

На правах рукописи

Гончикова

Гончикова Юлия Анатольевна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ АНАЛИЗА
АНТИРЕТРОВИРУСНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук**

Улан-Удэ – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Илларионова Елена Анатольевна - доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Лубсандоржиева Пунцык-Нима Базыровна – доктор фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей и экспериментальной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук / лаборатория медико-биологических исследований, старший научный сотрудник.

Тараскин Василий Владимирович – кандидат фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Байкальский институт природопользования» Сибирского отделения Российской академии наук / лаборатория химии природных систем, старший научный сотрудник.

Ведущая организация: Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «12» декабря 2018 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 999.140.03 при ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН по адресу: 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Бурятского научного центра СО РАН и на сайте ИОЭБ СО РАН: <http://igeb.ru>

Автореферат разослан «11» октября 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.б.н, доцент



Хобракова Валентина Бимбаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. ВИЧ – одно из самых тяжелых хронических заболеваний. Он представляет угрозу для личной, общественной и государственной безопасности, а также для существования человечества в целом (Онищенко Г.Г., 2009; Супотницкий М.В., 2014).

Антиретровирусная терапия направлена на замедление репродукции вируса, позволяя снизить концентрацию вируса в крови до минимальных показателей, тем самым уменьшая риск развития сопутствующих заболеваний и позволяя иммунитету восстановиться в достаточной степени (Бикмухаметов Д.А., 2007; Озеров А.А., 2012; Куханова М.К., 2012; Шалдина М.В., 2017; Черняевская О.А., 2015). Ассортимент антиретровирусных препаратов постоянно расширяется, как за счет создания новых лекарственных форм на основе оригинальных синтезированных препаратов, так и на основе генериков.

Наиболее широкое распространение в схемах лечения ВИЧ-инфекции занимают нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ. Они применяются в комбинациях, так как монотерапия не показала должной эффективности (Озеров А.А., 2012; Куханова М.К., 2012).

Объектами настоящего исследования являются антиретровирусные лекарственные средства абакавир, ламивудин и зидовудин.

Критический анализ нормативной документации, а также литературных источников показал, что для анализа веществ исследуемой группы препаратов чаще всего используются инструментальные методы. Для количественного определения абакавира, ламивудина и зидовудина в субстанциях и лекарственных формах предложен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием приборов импортного производства и стандартных образцов производства USP (НД № 42-000590-270513; ФСП № 42-10406-05; НД №42-000468-291212; ФСП № 42-10497-99; НД № 42-040578-170513; ФСП № 42-14702-07; ФСП № 42-002263-041013; ФСП № 42-002393-050314; ФСП № 42-002134-110713). Данные методики дают возможность разделить исследуемые вещества и определить их количественное содержание, однако они характеризуются рядом недостатков: высокая стоимость оборудования, хроматографических колонок, стандартных образцов производства USP.

Разработка новых методик анализа абакавира, ламивудина, зидовудина, а также совершенствование существующих методов является актуальной проблемой.

Использование варианта УФ-спектрофотометрического определения, основанного на применении оптических образцов сравнения, а также применение высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе отечественного производства позволит выполнять количественное определение препарата в субстанции, лекарственных формах и биологических объектах одним и тем же методом, что повысит воспроизводимость результатов определения, а также уменьшит

трудоемкость, стоимость и погрешность анализа (Илларионова Е.А., 2003; Илларионова Е.А., 2004; Теплых А.Н., 2009).

Пожизненная терапия антиретровирусными препаратами предполагает их совместное применение с препаратами из других фармакологических групп. Эти комбинации используются для лечения заболеваний, обусловленных либо самим вирусом, либо заболеваний, с которыми так или иначе встречается каждый человек в процессе жизни (Аронин С.И., 2005).

Все лекарственные средства имеют побочные эффекты, а при сочетании употреблении, увеличении дозировок, необоснованном их применении эти эффекты могут усиливаться в огромное количество раз и как следствие возрастает риск отравления (Степанова Е.В., 2010; Доценко М.В., 2007).

ХТА веществ данной группы как при монотерапии, так и в комбинациях с другими лекарственными средствами не отражен в литературных источниках. Поэтому разработка методик экстракции, идентификации и разделения абакавира, ламивудина, зидовудина при совместном присутствии с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, амитриптилином, галоперидолом, имипразином, перициaziном, фенobarбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном в биологических объектах с использованием хроматографических методов является важной задачей.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является совершенствование методов стандартизации и химико-токсикологического анализа антиретровирусных лекарственных средств абакавира, ламивудина и зидовудина.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Подобрать условия и разработать унифицированные методики количественного определения абакавира, ламивудина и зидовудина в субстанциях и лекарственных формах методами СФ с использованием оптических образцов сравнения и ВЭЖХ на отечественном микроколоночном хроматографе, предложить проекты изменений нормативной документации (ФСП).
2. Разработать методики количественного определения зидовудина и ламивудина в таблетированной лекарственной форме «Дизаверокс» методами производной СФ и ВЭЖХ на отечественном микроколоночном хроматографе, предложить проект изменений нормативной документации (ФСП).
3. Обосновать условия экстракции (органический растворитель, рН среды, время и кратность экстракции) абакавира, ламивудина и зидовудина из растворов и разработать оптимальные методики изолирования абакавира, ламивудина и зидовудина из модельных смесей мочи.
4. Оптимизировать условия идентификации абакавира, ламивудина и зидовудина при совместном присутствии с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, амитриптилином, галоперидолом, имипразином,

перициaziном, фенобарбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном в биологических объектах.

5. Обосновать условия хроматографирования комбинированных сочетаний абакавира, ламивудина и зидовудина с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, amitриптилином, галоперидолом, имипразином, перициaziном, фенобарбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном после извлечения из модельных смесей мочи методом ВЭЖХ; разработать методики их обнаружения при использовании в комбинациях.

Научная новизна работы. Научно доказаны и определены в ходе эксперимента наиболее оптимальные параметры (рН среды, растворитель, аналитическая длина волны, оптимальная концентрация, ООС) СФ анализа абакавира, ламивудина и зидовудина в субстанциях и таблетированных лекарственных формах с использованием оптических образцов сравнения, позволяющие повысить воспроизводимость и точность анализа. Предложена методика количественного определения многокомпонентной лекарственной формы – таблеток «Дизаверокс» с использованием производной СФ.

Обоснованы унифицированные условия количественного определения антиретровирусных лекарственных средств в таблетированных лекарственных формах и в комбинациях с другими лекарственными веществами в извлечениях из мочи методом ВЭЖХ с использованием отечественного микроколоночного жидкостного хроматографа с УФ детектором.

Определено влияние различных параметров, влияющих на экстракцию абакавира, ламивудина и зидовудина из модельных смесей мочи с помощью ЖЖЭ. Установлено, что оптимальным растворителем для экстракции абакавира является трихлорметан, а в качестве высаливающего компонента – аммония сульфат насыщенный. Для выделения ламивудина предложен этилацетат, а в качестве высаливающего компонента – аммония сульфат 20 %. Зидовудин изолировали дихлорметаном при рН 8, трехкратно; в качестве высаливающего компонента рекомендован аммония сульфат 20%.

Аргументирован выбор оптимальной системы растворителей этилацетат-трихлорметан-аммиака раствор концентрированный 25% (17:4:1) для идентификации абакавира, ламивудина и зидовудина в сочетании с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, amitриптилином, галоперидолом, имипразином, перициaziном, фенобарбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном в извлечениях из мочи методом ТСХ.

Практическая значимость. По результатам исследований разработаны и предложены: 12 методик количественного определения абакавира, ламивудина и зидовудина в субстанциях и лекарственных формах СФ методом с использованием в качестве оптических образцов сравнения калия бихромата, бензойной кислоты, сульфосалициловой кислоты, калия гексацианоферрата, 4,4'-диоксифталофенона; 3 методики количественного определения абакавира, ламивудина и зидовудина в лекарственных формах методом ВЭЖХ; 3 методики изолирования абакавира, ламивудина и зидовудина из

модельных смесей мочи с помощью ЖЖЭ; методики качественного определения комбинированных сочетаний абакавира, ламивудина и зидовудина с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, амитриптилином, галоперидолом, имипразином, перициaziном, фенobarбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном в извлечениях из мочи методами ТСХ и ВЭЖХ.

Степень внедрения. Разработанные методики апробированы и внедрены в практику работы ОКК АО «Фармасинтез» (г. Иркутск), ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» республики Бурятия (г. Улан-Удэ), судебно-химического отделения ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы» (г. Иркутск), в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ. Получено 26 актов апробации и внедрения результатов данной работы. Получены два патента РФ на изобретения «Способ определения и обнаружения в моче антиретровирусных лекарственных средств в комбинированных сочетаниях» и «Способ определения абакавира». Предложены проекты изменения ФСП на указанные лекарственные средства.

Положения, выносимые на защиту:

- обоснование оптимальных условий и разработка методик спектрофотометрического анализа абакавира, ламивудина и зидовудина с использованием ООС;
- теоретическое обоснование и разработка методики количественного определения многокомпонентной лекарственной формы таблеток «Дизаверокс» с использованием производной СФ.
- результаты исследований по разработке методик анализа абакавира, ламивудина и зидовудина в лекарственных формах методом ВЭЖХ и их валидационная оценка;
- оптимальные условия экстракции абакавира, ламивудина и зидовудина из растворов: в зависимости от рН среды, используемого органического растворителя, электролитов, времени и кратности экстракции, и разработка методик изолирования абакавира, ламивудина и зидовудина из модельных смесей мочи;
- разработка условий разделения и идентификации абакавира, ламивудина и зидовудина в комбинированных сочетаниях с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, амитриптилином, галоперидолом, имипразином, перициaziном, фенobarбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном в извлечениях из мочи методами ТСХ и ВЭЖХ.

Личный вклад автора. Автором диссертационной работы проведен поиск и анализ данных по теме исследования, осуществлены планирование экспериментов, проведение экспериментальных работ, обобщение полученных данных и их статистическая обработка. Согласно сформулированным задачам, подготовлены доклады и статьи, оформлена диссертация и автореферат, представленные к защите.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – «фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенных исследований соответствуют пунктам 2,3,4 паспорта специальности.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ИГМУ по проблеме «Контроль качества лекарственных средств с использованием современных методов анализа» (номер Госрегистрации 01.91.0008620) и соответствует направлению проблемной комиссии по фармации и фармакологии.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были доложены и обсуждены на: 72-й межрегиональной конференции по фармации и фармакологии «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (Пятигорск, 2017г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновационные технологии в фармации» (Иркутск, 2017, 2018г.г.); 84-й, 85-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием им. И.И. Мечникова «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 2017, 2018г.г.), V Всероссийской научно-практической конференции «Беликовские чтения» (Пятигорск, 2017г.); Межрегиональной научно-практической конференции «Перспективы консолидации достижений современной наркологии и рационального опыта традиционной медицины» (Улан-Удэ, 2018г.).

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликована 21 работа, в том числе 4 статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК МО и науки РФ, и получены 2 патента РФ на изобретения.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 188 страницах компьютерного текста. Работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), 3 глав экспериментальной части, общих выводов; работа иллюстрирована 58 таблицами, 43 рисунками. Список литературы включает 148 источников, из них - 96 отечественных и 52 зарубежных. В приложениях представлены материалы по внедрению и апробации разработанных методик.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Для разработки методик были использованы субстанции абакавира, ламивудина, зидовудина; лекарственные формы: таблетки абакавира по 0,30 г и 0,06 г, таблетки ламивудина по 0,15 г, таблетки зидовудина по 0,30 г, таблетки мебикара по 0,5 г, таблетки клозапина по 0,025, таблетки амитриптилина по 0,025 г, таблетки метамизола натрия по 0,5 г, таблетки галоперидола по 0,005 г, таблетки имипразина по 0,025, таблетки перициазина по 0,01 г, таблетки фенобарбитала по 0,05 г, капсулы флуоксетина по 0,020 г, таблетки хлорпротиксена по 0,015 г, отвечающие требованиям НД.

Используемые реактивы, а также исследуемые образцы сравнения отвечали требованиям ГОСТов и подвергались дополнительной очистке по ранее разработанным методикам при необходимости.

Методы, использованные в работе: спектроскопия в УФ - области, экстракция жидкость – жидкостная, электрохимические (рН - метрия), титриметрические, хроматографические (тонкослойная и высокоэффективная жидкостная хроматографии) и статистические. Для расчета достоверности были использованы критерии Стьюдента и Фишера. Рассчитанное значение критериев сравнивали с граничным. Эмпирическое значение критерия равняется критическому значению $p = 0,05$. Обработку экспериментальных данных выполняли с использованием программы «Microsoft Excel for Windows 10».

Измерение спектров проводили на спектрофотометрах СФ-56, СФ-2000 (РФ) в кварцевых кюветах с длиной рабочего слоя 10 мм относительно растворителя. Величину рН контролировали с помощью универсальных ионометров ЭВ - 74 и ИТ – 1101.

Исследования методом ТСХ выполняли, используя готовые пластинки «Армсорб», «Сорбфил». Детекцию веществ на хроматограммах проводили, используя УФ-осветитель (длина волны 254 нм), реактив Драгендорфа, пары йода. Хроматографические (ВЭЖХ) исследования проводили с использованием микроколоночного жидкостного хроматографа «Миличром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», Новосибирск, РФ) с ультрафиолетовым спектрофотометрическим детектором. Были разработаны следующие хроматографические условия: стальная колонка (75x2 мм), заполненная обращено-фазовым сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ с размером частиц 5 мкм. Эффективность колонки - 3500 т.т. Температура 35°C и 40°C. Во время пробоподготовки использовали: рН метр «Анион 4100» (РФ), центрифугу «Eppendorf» (Германия), ультразвуковую баню RK 100 «Bandelin electronic» (Германия). Для перемешивания жидкостей использовали прибор Шейкер S-3,08L (фирма ELMi).

Совершенствование методов количественной стандартизации абакавира, ламивудина и зидовудина

Для разработки методик анализа были изучены спектры поглощения растворов абакавира, ламивудина, зидовудина в интервале рН 1,1- 13,0 в области от 220 до 400 нм и стабильность растворов при хранении. Выбор оптических образцов сравнения осуществляли исходя из аналитической длины волны лекарственного вещества, оптимального растворителя и оптимальной области поглощения образца сравнения (таблица 1).

Таблица 1 – Условия спектрофотометрического определения абакавира, ламивудина и зидовудина

| Лекарственное вещество | рН | λ макс, нм | Образец сравнения | λ макс, нм | Растворитель | Область поглощения, нм |
|------------------------|-----|--------------------|---------------------------|-------------------------|--------------|------------------------|
| Абакавир | 1,1 | 297±1 | Сульфосалициловая кислота | 235±1 300±1 | 0,1М HCL | 290-316 |
| | | | Калия гексацианоферрат | 261±1 303±1 421±1 | 0,1М HCL | 290-316 |
| Ламивудин | 1,1 | 279±1 | Бензойная кислота | 274±1 | 0,1М HCL | 266-280 |
| | | | 4,4'-диоксифталофенон | 275±1 | 0,1М HCL | 268-282 |
| Зидовудин | 1,1 | 267±1 | Калия бихромат | 257±1 350±1 | 0,1М HCL | 247-267 |
| | | | Калия гексацианоферрат | 261±1 303±1 421±1 | 0,1М HCL | 255-267 |

В качестве образцов сравнения нами использованы вещества неорганической и органической природы: бензойная кислота (ГОСТ 10521-78), калия бихромат (ГОСТ 4220-75), калия гексацианоферрат (ГОСТ 4207-75), 4,4'- диоксифталофенон (ГОСТ 5850-72), сульфосалициловая кислота (ГОСТ 4478-78). Данные вещества широко применяются в аналитической практике в качестве реактивов, выпускаются химической промышленностью квалификации «хч» и «чда», доступны, дешевы, на них имеются ГОСТы, регламентирующие их качество, содержание в них основного вещества определяется химическими методами и составляет не менее 99,9%.

Аналитическая длина волны абакавира (297 нм) в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты входит в интервалы оптимальные для калия гексацианоферрата (290-316 нм) и сульфосалициловой кислоты (290-316 нм). Сульфосалициловая кислота и калия гексацианоферрат выбраны в качестве внешних (оптических) образцов для количественного определения абакавира. Аналитическая длина волны ламивудина (279 нм) при рН 1,1 входит в интервал оптимальный для 4,4'- диоксифталофенона (268-282 нм) и бензойной кислоты (266-280 нм). 4,4'- диоксифталофенон и бензойная кислота предложены в качестве внешних образцов сравнения для спектрофотометрического определения ламивудина. Аналитическая длина

волны зидовудина при рН 1,1 (267 нм) входит в интервал, оптимальный для калия бихромата (247-267 нм) и калия гексацианоферрата (255-267 нм). Эти соединения использовали для спектрофотометрического анализа зидовудина в субстанции и лекарственной форме.

На рис. 1 представлен УФ - спектр поглощения лекарственного вещества и соответствующего образца сравнения на примере ламивудина.

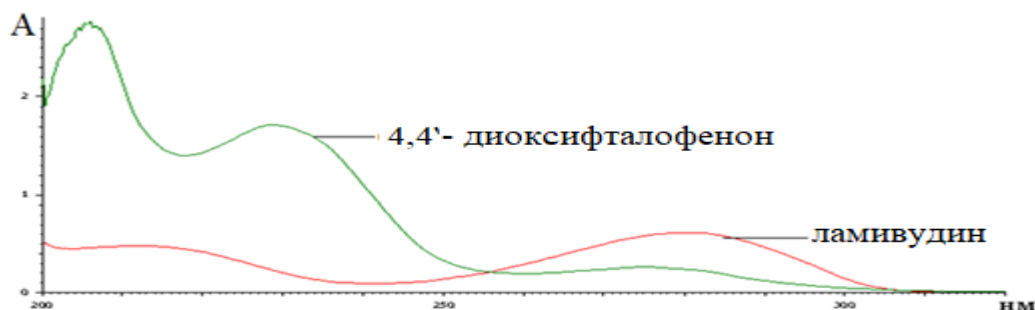


Рисунок 1 – УФ Спектры поглощения 0,001% раствора ламивудина и 0,005% раствора 4,4'- диоксифталофенона

Из рис. 1 видно, что полосы поглощения исследуемого вещества и образца сравнения в области аналитической длины волны сходны, но различаются по интенсивности поглощения в связи с чем, вводится коэффициент пересчета.

На основании найденных оптимальных условий спектрофотометрического определения исследуемой группы препаратов были разработаны унифицированные методики количественного определения по оптическим образцам сравнения в субстанциях и готовых лекарственных формах.

Результаты спектрофотометрического определения исследуемых лекарственных веществ и их готовых лекарственных форм по оптическим образцам сравнения и РСО представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2 – Результаты спектрофотометрического определения исследуемых веществ в субстанциях

| Лекарственное вещество, № серии | Образцы сравнения | Метрологические характеристики, n = 10, P = 0,95% | | | | | | |
|--|---------------------------|---|---------------|--------|--------|-----------------|-------------|-------|
| | | $K_{пер}$ | \bar{X} , % | S^2 | S | $\Delta\bar{X}$ | \bar{E} % | S_r |
| Абакавир 98 – 101,0 % ABSA15208 | Сульфосалициловая кислота | 0,2306 | 99,144 | 0,7966 | 0,8925 | 0,64 | 0,64 | 0,009 |
| | Калия гексацианоферрат | 0,1089 | 99,54 | 1,7472 | 1,3218 | 0,94 | 0,95 | 0,013 |
| | РСО | | 100,03 | 0,8655 | 0,9303 | 0,66 | 0,67 | 0,009 |
| Ламивудин 98 – 102,0 % ДВН010-4- В15В-60320В | 4,4'-диоксифталофенон | 0,1985 | 100,29 | 1,2098 | 1,0999 | 0,79 | 0,78 | 0,012 |
| | Бензойная кислота | 0,1132 | 99,48 | 1,7354 | 1,3174 | 0,94 | 0,94 | 0,013 |
| | РСО | | 100,07 | 0,0914 | 0,3024 | 0,22 | 0,22 | 0,003 |
| Зидовудин 98 – 101,5 % ДВН0006-4- В16А- 60129В | Калия бихромат | 0,3637 | 100,72 | 0,6327 | 0,7954 | 0,57 | 0,56 | 0,008 |
| | Калия гексацианоферрат | 0,4266 | 100,33 | 0,6642 | 0,8150 | 0,58 | 0,58 | 0,008 |
| | РСО | | 100,15 | 0,5518 | 0,7428 | 0,53 | 0,53 | 0,007 |

Таблица 3 – Результаты спектрофотометрического определения исследуемых веществ в лекарственных формах

| Лекарственная форма № серии | Образцы сравнения | Метрологические характеристики, n=7, P=0,95% | | | | | | |
|---|---------------------------|--|----------------|--------|-------------|-----------------|-------------|----------------|
| | | \bar{X} | S ² | S | S \bar{X} | $\Delta\bar{X}$ | \bar{E} % | S _r |
| Абакавир таб. по 0,30 90 -110% 1411116 | Сульфосалициловая кислота | 0,618 | 0,0007 | 0,0083 | 0,0026 | 0,006 | 0,97 | 0,014 |
| | Калия гексацианоферрат | 0,5986 | 0,00003 | 0,0062 | 0,0019 | 0,0042 | 0,70 | 0,010 |
| Ламивудин таб. по 0,15 95-105% 3821016 | 4,4'-диоксифталофенон | 0,148 | 0,000004 | 0,0021 | 0,0006 | 0,0015 | 0,9 | 0,014 |
| | Бензойная кислота | 0,1505 | 0,000006 | 0,0025 | 0,0008 | 0,0018 | 1,2 | 0,017 |
| Зидовудин таб. по 0,30 90 - 110% 711016 | Калия бихромат | 0,3041 | 0,000008 | 0,0029 | 0,0009 | 0,0020 | 0,68 | 0,009 |
| | Калия гексацианоферрат | 0,3047 | 0,000012 | 0,0035 | 0,0011 | 0,002 | 0,80 | 0,011 |

Результаты количественного определения в субстанции и лекарственных формах, полученные при использовании оптических образцов сравнения и РСО, сопоставимы. Относительная погрешность определений не превышает для субстанций 0,95% и для готовых лекарственных форм 1,2%.

Была проведена валидационная оценка разработанных методик спектрофотометрического определения исследуемых лекарственных средств в субстанциях и лекарственных формах (табл.4).

Таблица 4 – Результаты валидационной оценки методики спектрофотометрического определения абакавира

| Параметры | Критерии валидности | Результаты испытания | |
|--------------------------------|---|--|---|
| | | Сульфосалициловая кислота | Калия гексацианоферрат |
| Специфичность | | Специфична | Специфична |
| 1. Сходимость | RSD < 2% $t_{\text{выч}} \leq t_{\text{табл}}$ | RSD = 0,99% $t_{\text{выч}} = 2,07,$ ($t_{\text{табл}} = 2,26$), n=10 | RSD = 0,99% $t_{\text{выч}} = 1,1,$ ($t_{\text{табл}} = 2,26$), n=10 |
| 2. Воспроизводимость | RSD < 3% $t_{\text{выч}} \leq t_{\text{табл}}$ | RSD = 1,79% $t_{\text{выч}} = 0,6,$ ($t_{\text{табл}} = 2,26$), n=10 | RSD = 1,38% $t_{\text{выч}} = 1,14$ ($t_{\text{табл}} = 2,26$), n=10 |
| Линейность результатов | $r \geq 0,999$ | $r = 0,9999;$ $y = 40,438x - 0,0049$ | |
| Аналитическая область методики | интервал концентраций | 0,005-0,020 г/мл | |

Результаты, представленные в таблице 4 на примере абакавира, свидетельствуют о пригодности предложенных методик.

Количественное определение таблеток «Дизаверокс» методом производной спектрофотометрии

При совместном определении зидовудина и ламивудина спектры будут накладываться друг на друга, что будет препятствовать их количественному определению методом прямой спектрофотометрии в комбинированных лекарственных формах.

Для исследования выбрана вторая производная, которая наиболее проста по расчету и в наибольшей степени отражает характер исходного спектра. Для расчета производных спектров был выбран метод полиномиального дифференцирования по Савицкому-Галею, как наименее трудоемкий из существующих и характеризующийся достаточной точностью.

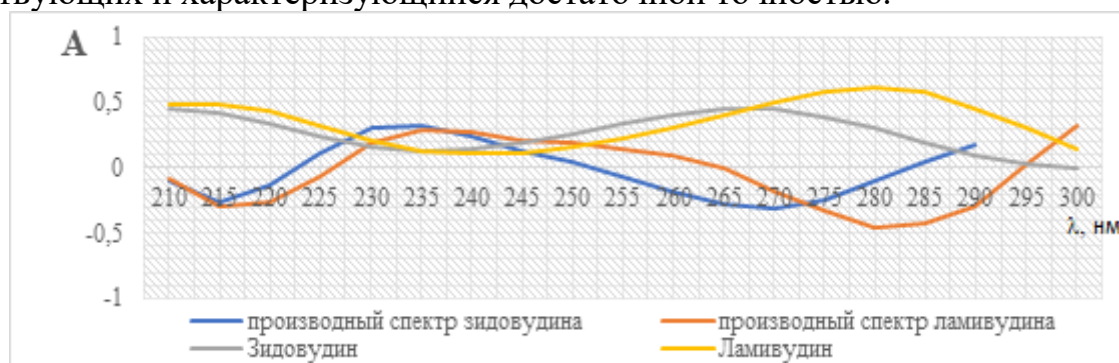


Рисунок 2 – УФ - спектры поглощения зидовудина и ламивудина в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты и графики второй производной спектров зидовудина и ламивудина

Следует отметить, что при разделении полосы поглощения на отдельные интервалы большое значение имеет величина шага ($\Delta\lambda$). Была выбрана величина шага 5 нм, при котором наблюдается наименьшее влияние ошибок измерения оптической плотности на производный спектр.

Готовили 0,001% растворы зидовудина и ламивудина в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты и рассчитывали вторые производные, по которым построили графики, представленные на рисунке 2.

Для количественного определения зидовудина в присутствии ламивудина необходимо использовать значения длин волн: 242, 247, 252, 257, 262 нм, а для количественного определения ламивудина в присутствии зидовудина необходимо использовать значения длин волн: 255, 260, 265, 270, 275 нм. В этих случаях поглощение одного из компонентов нивелируется и остается только поглощение другого компонента.

Разработанная методика была применена для модельной смеси состава: зидовудина 0,30 г и ламивудина 0,15 г. Относительная ошибка определения зидовудина в модельной смеси методом производной спектрофотометрии составляет – 3,11%, а ламивудина – 2,21%.

В таблице 5 представлены результаты количественного определения зидовудина и ламивудина в таблетках «Дизаверокс» методом производной спектрофотометрии.

Таблица 5 – Результаты количественного определения зидовудина и ламивудина в таблетках «Дизаверокс» методом производной спектрофотометрии

| Зидовудин | | | | Ламивудин | | | |
|-----------|----------|--------|---|-----------|----------|--------|---|
| D_x | $D_{ст}$ | X, г | Метрологические характеристики (n=10, P=95%) | D_x | $D_{ст}$ | X, г | Метрологические характеристики (n=10, P=95%) |
| 0,2612 | 0,2558 | 0,2996 | $\bar{X} = 0,2973$ $s^2 = 0,000015$ $S = 0,0039$ $s_{\bar{x}} = 0,0012$ $\Delta\bar{X} = 0,0027$ $\bar{\epsilon} = 0,91\%$ | 0,0835 | 0,0882 | 0,1499 | $\bar{X} = 0,1479$ $s^2 = 0,000012$ $S = 0,0035$ $s_{\bar{x}} = 0,0011$ $\Delta\bar{X} = 0,0025$ $\bar{\epsilon} = 1,68\%$ |
| 0,2891 | | 0,3017 | | 0,0873 | | 0,1503 | |
| 0,2600 | | 0,2904 | | 0,0751 | | 0,1507 | |
| 0,2638 | | 0,2916 | | 0,0812 | | 0,1457 | |
| 0,2628 | | 0,2941 | | 0,0744 | | 0,1499 | |
| 0,2689 | 0,2658 | 0,2984 | | 0,1906 | 0,1882 | 0,1494 | |
| 0,2772 | | 0,2993 | | 0,1963 | | 0,1480 | |
| 0,2897 | | 0,3000 | | 0,2080 | | 0,1487 | |
| 0,2629 | 0,2551 | 0,2992 | | 0,0892 | 0,0957 | 0,1462 | |
| 0,2851 | | 0,2983 | | 0,0942 | | 0,1475 | |

Из представленных в таблице 5 экспериментальных данных видно, что относительная погрешность определения зидовудина не превышает 0,91%, ламивудина – 1,68%.

Валидационная оценка разработанной методики отображена в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты валидационной оценки методики количественного определения зидовудина и ламивудина в таблетках «Дизаверокс» методом производной спектрофотометрии

| Параметры | Критерии валидности | Результаты испытания | |
|--------------------------------|-------------------------------------|--|---|
| | | Зидовудин | Ламивудин |
| Специфичность | Стандартный образец | Специфична | Специфична |
| Сходимость | RSD < 2% $t_{выч} \leq t_{табл}$ | RSD = 0,91% $t_{выч} = 2,1$, ($t_{табл} = 2,26$), n=10 | RSD = 1,68% $t_{выч} = 1,8$, ($t_{табл} = 2,26$), n=10 |
| Воспроизводимость | RSD < 3% $t_{выч} \leq t_{табл}$ | RSD = 1,5% $t_{выч} = 1,87$, ($t_{табл} = 2,26$), n=10 | RSD = 1,87% $t_{выч} = 1,67$, ($t_{табл} = 2,26$), n=10 |
| Линейность | $r \geq 0,999$ | $r = 0,9994$ $y = 59,271x - 0,0076$ | $r = 0,9994$ $y = 1,1854x - 0,0076$ |
| Аналитическая область методики | Интервал концентрации | 0,005-0,025 мг/мл | 0,0025-0,015 мг/мл |

Результаты, представленные в таблице 6, свидетельствуют о том, что методика пригодна для анализа. Разработанная методика является менее трудоемкой, экспрессной, время анализа уменьшается в два раза, характеризуется низкой стоимостью по сравнению с методикой НД.

Количественный анализ абакавира, ламивудина и зидовудина в готовых лекарственных формах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Разработаны методики количественного определения абакавира, ламивудина и зидовудина в лекарственных формах методом ВЭЖХ. Для анализа выбран обращено-фазный вариант хроматографии. Исследования проводили на отечественном микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02».

Оптимальные условия хроматографирования (колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ и система растворителей, состоящая из двух элюентов: 1 – 4 М лития перхлорат и 0,1 М хлорная кислота 5:95 (рН 2,8) и 2 – ацетонитрил 2000 мкл с линейным увеличением доли растворителя органической природы от 5 до 35%. Скорость элюента 100 мкл/мин, температура колонки 35°C, время анализа около 30 мин.

Времена удерживания абакавира, ламивудина и зидовудина составляют 8,6 мин, 4,6 мин и 8,1 мин соответственно.

Результаты количественного определения на примере таблеток абакавира методом ВЭЖХ приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты количественного определения таблеток абакавира методом ВЭЖХ

| Лекарственная форма | № серии | \bar{X} , г | Метрологические характеристики (n=9, P=95%) | | | | | | |
|-----------------------------|---------|---------------|--|----------------|------|-------------|------------------|------|----------------|
| | | | \bar{X} , % | S ² | S | S \bar{x} | $\Delta \bar{X}$ | E% | S _r |
| Абакавир таблетки 300 мг | 1411116 | 0,3102 | 103,40 | 1,98 | 1,41 | 0,47 | 1,11 | 0,11 | 0,014 |
| | 1010815 | 0,3012 | 100,40 | 1,21 | 1,10 | 0,37 | 0,87 | 0,87 | 0,011 |
| | 1411117 | 0,2969 | 98,97 | 1,53 | 1,24 | 0,41 | 0,97 | 0,98 | 0,013 |

Оценка правильности предложенных методик проведена на примере модельных смесей лекарственных форм абакавира, ламивудина и зидовудина с тремя уровнями концентраций (от 80 до 120%) от заявленного количества в лекарственной форме проведена. В таблице 8 приведена валидационная оценка разработанных методик количественного определения абакавира, ламивудина и зидовудина по показателям: пригодность хроматографической системы, воспроизводимость, правильность, аналитическая область методики, линейность результатов, стабильность раствора.

Данные, представленные в таблице 8, свидетельствуют о пригодности предложенных методик.

Разработанные методики количественного определения абакавира, ламивудина, зидовудина в лекарственных формах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детекцией на хроматографе отечественного производства «Милихром А-02» характеризуется селективностью, экспрессностью и правильностью. Кроме того, такие вспомогательные вещества как целлюлоза, карбоксиметилкрахмал

натрия, магния стеарат и другие, которые обычно присутствуют в препаратах, не мешают определению.

Таблица 8 – Результаты проведения валидационной оценки методик количественного определения абакавира, ламивудина, зидовудина в таблетках методом ВЭЖХ

| Параметры | Критерии | Результаты испытания | | |
|--|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | абакавир | ламивудин | зидовудин |
| Специфичность | | Методика специфична | Методика специфична | Методика специфична |
| Пригодность хроматографической системы | | | | |
| Эффективность колонки | не менее 3000 т.т. | 3500 т.т. | 3500 т.т. | 3500 т.т. |
| Коэффициент асимметрии пика | не более 1,5 | 1,0 | 0,84 | 1,02 |
| Сходимость Воспроизводимость | RSD ≤ 2,0% | 1,47 | 1,94 | 1,33 |
| | RSD ≤ 2,0% | 2,11 | 2,32 | 1,96 |
| Правильность | $t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}$ ($t_{\text{табл}}=2,36$), n=9 | 1,09 | 0,26 | 1,60 |
| Линейность | $r \geq 0,990$ | 0,999 $y = 78.59x$ | 0,999 $y = 114.9x$ | 0,999 $y = 70.09x$ |
| Стабильность | индивидуально | В течение суток | | |

Результаты количественного определения зидовудина и ламивудина в таблетках «Дизаверокс» методом ВЭЖХ представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты количественного определения ламивудина и зидовудина в таблетках «Дизаверокс» методом ВЭЖХ

| Компонент | \bar{X} , г | \bar{X} , % | Метрологические характеристики (n=10, P=95%) | | | | | |
|-----------|---------------|---------------|---|------|-------------|----------------|------|----------------|
| | | | S ² | S | S \bar{x} | ΔX , % | E% | S _r |
| Зидовудин | 0,3018 | 100,62 | 1,63 | 1,28 | 0,41 | 0,93 | 0,92 | 0,013 |
| Ламивудин | 0,1485 | 99,00 | 2,56 | 1,60 | 0,51 | 1,15 | 1,16 | 0,016 |

Проведена сравнительная оценка результатов определения количества абакавира, ламивудина и зидовудина в ЛФ, полученных методами ВЭЖХ и СФ, с использованием оптических образцов сравнения, которая показала, что при количественном определении абакавира, ламивудина и зидовудина в лекарственных формах методом спектрофотометрии с использованием оптических образцов сравнения и методом ВЭЖХ получены близкие результаты. Разработанные методики рекомендованы для включения в НД на исследуемые лекарственные формы как альтернативные.

Разработка условий изолирования абакавира, ламивудина и зидовудина из биологических объектов

Изучено влияние факторов (природа органического растворителя, рН среды, электролит, время и кратность экстракции) на извлечение абакавира, ламивудина и зидовудина из растворов (табл.10).

Таблица 10 – Оптимальные условия изолирования исследуемых лекарственных средств

| Исследуемое вещество | Растворитель | pH среды | Электролит | Время экстракции (мин) | Кратность экстракции |
|----------------------|--------------|----------|---------------------------|------------------------|----------------------|
| Абакавир | Трихлорметан | 8 | NaSO ₄ (насыщ) | 3 | 1 |
| Ламивудин | Этилацетат | 10 | NaSO ₄ 20% | 7 | 3 |
| Зидовудин | Дихлорметан | 8 | NaSO ₄ 20% | 3 | 3 |

Из таблицы 10 видно, что трихлорметан является оптимальным органическим растворителем для экстракции абакавира при pH 8, для изолирования ламивудина был выбран этилацетат при pH 10, а зидовудин лучше всего экстрагируется в дихлорметан при pH 8. Аммония сульфат раствор насыщенный увеличивает экстракцию абакавира, а аммония сульфат раствор 20% - ламивудина и зидовудина. Увеличение времени экстракции до 7 минут увеличило степень экстракции ламивудина, но не повлияло на экстракцию абакавира и зидовудина. Степень экстракции абакавира не возрастает при увеличении кратности экстрагирования, в связи с чем следует использовать однократную экстракцию. Ламивудин и зидовудин лучше изолируются при трехкратной экстракции.

Разработанные методики были использованы для изолирования абакавира, ламивудина и зидовудина из модельной смеси мочи с использованием жидкость – жидкостной экстракции. Степень извлечения абакавира из мочи составляет 57,39 до 87,25 %, ламивудина 60,10 до 69,70 % и 67,30 - 84,20 % для зидовудина.

Результаты изолирования из модельной смеси мочи на примере абакавира, представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Определение степени извлечения абакавира из модельной смеси мочи спектрофотометрическим методом по калия гексацианоферрату

| Внесено, мг | Степень извлечения, % | Метрологические характеристики |
|-------------|--|---|
| 600 | 79,08; 74,88; 80,30; 75,15; 72,73; 76,40; | $\bar{x} = 76,42\%$; $S\bar{x} = 1,15$; $\Delta X = 2,82$; $\varepsilon = 3,69\%$ |
| 900 | 86,72; 86,20; 83,75; 78,89; 80,11; 77,72; | $\bar{x} = 82,23\%$; $S\bar{x} = 1,57$; $\Delta X = 3,85$; $\varepsilon = 0,58\%$; |
| 1200 | 74,18; 62,86; 57,39; 63,72; 59,98; 68,80; | $\bar{x} = 64,32\%$; $S\bar{x} = 2,52$; $\Delta X = 6,17$; $\varepsilon = 9,59\%$; |

В извлечении из модельной смеси мочи обнаруживается от 57,39 до 87,25 % абакавира.

Химико-токсикологическое исследование антиретровирусных лекарственных средств в комбинациях с другими лекарственными средствами хроматографическими методами

Широкие возможности антиретровирусной терапии в реальности имеют ограничения, связанные, прежде всего, с выраженным токсическим эффектом препаратов и большим числом нежелательных реакций. В связи с увеличением количества больных ВИЧ и СПИД, а также учитывая то, что

антиретровирусная терапия является пожизненной все чаще возникает необходимость определения этих лекарственных средств в объектах биологического происхождения и вещественных доказательствах.

Разработаны унифицированные методики обнаружения и разделения абакавира, ламивудина и зидовудина в комбинированных сочетаниях с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, амитриптилином, галоперидолом, имипразином, перициaziном, фенобарбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном методами ТСХ и ВЭЖХ.

Для выбора условий разделения методом ТСХ была определена хроматографическая подвижность исследуемых веществ в общих системах растворителей, наиболее часто применяемых для веществ основного характера в ХТА на этапе скрининга. Полученные результаты показали, что разделение абакавира, ламивудина и зидовудина и других лекарственных веществ идёт недостаточно чётко, поэтому возникла необходимость разработки частных систем хроматографирования, позволяющих отделить абакавир, ламивудин и зидовудин от мебикара, клозапина, метамизола натрия, амитриптилина, галоперидола, имипразина, перициазина, фенобарбитала, флуоксетина и хлорпротиксена. Было изучено влияние органических растворителей различной полярности, основности и кислотности на хроматографическую подвижность исследуемых соединений. Анализ значений ΔR_f между зонами показал, что наибольшее значение ΔR_f между зонами наблюдается для системы растворителей этилацетат – трихлорметан – аммиака раствор концентрированный 25% (17:4:1). Разработанную методику в дальнейшем использовали для анализа комбинированных сочетаний после извлечения их из мочи.

В таблице 12 представлены результаты хроматографирования абакавира, ламивудина и зидовудина в комбинированных сочетаниях с другими лекарственными веществами после извлечения их из мочи.

Таблица 12 – Результаты хроматографирования абакавира, ламивудина, зидовудина и других лекарственных веществ при комбинированных сочетаниях в моче с использованием метода тонкослойной хроматографии

| Комбинированные сочетания лекарственных веществ | Значение R_f (n = 6) | Комбинированные сочетания лекарственных веществ | Значение R_f (n = 6) |
|---|------------------------|---|------------------------|
| Абакавир | 0,16± 0,01 | Абакавир | 0,16±0,01 |
| Метамизол натрия | 0,47±0,01 | Фенобарбитал | 0,27±0,01 |
| Хлорпротиксен | 0,69±0,02 | Амитриптилин | 0,53±0,02 |
| Зидовудин | 0,20±0,03 | Зидовудин | 0,20± 0,03 |
| Фенобарбитал | 0,27±0,01 | Мибикар | 0,47±0,02 |
| Перициазин | 0,24±0,01 | Галоперидол | 0,67±0,01 |
| Ламивудин | 0,10±0,01 | Ламивудин | 0,10±0,01 |
| Имипрамин | 0,53±0,02 | Хлорпротексен | 0,69±0,02 |
| Клозапин | 0,40±0,02 | Флуоксетин | 0,34±0,02 |

В настоящее время высокоэффективная жидкостная хроматография занимает одно из лидирующих мест среди инструментальных методов.

Важнейшим преимуществом ВЭЖХ является возможность исследования практически любых объектов без каких-либо ограничений по их физико-химическим свойствам

Для ВЭЖХ анализа смесей абакавира, ламивудина и зидовудина в сочетании с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, amitриптилином, галоперидолом, имипразином, перициазин, фенобарбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном был выбран обращенно-фазный вариант. Разработаны оптимальные условия: обращенная фаза ProntoSIL 120-5C18AQ, режим элюирования - линейный градиент (3700 мкл 5% - 70% Б) в системе: элюент А: 0,2 М лития перхлорат – 0,005 М раствор хлорной кислоты (рН 2.8); элюент Б: ацетонитрил. Скорость потока элюента – 100 мкл/мин. Температура колонки – 40°C.

Результаты хроматографического определения абакавира, ламивудина, зидовудина и других лекарственных веществ после извлечения их из мочи представлены в таблице 13.

Таблица 13– Результаты хроматографического анализа исследуемых соединений в предложенных условиях

| Соединение | Время удерживания, мин | Метрологические характеристики (n=6) |
|------------------|--|--|
| Абакавир | 12,90; 12,91; 12,89 12,91; 12,90; 12,90 | $\bar{X} = 12,90$; $S_X = 0,003$; $\Delta X = 0,008$; $E = 0,06\%$ |
| Ламивудин | 7,15; 7,15; 7,16 7,16; 7,15; 7,17 | $\bar{X} = 7,16$; $S_X = 0,003$; $\Delta X = 0,009$; $E = 0,13\%$ |
| Зидовудин | 11,25; 11,24; 11,24 11,26; 11,24; 11,25 | $\bar{X} = 11,25$; $S_X = 0,004$; $\Delta X = 0,01$; $E = 0,09\%$ |
| Мебикар | 7,12; 7,11; 7,13 7,11; 7,13; 7,13 | $\bar{X} = 7,12$; $S_X = 0,0041$; $\Delta X = 0,011$; $E = 0,15\%$ |
| Клозапин | 20,90; 20,90; 20,89 20,91; 20,90; 20,89 | $\bar{X} = 20,90$; $S_X = 0,003$; $\Delta X = 0,0077$; $E = 0,037\%$ |
| Амитриптилин | 29,76; 29,77; 29,76 29,77; 29,76; 29,77 | $\bar{X} = 29,77$; $S_X = 0,003$; $\Delta X = 0,0081$; $E = 0,027\%$ |
| Метамизол натрия | 11,46; 11,47; 11,46 11,46; 11,46; 11,47 | $\bar{X} = 11,46$; $S_X = 0,0025$; $\Delta X = 0,0064$; $E = 0,056\%$ |
| Галоперидол | 27,72; 27,72; 27,73 27,72; 27,71; 27,72 | $\bar{X} = 27,72$; $S_X = 0,0026$; $\Delta X = 0,0067$; $E = 0,0024\%$ |
| Имипразин | 29,07; 29,07; 29,06 29,07; 29,08; 29,07 | $\bar{X} = 29,07$; $S_X = 0,0026$; $\Delta X = 0,0066$; $E = 0,023\%$ |
| Перициазин | 26,40; 26,41; 26,40; 26,40; 26,41; 26,41; | $\bar{X} = 26,41$; $S_X = 0,0032$; $\Delta X = 0,008$; $E = 0,030\%$ |
| Фенобарбитал | 17,19; 17,19; 17,18; 17,17; 17,18; 17,19; | $\bar{X} = 17,18$; $S_X = 0,0037$; $\Delta X = 0,010$ $E = 0,0058\%$ |
| Флуоксетин | 30,24; 30,23; 30,24; 30,25; 30,23; 30,25; | $\bar{X} = 30,24$; $S_X = 0,0036$; $\Delta X = 0,0094$; $E = 0,031\%$ |
| Хлорпротиксен | 31,33; 31,33; 31,33; 31,32; 31,33; 31,33; | $\bar{X} = 31,33$; $S_X = 0,0018$; $\Delta X = 0,005$; $E = 0,015\%$ |

Таким образом, разработанная унифицированная методика позволяет использовать метод ВЭЖХ для идентификации абакавира, ламивудина и

зидовудина в комбинированных сочетаниях с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, amitриптилином, галоперидолом, имипразином, перициaziном, фенобарбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизированы условия спектрофотометрического определения (рН среды и растворитель, оптимальная концентрация, аналитическая длина волны, оптический образец сравнения) и разработаны унифицированные методики количественного определения абакавира, ламивудина и зидовудина в субстанциях и лекарственных формах с использованием оптического образца сравнения, отличающиеся высокой воспроизводимостью и точностью; разработаны и предложены проекты изменений ФСП.

2. Осуществлен выбор оптимальных условий хроматографического анализа (сорбент Prontosil С 18, в системе, состоящей из двух элюентов: 1 – 4 М лития перхлорат и 0,1 М хлорная кислота 5:95 (рН 2,8) и 2 – ацетонитрил 2000 мкл с линейным увеличением доли растворителя органической природы от 5 до 35% при скорости элюента 100 мкл/мин и температуре 35°C) и разработаны методики количественного определения абакавира, ламивудина и зидовудина в лекарственных формах методом ВЭЖХ; разработаны и предложены проекты изменений ФСП.

3. Разработаны методики количественного определения зидовудина и ламивудина в таблетированной лекарственной форме «Дизаверокс» методами производной СФ и ВЭЖХ; разработан и предложен проект изменений ФСП.

4. Обоснованы условия экстракции (природа органического растворителя, рН среды, электролит, время и кратность экстракции) абакавира, ламивудина и зидовудина из растворов; разработаны условия изолирования антиретровирусных лекарственных средств из модельной смеси мочи методом ЖЖЭ.

5. Впервые на основании изучения хроматографической подвижности абакавира, ламивудина и зидовудина в комбинированных сочетаниях с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, amitриптилином, галоперидолом, имипразином, перициaziном, фенобарбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном определена система растворителей этилацетат-трихлорметан-аммиака раствор концентрированный 25% (17:4:1) и разработана методика их разделения и идентификации при совместном присутствии с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, amitриптилином, галоперидолом, имипразином, перициaziном, фенобарбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном методом ТСХ.

6. Обоснованы условия хроматографирования комбинированных сочетаний абакавира, ламивудина и зидовудина с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, amitриптилином, галоперидолом, имипразином, перициaziном, фенобарбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном методом ВЭЖХ; разработаны методики разделения и идентификации их в

комбинированных сочетаниях с мебикаром, клозапином, метамизолом натрия, амитриптилином, галоперидолом, имипразином, перициaziном, фенобарбиталом, флуоксетином и хлорпротиксеном в извлечениях из мочи методом ВЭЖХ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гончикова, Ю.А. Новый метод количественного определения ламивудина / Ю.А. Гончикова // 84-я Всероссийская Байкальская науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов с междунар. участием, посвященная 95-летию научного общества молодых ученых и студентов им. И.И. Мечникова: сб. науч. трудов. – Иркутск, 2017. – С. 29-30.
2. Гончикова, Ю.А. Оптимизация условий спектрофотометрического определения ламивудина / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященная памяти профессора В.А. Маняка. – Иркутск, 2017. – С. 81-85.
3. Гончикова, Ю.А. Идентификация ламивудина в комбинированных сочетаниях методом тонкослойной хроматографии / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Журнал МедиАль. – 2017. – № 1. – С. 312-313.
4. Гончикова, Ю.А. Изучение хроматографической подвижности абакавира в комбинированных сочетаниях / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Беликовские чтения: мат-лы V Всероссийской научно-практической конференции. 2017. – С. 32-34.
5. Гончикова, Ю.А. Разработка условий количественного определения зидовудина методом спектрофотометрии / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященная памяти профессора В.А. Маняка. – Иркутск, 2017. – С. 85-88
6. Гончикова, Ю.А. Валидационная оценка методики количественного определения ламивудина / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященная памяти профессора В.А. Маняка. – Иркутск, 2017. – С. 74-77.
7. Гончикова, Ю.А. Количественное определение ламивудина методом УФ-спектрофотометрии / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // **Acta Biomedica Scientifica**. – 2017. – Т. 2. – № 4. – С. 90-92.
8. Гончикова, Ю.А. Разработка условий спектрофотометрического определения абакавира / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Журнал МедиАль. – 2017. – № 1. – С. 313-314.

9. Гончикова, Ю.А. Совершенствование метода УФ-спектрофотометрического определения абакавира / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // **Кубанский научный медицинский вестник**. – 2017. – № 2. – С. 53-56.
10. Гончикова, Ю. А. Анализ комбинированных сочетаний лекарственных средств на основе абакавира, ламивудина, зидовудина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // **Кубанский научный медицинский вестник**. – 2018. – № 3. – С. 46-50.
11. Гончикова, Ю. А. Анализ сочетаний антиретровирусных лекарственных средств методом ВЭЖХ / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // **Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященная памяти доцента Пешковой В.А.** – Иркутск, 2018. – С. 84-87.
12. Гончикова, Ю. А. Количественное определение абакавира, ламивудина и зидовудина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // **Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященная памяти доцента Пешковой В.А.** – Иркутск, 2018. – С. 79-83.
13. Гончикова, Ю. А. Разработка методики количественного определения антиретровирусных лекарственных средств методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // **Медицинский альманах**. – 2018. – № 2 – С. 98-100.
14. Гончикова, Ю.А. Применение метода производной спектрофотометрии в анализе таблеток Дизаверокс / Ю.А. Гончикова, Е.А. Илларионова В.В. Япланова // **Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященная памяти доцента Пешковой В.А.** – Иркутск, 2018. – С. 95-102.
15. Гончикова, Ю.А. Разработка методики идентификации и разделения комбинированных сочетаний на основе антиретровирусных лекарственных средств методом ВЭЖХ / Ю.А. Гончикова // **85-я Всероссийская Байкальская науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов с междунар. участием, посвященная 95-летию научного общества молодых ученых и студентов им. И.И. Мечникова: сб. науч. трудов.** – Иркутск, 2018. – С. 463-464.
16. Гончикова, Ю.А. Разработка методики количественного определения антиретровирусных лекарственных средств методом ВЭЖХ на хроматографе отечественного производства / Ю.А. Гончикова // **85-я Всероссийская Байкальская науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов с междунар. участием, посвященная 95-летию научного общества молодых ученых и студентов им. И.И. Мечникова: сб. науч. трудов.** – Иркутск, 2018. – С. 465-466.

17. Изучение влияния различных факторов на степень экстракции ламивудина из растворов / Ю.А. Гончикова, Е.А. Илларионова, С.С. Коновалова, А.Э. Митина // Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященная памяти доцента Пешковой В.А. – Иркутск, 2018. – С. 92-95.
18. Разработка методики изолирования зидовудина из водных растворов / Ю.А. Гончикова, Е.А. Илларионова, М.А. Баженова, Г.В. Зырянова // Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященная памяти доцента Пешковой В.А. – Иркутск, 2018. – С. 90-92.
19. Спектрофотометрический анализ зидовудина / Ю.А. Гончикова, Е.А. Илларионова, Е.С. Костенко, К.А. Стешенко // Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященная памяти доцента Пешковой В.А. – Иркутск, 2018. – С. 87-90.
20. Пат. № 2655804 Российская Федерация МПК G01N 1/28, G01N 30/90. Способ определения и обнаружения в моче антиретровирусных лекарственных средств в комбинированных сочетаниях/ Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова, В.В. Тыжигирова; Заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ИГМУ. – № 2017112451; заявл. 11.04.2017, опубл. 29.05.2018, Бюл. № 16. – 6 с.
21. Пат. № 2661625 Российская Федерация МПК G01N 33/15, G01N 21/33. Способ определения абакавира / Ю.А. Гончикова, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова, В.В. Тыжигирова; Заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ИГМУ. – № 2017110976; заявл. 31.03.2017, опубл. 17.07.2018, Бюл. № 20. – 7 с.

Список условных сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ЛФ – лекарственная форма; НД – нормативная документация; РСО – рабочий стандартный образец; СФ – спектрофотометрический анализ; ТСХ – тонкослойная хроматография; ФСП – фармакопейная статья предприятия; ХТА – химико-токсикологический анализ