рис. 1,2 представлены хроматограммы после проведения частичной деградации.

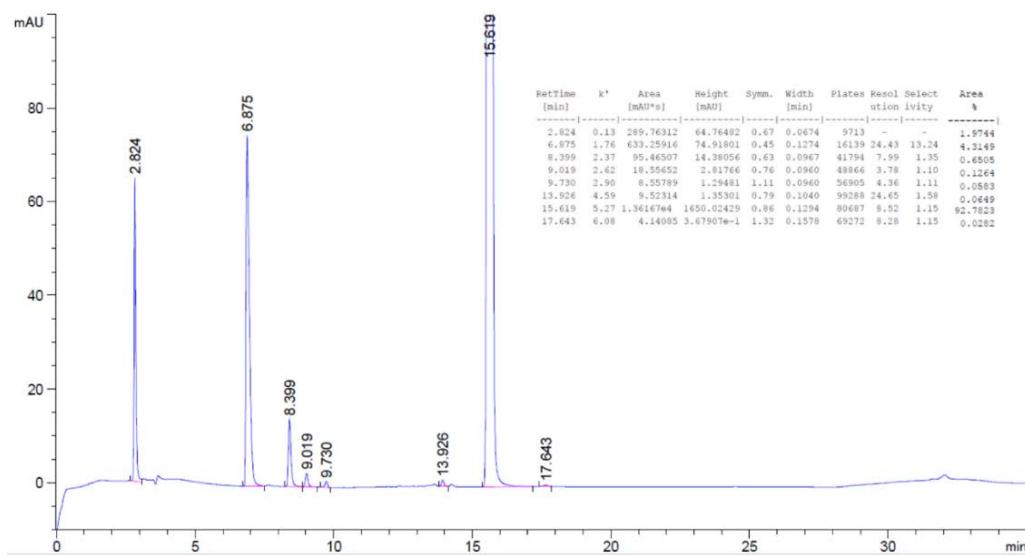


Рис. 1. Хроматограмма раствора вещества ФФМП при действии перекиси водорода при 257 нм

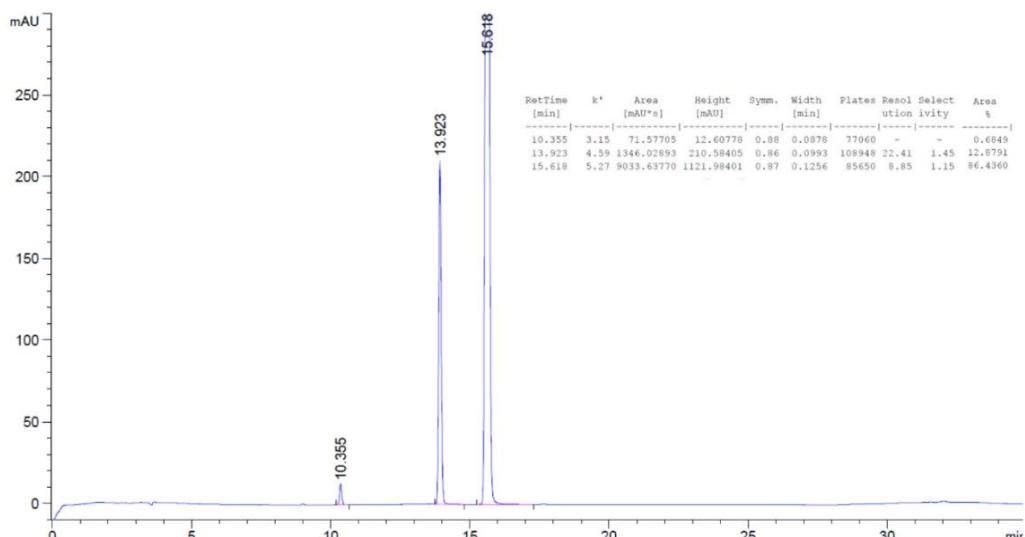


Рис. 2. Хроматограмма раствора вещества ФФМП при действии 1 М раствора соляной кислоты при 257 нм

Согласно полученным данным, на обеих хроматограммах (рис. 1,2) разрешение

между пиком основного вещества и пиком наиболее близко расположенной примеси со-

ставляет более 1,5, что соответствует заданным критериям приемлемости.

Для нахождения предела обнаружения родственных примесей был построен калибровочный график (рис. 3). Предел обнаружения составил $4,5 \times 10^{-5}$ мг/мл, что составляет $8 \times 10^{-3}\%$ от концентрации испытуемого раствора (0,5 мг/мл).

По калибровочному графику и уравнению линейной регрессии была доказана пра-

вильность ($R=0,999$, $0,12 < 0,83$, $t_a=0,40 < t_{\text{табл}}=3,18$ ($P=95\%$, $f=3$)).

Для анализа по показателю «Количественное определение» была проведена перекристаллизация образца ФФМП из этилового спирта. На рис. 4 представлена хроматограмма очищенной субстанции ФФМП при длине волны 257 нм. Как видно из приведенной хроматограммы, пики примесей не обнаружены.

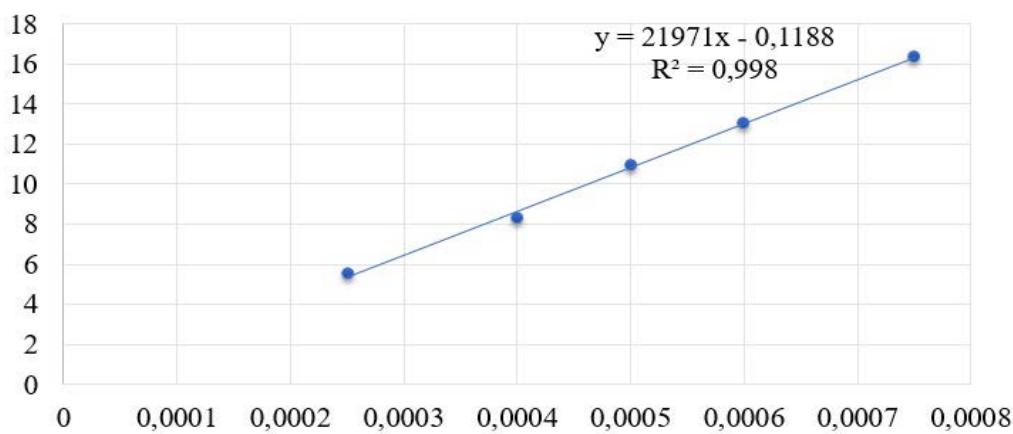


Рис. 3. Калибровочный график для оценки предела обнаружения родственных примесей

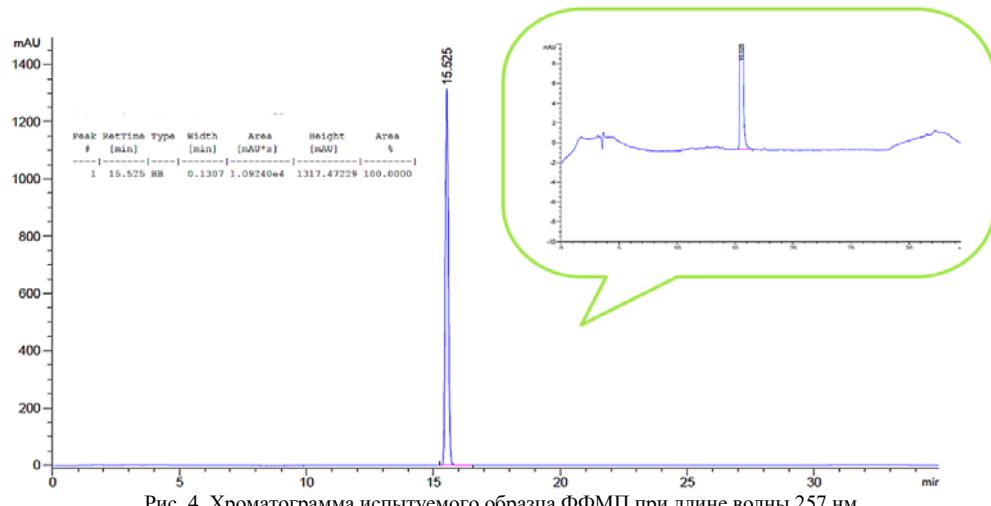


Рис. 4. Хроматограмма испытуемого образца ФФМП при длине волны 257 нм

Таблица
«Количественное определение» методом Кельдаля

№ пробы	Масса навески, мг	Объем титранта, мл	Результат (P), %	Статистическая обработка
1	198,2	12,9	99,7	$\bar{P}=99,7\%$ $SD=0,22$ $RSD=0,2\%$
2	203,2	12,7	99,5	
3	196,8	12,9	100,1	
4	200,3	12,8	99,5	
5	203,2	12,7	99,7	
6	199,9	12,8	99,8	

После анализа предельного содержания родственных примесей для образца ФФМП и доказательства 100,0% чистоты значение содержания основного вещества в образце определяли методом Кельдаля по результатам титрования 6 проб. По результатам анализа находили среднее значение и рассчитывали

величину % RSD, которое не должно превышать 0,35%. Результаты исследования приведены в таблице.

По результатам титрования содержание основного вещества в субстанции ФФМП составило $99,7 \pm 0,2\%$.

Выводы

Разработана методика количественного определения первичного стандартного образца нового анальгезирующего средства – 1-(фенилимино)метилпирролидин2,5дион а (ФФМП) – путем титрования по методу Кельдаля. Ввиду неспецифичности данного метода и большой вероятности наличия в аттестуемой субстанции азотсодержащих примесей была проведена очистка аттестуемого вещества до

100,0 %. С целью подтверждения чистоты субстанции была разработана и валидирована методика анализа по показателю «Предельное содержание родственных примесей» методом ВЭЖХ. В ходе валидации разработанной методики ВЭЖХ были доказаны специфичность и правильность, найдено значение предела обнаружения единичной примеси, которое составило

$8 \times 10^{-3}\%$ от концентрации испытуемого раствора 0,5 мг/мл. По валидированной методике определения предельного содержания примесей было доказано, что чистота субстанции составляет 100,0%. По методу Кельдаля проведена количественная оценка содержания основного вещества в субстанции ФФМП, аттестованное значение его составило $99,7 \pm 0,2\%$.

Сведения об авторах статьи:

Труханова Юлия Александровна – магистрант кафедры органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Адрес: 197376, г. Санкт-Петербург ул. Профессора Попова, 14, лит. А. E-mail: truhanova.yuliya@pharminnotech.com.
Алексеева Галина Михайловна – к.х.н., доцент, завкафедрой аналитической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Адрес: 197376, г. Санкт-Петербург ул. Профессора Попова, 14, лит. А. E-mail: galina.alexeeva@pharminnotech.com.
Яковлев Игорь Павлович – д.х.н., профессор, завкафедрой органической химии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России. Адрес: 197376, г. Санкт-Петербург ул. Профессора Попова, 14, лит. А. E-mail: igor.yakovlev@pharminnotech.com.

ЛИТЕРАТУРА

- Davies, S.R. The development of an efficient mass balance approach for the purity assignment of organic calibration standards / S.R. Davies, M. Alamgir, B.K.H. Chan // Anal. Bioanal. Chem. – 2015. – Vol. 407. – P. 7983-7993. doi:10.1007/s00216-015-8971-0
- Epstein, N.A. Certification of Reference Standards in Pharmacy: Mass Balance Method / N.A. Epstein // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2017. – Vol. 51, № 10. – P. 48-57. doi: 10.1007/s11094-018-1718-4.
- Руководство по разработке частных фармакопейных статей Фармакопеи Евразийского экономического союза. Часть 1. Субстанции для фармацевтического применения химического происхождения. – 2019. [Электронный ресурс]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/564542957> (дата обращения 1.03.2022)
- Pfeifer, C. Purity determination of amphotericin B, colistin sulfate and tobramycin sulfate in a hydrophilic suspension by HPLC, / C. Pfeifer, G. Fassauer, H. Gerecke // J. Chromatogr B. – 2015. – Vol. 990. – P. 7-14. doi:10.1016/j.jchromb.2015.02.043
- Trukhanova, Y. A. Attestation of the primary standard sample of a new analgesic agent 1-phenyl(phenylimino)methylpyrrolidine-2,5-dione, development and validation of a method for quantitative determination of the substance by HPLC / Y. A. Trukhanova, G. M. Alekseeva, I. P. Yakovlev, D.V. Spiridonova // Microchem J. – 2022. – Vol. 173. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106991
- Trukhanova, Y.A. An efficient synthesis and characterization of novel (Z)-1-phenyl(phenylimino)methylpyrrolidine-2,5-dione derivatives as potential analgesic agents / Y.A. Trukhanova, D.A. Kolesnik, I. P. Yakovlev, D.V. Spiridonova, V.N. Yuskovets, E.V. Kuvaeva, G.V. Ksenofontova, T.L. Semakova // Chemical Data Collections. – 2021. – Vol 35. 100770. doi: 10.1016/j.cdc.2021.100770
- Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание (ГФ РФ). Федеральная электронная медицинская библиотека. [Электронный ресурс]. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopeia14>. (Дата обращения: 20.03.2022)

REFERENCES

- Davies S.R., Alamgir M., Chan B.K.H., The development of an efficient mass balance approach for the purity assignment of organic calibration standards. Anal. Bioanal. Chem. 2015; (407): 7983-7993. doi:10.1007/s00216-015-8971-0 (in Engl.).
- Epstein N.A., Certification of Reference Standards in Pharmacy: Mass Balance Method. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2017; 51(10): 48-57. doi: 10.1007/s11094-018-1718-4. (in Engl.).
- Guidelines for the development of private monographs of the Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union. Part 1. Substances for pharmaceutical use of chemical origin. 2019. (in Russ.).
- Pfeifer C., Fassauer G., Gerecke H., Purity determination of amphotericin B, colistin sulfate and tobramycin sulfate in a hydrophilic suspension by HPLC, J. Chromatogr B. 2015; (990): 7-14. doi:10.1016/j.jchromb.2015.02.043(in Engl.).
- Y. A. Trukhanova, G. M. Alekseeva, I. P. Yakovlev, D.V. Spiridonova. Attestation of the primary standard sample of a new analgesic agent 1-phenyl(phenylimino)methylpyrrolidine-2,5-dione, development and validation of a method for quantitative determination of the substance by HPLC. Microchem J. Volume 173, February 2022, 106991. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106991(in Engl.).
- Trukhanova Y.A., Kolesnik D.A., Yakovlev I. P., Spiridonova D.V., Yuskovets V.N., Kuvaeva E.V., Ksenofontova G.V., Semakova T.L. An efficient synthesis and characterization of novel (Z)-1-phenyl(phenylimino)methylpyrrolidine-2,5-dione derivatives as potential analgesic agents. Chemical Data Collections, 2021; (35) 100770. doi: 10.1016/j.cdc.2021.100770(in Engl.).
- State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition (GF RF). Federal Electronic Medical Library. [Internet]. URL: <https://femb.ru/record/pharmacopeia14>. (Accessed: 03/20/2022). (in Russ.).

УДК 633.88

© И.Ю. Каликина, А.Ю. Турышев

И.Ю. Каликина, А.Ю. Турышев ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПРИ ПЛАНИРОВАНИИ ЗАГОТОВОВОК *ORIGANUM VULGARE* В ПЕРМСКОМ КРАЕ

*ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия»
Минздрава России, г. Пермь*

Цель. Определение запасов *Origanum vulgare* на территории Пермского края с использованием географических информационных систем (ГИС).

Материал и методы. Мониторинг запасов травы душицы обыкновенной проводили путем ресурсоведческих исследований по общепринятой методике определения запасов лекарственных растений. Координаты произрастания устанавливались