

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



Тютрина Вера Александровна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ АНАЛИЗА
ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук**

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор Илларионова Е. А.

**Иркутск
2020**

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. МЕТОДЫ АНАЛИЗА ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	13
1.1. Общая характеристика и методы анализа офлоксацина	13
1.2.Общая характеристика и методы анализа линезолида.....	19
1.3.Общая характеристика и методы анализа эфавиренза.....	25
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1.Объекты и методы исследования	34
2.2. Методики исследований	39
ГЛАВА 3.СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.....	42
3.1.Оптимизация условий спектрофотометрического анализа офлоксацина в субстанции и лекарственной форме.....	43
3.2. Оптимизация условий спектрофотометрического анализа линезолида в субстанции и лекарственной форме.....	52
3.3.Оптимизация условий спектрофотометрического анализа эфавиренза в субстанции и лекарственной форме.....	61
3.4.Оптимизация условий количественного анализа фторсодержащих лекарственных средств в лекарственных формах методом микроколоночной ВЭЖХ с многоволновой фотометрической детекцией.....	72
Выводы по главе.....	91
ГЛАВА 4. ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОФЛОКСАЦИНА, ЛИНЕЗОЛИДА И ЭФАВИРЕНЗА ПРИ КОМБИНИРОВАННЫХ ОТРАВЛЕНИЯХ	93

4.1. Оптимизация условий изолирования офлоксацина, линезолида и эфавиренза из модельного образца мочи	94
Выводы по главе.....	107
ГЛАВА 5. ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В КОМБИНАЦИЯХ С ДРУГИМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ	108
5.1. Разделение и идентификация офлоксацина, линезолида и эфавиренза в комбинированных сочетаниях с лекарственными средствами различных фармакологических групп методом ТСХ	108
5.2. Идентификация офлоксацина, линезолида и эфавиренза методом микроколоночной ВЭЖХ с многоволновой фотометрической детекцией	117
Выводы по главе.....	128
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	130
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	132
ПРИЛОЖЕНИЕ	150

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС/МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с tandemной масс-спектрометрией
ВЭТСХ	– высокоэффективная тонкослойная хроматография
ГФ	– Государственная фармакопея
ГСО	– государственный стандартный образец
ЖЖЭ	– жидкость-жидкостная экстракция
КЗЭ	– капиллярный зонный электрофорез
КЭ	– капиллярный электрофорез
МЭКХ	– мицеллярная электрокинетическая хроматография
НД	– нормативная документация
ОФС	– общая фармакопейная статья
СОВС	– стандартный образец вещества - свидетеля
РСО	– рабочий стандартный образец
ТСХ	– тонкослойная хроматография
ТФЭ	– твердофазная экстракция
УПЭ	– углеродный пастовый электрод
УФ	– ультрафиолетовая область спектра
ФСП	– фармакопейная статья предприятия
ХТА	– химико-токсикологический анализ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Несмотря на определенные успехи в профилактике и лечении инфекционных болезней, они остаются важнейшей проблемой медицинской науки и практического здравоохранения [6]. Инфекционные болезни входят в число заболеваний, существенно влияющих на показатели здоровья человека. Особую опасность инфекционные болезни представляют в связи с их способностью в течение короткого периода времени вовлекать в процесс большое число практически здоровых людей.

Учитывая способность бактерий и вирусов адаптироваться к воздействию лекарственных препаратов, необходима постоянная разработка новых эффективных средств, а вслед за этим и способов контроля качества, диагностики отравлений и антидотной терапии. Следовательно, совершенствование существующих и разработка новых методов контроля качества современных препаратов и их химико-токсикологического анализа (ХТА) является актуальной и важной задачей.

Благодаря разработкам в области фармацевтической химии, в медицинскую практику внедряются лекарственные вещества гетероциклического ряда с различными заместителями. Объектами настоящего исследования являются офлоксацин, линезолид и эфавиренз, отличающиеся механизмами действия. Так, офлоксацин относится к группе антибактериальных препаратов, является представителем фторхинолонов II поколения [17]. Линезолид – синтетический антибиотик группы оксазолидинонов [92; 97]. Эфавиренз – антиретровирусный препарат группы ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы [22; 52]. Все эти препараты содержат в структуре атом фтора, который усиливает их ценное фармакологическое действие и делает эти лекарственные вещества более стабильными. Исследование фторсодержащих гетероциклических соединений необходимо для более полного внедрения их в медицинскую практику и активного использования для лечения инфекций.

Критический анализ данных литературы, нормативных документов (НД) и зарубежных фармакопей показал, что методы анализа указанной группы

препаратов несовершены и не позволяют объективно оценить их качество. Для количественного определения офлоксацина в субстанции предложен метод ацидиметрии в среде уксусного ангидрида [20]. Указанный метод имеет ряд недостатков: трудоемкость, применение токсичных летучих растворителей, необходимость иметь герметизированную титровальную установку, длительность выполнения. Для количественной оценки линезолида и эфавиренза в субстанции и таблетках, покрытых оболочкой, а также в таблетках офлоксацина, покрытых оболочкой, рекомендован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием приборов импортного производства и стандартных образцов производства USP [13; 14; 19; 28; 29]. 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, трудоёмкость, большая длительность времени выполнения анализа, применение токсичных органических растворителей. Кроме того, методики их количественного определения предполагают применение стандартных образцов и аппаратуры импортного производства, не всегда доступного для российских лабораторий. Следовательно, разработка унифицированных, экономичных и экспрессных методик обнаружения и количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза методом ВЭЖХ на хроматографе отечественного производства является актуальной задачей

Спектрофотометрия – один из надёжных и распространенных физико-химических методов, применяемых для количественного анализа. Данный метод имеет множество достоинств и является доступным для многих лабораторий. Высокая чувствительность, воспроизводимость, доступность, экспрессность, низкая токсичность реагентов и простота методик анализа делают данный метод перспективным для исследования фторсодержащих препаратов. Однако его применение для анализа субстанций и лекарственных форм ограничено из-за отсутствия государственных стандартных образцов (ГСО). Поиск оптических образцов сравнения, которые могут заменить ГСО, и разработка методик с их

применением позволит проводить оценку качества указанных препаратов и их субстанций и сделает применение спектрофотометрического метода более доступным.

Так как для диагностики интоксикации исследуемыми лекарственными веществами большое значение имеют результаты химико-токсикологического исследования, а в литературе практически отсутствует информация о нем для офлоксацина, линезолида и эфавиренза, необходимо разработать методики изолирования, обнаружения и количественного определения данных лекарственных веществ из биологических объектов. Полученные данные имеют большое значение и могут быть рекомендованы для химико-токсикологического и судебно-химического анализа исследуемых лекарственных веществ.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования является совершенствование методов стандартизации и химико-токсикологического анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Определить условия и разработать унифицированные методики количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в субстанциях и таблетках, покрытых оболочкой, спектрофотометрическим методом с использованием оптических образцов сравнения и ВЭЖХ на отечественном микроколоночном хроматографе, предложить проекты изменений фармакопейных статей предприятия (ФСП).

2. Обосновать условия экстракции (органический растворитель, pH среды, электролит, время и кратность экстракции) офлоксацина, линезолида и эфавиренза из растворов и разработать методики изолирования исследуемых веществ из модельных образцов мочи.

3. Оптимизировать условия разделения и идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенобарбиталом в

извлечениях из модельных образцов мочи методом тонкослойной хроматографии (ТСХ); разработать методики их обнаружения при их совместном присутствии.

4. Обосновать условия разделения и идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенобарбиталом в извлечениях из модельных образцов мочи методом ВЭЖХ; разработать методики их обнаружения при совместном присутствии.

Научная новизна работы. В рамках проведенного исследования впервые теоретически обоснованы и экспериментально установлены оптимальные условия (растворитель, аналитическая длина волн, pH среды, уравнение градуировочного графика, оптический образец сравнения) анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в субстанциях и таблетках, покрытых оболочкой, спектрофотометрическим методом с применением оптических образцов сравнения, которые позволяют повысить точность и воспроизводимость анализа.

Предложены оптимальные унифицированные условия количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в таблетках, покрытых оболочкой, и в сочетаниях с лекарственными препаратами других фармакологических групп в извлечениях из модельных образцов мочи методом ВЭЖХ с использованием отечественного микроколоночного жидкостного хроматографа с ультрафиолетовым спектрофотометрическим детектором: хроматографическая колонка (75×2 мм), неподвижная фаза: полимерный сорбент ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (pH 2,8); элюент Б – ацетонитрил. Градиентный режим элюирования: 550 мкл 27% Б; 550 мкл от 27% до 100% Б; 900 мкл 100% Б (0-14 мин). Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°C.

Установлено влияние различных факторов на изолирование офлоксацина, линезолида и эфавиренза из модельных образцов мочи методом жидкость - жидкостной экстракции (ЖЖЭ). Для экстракции офлоксацина из растворов оптимальными органическими растворителями являются хлороформ и

дихлорметан, которые проявляют максимальную извлекающую способность при pH 6 в присутствии аммония сульфата насыщенного раствора. Наилучшие результаты достигнуты при двукратном экстрагировании хлороформом и трёхкратном экстрагировании дихлорметаном в течение трех мин. При добавлении аммония сульфата насыщенного раствора этилацетат извлекает в максимальном количестве линезолид при pH 5, а дихлорметан при pH 4 соответственно. Наибольший выход линезолида достигается при двукратном экстрагировании этилацетатом в течение 7 мин и дихлорметаном в течение 5 мин. Эфир диэтиловый и дихлорметан являются оптимальными органическими растворителями и экстрагируют эфавиренз в максимальном количестве при pH 3 и 2 соответственно. Натрия хлорида насыщенный раствор улучшает экстрагируемость извлекаемого вещества при применении в качестве органического растворителя дихлорметана, а добавление натрия хлорида раствора 20% приводит к повышению количества эфавиренза при применении эфира диэтилового. Максимальная экстракция эфавиренза достигается при трехкратном экстрагировании эфиром диэтиловым в течение 3 мин и дихлорметаном - в течение 7 мин.

Аргументирован выбор оптимальных систем растворителей: этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1,5) для разделения и идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в извлечениях из модельных образцов мочи методом ТСХ как самостоятельно, так и в сочетании с лекарственными препаратами других фармакологических групп, наиболее часто назначаемыми совместно.

Таким образом, разработанные новые методики изолирования, обнаружения и количественного определения указанных фторсодержащих лекарственных средств методами экстракции, УФ-спектрофотометрии, ТСХ и ВЭЖХ позволяют усовершенствовать контроль их качества.

Практическая значимость. По результатам исследований представлено: 12 методик количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в субстанциях и таблетках, покрытых оболочкой, спектрофотометрическим

методом с использованием в качестве оптических образцов сравнения калия феррицианида и калия хромата; 3 методики количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в таблетках, покрытых оболочкой, методом ВЭЖХ; 3 методики изолирования офлоксацина, линезолида и эфавиренза из модельных образцов мочи методом ЖЖЭ; методики качественного определения комбинированных сочетаний офлоксацина, линезолида и эфавиренза с амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом в извлечениях из модельных образцов мочи методами ТСХ и ВЭЖХ. Разработаны методические рекомендации «Методика судебно-химического анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в моче» и «Методика химико-токсикологического и судебно - химического анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в вещественных доказательствах небиологического происхождения».

Степень внедрения. Разработанные методики апробированы и внедрены в практику работы судебно-химического отделения ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы» (г. Иркутск), ГБУЗ «Республикансое бюро судебно-медицинской экспертизы» республики Бурятия (г. Улан-Удэ), в учебный процесс кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ. Получено 20 актов аprobации и внедрения разработанных методик. Получен Патент РФ на изобретение «Способ определения и обнаружения в моче фторсодержащих лекарственных средств в комбинированных сочетаниях». Разработанные методические рекомендации «Методика судебно-химического анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в моче» и «Методика химико-токсикологического и судебно - химического анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в вещественных доказательствах небиологического происхождения» утверждены Российским центром судебно-медицинской экспертизы МЗ РФ (протокол № 2 от 18 июня 2019 г.). Предложены проекты изменений ФСП на исследуемые лекарственные средства.

Положения, выносимые на защиту:

- обоснование оптимальных условий и разработка методик количественного анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза спектрофотометрическим методом по оптическим образцам сравнения;
- результаты исследований по разработке методик качественного и количественного анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в таблетках, покрытых оболочкой, методом ВЭЖХ и их валидационная оценка;
- оптимальные условия экстракции офлоксацина, линезолида и эфавиренза из растворов: в зависимости от pH среды, используемого органического растворителя, электролитов, времени и кратности экстракции, и разработка методик изолирования офлоксацина, линезолида и эфавиренза из модельных образцов мочи;
- разработка условий разделения и идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в комбинированных сочетаниях с амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенобарбиталом в извлечениях из модельных образцов мочи методами ТСХ и ВЭЖХ.

Личный вклад автора. В ходе исследования автор диссертационной работы провел поиск и анализ зарубежных и отечественных источников литературы по теме диссертации. Автору принадлежит ведущая роль в планировании и проведении экспериментальных исследований, обобщении полученных данных, проведении статистической обработки результатов, разработке и валидации методик, написании публикаций и проектов изменений ФСП. Согласно сформулированным задачам 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 и 4 паспорта специальности.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Исследования проведены 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 соответствуют направлению проблемной комиссии по фармации и фармакологии.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были доложены и обсуждены на: 84-й, 85-й и 86-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 2017, 2018, 2019 г.г.); III Всероссийской 14-й межрегиональной с международным участием научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем медицины» (Нижний Новгород, 2017 г.); V Всероссийской научно-практической конференции «Беликовские чтения» (Пятигорск, 2017 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Иновационные технологии в фармации» (Иркутск, 2018, 2019 г.г.); XXII Международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования» (Москва, 2019 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 20 научных работ, из них 4 – в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, и получен 1 патент на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 187 страницах компьютерного текста и иллюстрирована 68 таблицами и 44 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (главы 2-5), общих выводов, списка литературы, приложения. Список литературы содержит 148 источников, из них – 30 отечественных и 118 зарубежных. В приложении представлены материалы по внедрению и апробации разработанных методик.

ГЛАВА 1. МЕТОДЫ АНАЛИЗА ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Проведенный поиск методов анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза среди отечественных и зарубежных источников показал, что встречается крайне мало работ по анализу данных лекарственных веществ у российских ученых. Однако имеется достаточно обширная база данных по исследуемой теме диссертации в статьях зарубежных авторов, в которых встречается большое разнообразие методов и методик для анализа офлоксацина. Методики исследования офлоксацина включают в себя титриметрические, электрохимические и физико-химические методы, в то время как отсутствуют данные о титриметрических методах анализа линезолида и эфавиренза, а сведения об использовании в анализе указанных фторсодержащих препаратов электрохимических методов описаны только в работах зарубежных авторов. Для исследования данных лекарственных веществ предлагается использование только физико-химических методов. Спектрофотометрические и хроматографические методы являются ведущими в анализе исследуемых веществ. Реже авторами представлены электрохимические и другие методы анализов.

В данной главе рассмотрены имеющиеся методы анализа, их отличительные особенности, достоинства и недостатки.

1.1. Общая характеристика и методы анализа офлоксацина

Офлоксацин по химическому строению представляет собой соединение трициклической структуры, которое было получено путем циклизации базовой структуры хинолона по положениям 1 и 8 бензоксазиновым циклом. Такая структура молекулы обеспечивает устойчивость к трансформации в организме, что позволяет длительно циркулировать в организме. Атом фтора в молекуле офлоксацина находится в положении 9, что соответствует положению 6 во фрагменте хинолона. Все важные для проявления высокой активности группировки (метилпиперазинильный радикал, карбоксильная и кето-группы) в структуре офлоксацина сохранены. Офлоксацин – рацемат. В состав

рацемической смеси двух оптически активных изомеров входят: левовращающий изомер (L-офлоксацин, S-офлоксацин) и правовращающий изомер (D-офлоксацин, R-офлоксацин) [21], но антибактериальная активность обусловлена только L-энантиомером – левофлоксацином.

Офлоксацин метаболизируется в печени (около 5%) с образованием N-оксид офлоксацина и диметиофлоксацина. Выводится почками – 75-90% (в неизмененном виде) [61], около 4% – с желчью.

Для количественного анализа субстанции офлоксацина НД предлагает метод титрования в среде уксусного ангидрида, определяя конец титрования потенциометрически (титрант – хлорной кислоты раствор 0,1 М) [20], для анализа таблеток покрытых оболочкой – метод ВЭЖХ [19], а для инфузионных растворов – УФ-спектрофотометрический метод [18]. Фармакопеи США [147] и Великобритании также предлагают использовать метод ацидиметрии в среде неводных растворителей [47] и ВЭЖХ [147] для анализа офлоксацина в субстанции и лекарственных препаратах.

Наиболее часто встречающиеся в литературе методы анализа офлоксацина в лекарственных препаратах и биологических жидкостях вынесены в таблицу 1 и более подробно описаны ниже по тексту.

Таблица 1 – Методы анализа офлоксацина

Метод	Объект анализа	Пробоподготовка	Ссылка
Титrimетрический	Лекарственный препарат	–	[20; 47; 147]
Спектрофотометрия	Лекарственный препарат	–	[18; 41; 69; 86; 103; 108; 109; 115; 116; 132, 134; 135; 136]
	Моча	–	[71]
Вольтамперометрия	Лекарственный препарат	–	[143]
	Сыворотка крови	–	[32; 127]
	Моча	–	[111]
Капиллярный электрофорез	Лекарственный препарат	–	[60; 142]
	Плазма крови	Твердофазная экстракция (ТФЭ) с применением колонки C ₁₈	[43]
	Моча	Капельная	[39]

		микроэкстракция	
ВЭЖХ: Фотометрическое	Лекарственный препарат	–	[54; 118; 147]
	Сыворотка крови	ТФЭ с помощью полимеров с молекулярными отпечатками	[130]
	Моча/сыворотка крови	ТФЭ с помощью обращенно- фазового полимерного сорбента	[94]
	Плазма крови	–	[90; 125]
Флуориметрическое	Плазма крови/моча	Депротеинизация хлорной кислотой	[81]
	Кровь	Online микродиализ	[49]
TCX	Лекарственный препарат	–	[74; 144]

Для анализа офлоксацина в статьях зарубежных авторов представлена информация о нескольких физико-химических методах. Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) [138], капиллярный электрофорез (КЭ) [60; 142], атомно-абсорбционная спектрометрия, спектрофлуориметрия [114], хемилюминесцентная спектрометрия [75; 112; 130], УФ-спектрофотометрия [41; 103; 132], инверсионная вольтамперометрия [143], потенциометрия и кондуктометрия [146], полярография [148] и микробиологический метод [87] применяются для анализа офлоксацина. Метод ВЭЖХ был использован для анализа офлоксацина в лекарственных препаратах при его наличии как самостоятельно [48; 107; 119], так и в комбинации с нитазоксанидом [83], рифампицином [118], цефиксимом [54] и другими лекарственными препаратами. Многие из вышеперечисленных методов недостаточно просты и легкодоступны.

Для определения подлинности офлоксацина авторами предложен метод УФ-спектрофотометрии. В качестве растворителя применялся кислоты хлористоводородной раствор 0,01 М, максимум поглощения при этом составлял 294 нм [25].

Широко используемым методом для анализа офлоксацина является спектрофотометрия в видимой области спектра с образованием цветных

комплексов, основанная на различных химических реакциях, однако большинство из имеющихся методов имеют один или несколько недостатков. Так, для проведения реакции окислительной димеризации с помощью Ce (IV)-3-метил-2-бензотиазолинон гидразон гидрохлорид моногидрат [116] применяются дорогостоящие реагенты, для реакции конденсации лимонной кислоты с уксусным ангидридом [136] требуется кипячение в течение 20 мин, для реакции комплексообразования с $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ [69] рекомендуется применение буферных растворов, реакция конденсации с FeCl_3 в хлористоводородной кислоте растворе [135] характеризуется низкой чувствительностью, реакция комплексообразования с тропеолином 000 и супраценовым фиолетовым ЗБ [115] или бромфеноловым синим, бромтимоловым синим и бромкрезоловым пурпурным [134] требует тщательного контроля pH и проведения экстракции.

Для определения количественного содержания оффлоксацина спектрофотометрическим методом в пробах мочи в качестве аналитических форм El-brashy A.M., Metwally M.E., El-sepai F.A. применяли его ион-парные ассоциаты с ксантеновыми красителями – мербромином и эозином Y [71]. В среде ацетатного буферного раствора (pH 3) длины волн в максимуме светопоглощения равнялись 545 и 547 нм соответственно.

В статье [109] авторами описан титриметрический и спектрофотометрический метод определения оффлоксацина в субстанции и в таблетках с использованием N-бромсукциниамида в качестве аналитического реагента. Предлагаемые методы включают добавление определенного избытка N-бромсукциниамида к оффлоксацину в кислой среде с последующим определением непрореагировавшего N-бромсукциниамида. В титриметрии непрореагировавший N-бромсукциниид определяется йодометрически, а в спектрофотометрии – путем реакции с фиксированным количеством либо индигокармина (метод А), либо метанила желтого (метод Б).

В работе [86] было предложено два спектрофотометрических метода определения оффлоксацина, основанные на взаимодействии с сульфонфталиеновыми красителями: бромкрезоловым фиолетовым (метод А) и

бромкрезоловым зеленым (метод Б) в среде дихлорметана. Сформированные пары ионов не требуют никакой стадии экстракции и измеряются непосредственно в дихлорметане.

Авторами Ragab G.H. и Amin A.S. разработаны три атомно-абсорбционных спектрометрических, кондуктометрических и колориметрических метода количественного анализа офлоксацина в лекарственных формах. Предложенные методики основываются на образовании стабильных ион-парных комплексов офлоксацина с аммония реникатом, окрашенных в розовый цвет, растворимых в ацетоне [108].

Среди электрохимических методов для определения содержания офлоксацина применение нашли вольтамперометрические. Данные методы не требуют проведения экстракции. В методе дифференциальной импульсной вольтамперометрии используется углеродный пастовый электрод (УПЭ). УПЭ в своей структуре содержит иммобилизованные группы, на поверхности которого происходит восстановление или окисление офлоксацина. Для определения офлоксацина в сыворотке крови Zhang F. с соавторами применяют УПЭ, модифицированный L-цистеиновой кислотой [127] или полимером бета-циклодекстрином и L-аргинина [32]. Для увеличения сигнала измерения в случае модификации поверхности цистеиновой кислотой анализ проводили в присутствии додецилбензольсульфоната натрия.

Reddy T.M., Balaji K., Reddy S.J. в своей работе предлагают использовать УПЭ, модифицированный бета-циклодекстрином, для контроля концентрации офлоксацина в моче в варианте инверсионной дифференциально-импульсной вольтамперометрии [111].

Для определения концентрации офлоксацина при анализе проб мочи и плазмы крови находит применение КЭ. Gao W. с соавторами сочетали проведение КЭ с фотометрическим детектированием и капельной микроэкстракции [39], или ТФЭ с применением колонки C18 [44].

Для определения офлоксацина в сыворотке крови методом ВЭЖХ анализ проводится с применением ТФЭ с использованием полимеров с молекулярными

отпечатками [83] или обращенно-фазового полимерного сорбента, применяемого также при анализе офлоксацина в моче [94]. В других случаях [90; 125] пробу плазмы крови центрифигируют, отделяют надосадочную жидкость и разбавляют.

Метод ВЭЖХ для количественного определения офлоксацина в плазме крови и моче включал депротеинизацию пробы хлорной кислотой. Анализ супернатанта проводился с использованием реверсивно-фазовой колонки C18 и флуориметрической детекции при длине волны возбуждения 290 нм и длине волны излучения 460 нм [81].

Авторами Purvi Shah, Mukesh Gohel и Vaishali Thakkar был разработан и аprobирован метод ВЭЖХ для одновременного определения рифампицина и офлоксацина в изократическом режиме элюирования, используя детектор SPD-M20APDA. Хроматографическое разделение проводили на установке Kinetex C₁₈, 100 колонка Phenomenex со смесью 0,03 М калия дигидрофосфатного буферного раствора pH 3,0 и ацетонитрила (55:45) в качестве подвижной фазы при 230 нм. Время удерживания составило 2,91 и 4,87 мин для офлоксацина и рифампицина соответственно [118].

Pranaykumar Deekonda и Malladi Srinivas Reddy предложили метод обращенно-фазовой ВЭЖХ для количественной оценки цефиксими и офлоксацина в лекарственном препарате. Хроматографическое разделение было достигнуто при использовании аналитической колонки Kromasil C18 (250×4,6 мм с размером частиц 5 мкм) с подвижной фазой, состоящей из смеси аммоний-ацетатный буферный раствор – ацетонитрил (40:60), скорость потока составила 1,0 мл/мин при длине волны 294 нм. Времена удерживания цефиксими и офлоксацина – 2,26 мин и 3,24 мин соответственно [54].

Для одновременного определения содержания офлоксацина и малонового диальдегида в крови был использован online микродиализ, с помощью которого были отделены высокомолекулярные соединения, с последующим анализом с применением ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием [49].

Метод TCX Yu-Lin и Chuan Dong использовали для определения офлоксацина в комбинации с ципрофлоксацином и спарфлоксацином.

Установлено, что оптимальное соотношение додецилсульфата натрия к этилендиаминетрауксусной кислоте составляет 0,01:0,1. Разделение офлоксацина, ципрофлоксацина и спарфлоксацина проводилось на полиамидной хроматографической пластинке, значения R_f равны 0,72, 0,55 и 0,32 соответственно. Пятна флуоресценции сканируются спектроденситометром при длине волны 282 нм [74].

Известен хроматографический способ стереоселективного разделения рацемических смесей зопиклона и офлоксацина и определения их энантиомеров: эзопиклона, (+)-(S)-Зопиклона и левофлоксацина, (-)-(S)-офлоксацина методом ТСХ. Подвижной фазой, обеспечивающей успешное разделение препаратов, была: этанол – ацетонитрил – уксусная кислота ледяная – диэтиламин – вода дистиллированная, содержащая 0,5% гидроксипропил-бета-циклодекстрин в качестве хиральной добавки подвижной фазы (4:2:3:1:1) при pH 4 для зопиклона и этанол – ацетонитрил – уксусная кислота ледяная – диэтиламин – вода дистиллированная, содержащая 0,3% гидроксипропил-бета-циклодекстрин (4:4:3:2:1 по объему) при pH 4,5 для офлоксацина. Пятна были обнаружены под ультрафиолетовой лампой при 254 нм, после чего были проведены денситометрические измерения при 304 и 330 нм для (+)-(S)-зопиклона и (-)-(S)-офлоксацина соответственно [144].

1.2. Общая характеристика и методы анализа линезолида

Линезолид – это первый представитель нового класса антибиотиков оксазолидинонов [92], применяемый в медицинской практике для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний.

В своей структуре линезолид содержит класс-специфическую химическую группу – 3-(3-фторфенил)-оксазолидиноновое кольцо (кольцо А), наличие которого определяет принадлежность препарата к классу оксазолидинонов. Также линезолид имеют боковую цепь у С-5 кольца А – ацетамидную группу, что обеспечивает активность в отношении грамм (+) бактерий [2].

Линезолид обладает хорошим фармакинетическим профилем [45; 67; 95; 102]. В крови находится преимущественно в неизмененном виде (90%). Метаболическое окисление линезолида приводит к образованию 2 неактивных метаболитов: гидроксиэтилглицина (является основным метаболитом человека и образуется в результате неферментативного процесса) и аминоэтоксикусной кислоты (образуется в меньших количествах) [3]. Описаны также другие «малые» метаболиты. Линезолид выводится почками в виде гидроксиэтилглицина (40%), неизмененного препарата (30-35%) и аминоэтоксикусной кислоты (10%). Через кишечник выделяется в виде гидроксиэтилглицина (6%) и аминоэтоксикусной кислоты (3%).

Для количественного анализа линезолида в литературных источниках встречаются такие методы как ВЭТСХ [139], ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием [123], ВЭЖХ с УФ-детектированием [2; 31; 43; 51; 58; 59; 95; 99], хиральная ВЭЖХ [35], жидкостная хроматография с масс-спектрометрией [105], КЭ [85; 96] и другие методы (табл. 2).

Количественный анализ линезолида обычно проводится методом ВЭЖХ и спектрофотометрии [51; 66; 93; 95; 99; 100]. Известно также определение линезолида методом КЭ. Спектр применения КЭ аналогичен ВЭЖХ и его преимущества включают в себя значительно короткие сроки анализа, использование водных растворителей, высокое разрешение и специфичность [89]. Наиболее распространёнными вариантами метода КЭ являются: капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) и мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ) [28].

Таблица 2 – Методы анализа линезолида

Метод	Объект анализа	Пробоподготовка	Ссылка
Спектрофотометрия	Лекарственный препарат	–	[66; 93; 100; 117]
Спектрофлуориметрия	Лекарственный препарат	–	[133]
Вольтамперометрия	Лекарственный препарат	–	[38]
Капиллярный электрофорез	Лекарственный препарат	–	[96]

	Сыворотка крови	Депротеинизация ацетонитрилом	[85]
ВЭЖХ: Фотометрическое детектирование	Сыворотка крови	Осаждение белков метанолом	[51; 95]
	Плазма крови	Осаждение белков метанолом	[99]
	Лекарственный препарат	—	[59]
	Сыворотка крови/ моча	—	[31]
	Сыворотка крови/ моча	Осаждение сывороточных белков перхлорной кислотой	[43]
	Грудное молоко	Осаждение белков метанолом	[58]
Флуориметрическое детектирование	Плазма крови	Осаждение белков ацетонитрилом	[123]
ВЭТСХ	Лекарственный препарат	—	[139]
TCX	Лекарственный препарат	—	[40]
Жидкостная хроматография/МС-МС	Плазма крови	ТФЭ	[105]

МЭКХ была использована для того, чтобы определить линезолид в образцах сыворотки крови [85]. В качестве рабочего буфера авторы использовали 25 мМ боратный буферный раствор (рН 10,0), содержащий 80 мМ додецилсульфата натрия. Они сравнили КЗЭ и МЭКХ и пришли к выводу, что МЭКХ позволяет отделить линезолид со временем удерживания 14 мин. Усовершенствование метода было опубликовано теми же авторами в 2004 году [84], понизив рН боратного буферного раствора (рН 8,0) и концентрацию додецилсульфата натрия (50 мМ). Было добавлено 7 М мочевины в качестве добавки для увеличения растворения линезолида в рабочем буфере. Преимущества включали прямое введение сыворотки крови без предварительной обработки и меньшее время удерживания (5,5 мин).

Разделение линезолида от его ахиральных примесей методом КЭ было выполнено с использованием предварительного концентрирования с

последующим УФ-абсорбционным детектированием при 254 нм. Наилучшие результаты были получены при использовании 125 мМ Трис-буфера при рН 2,0 с добавлением метанола 20% в качестве фонового электролита и додецилсульфата натрия. Разделение осуществлялось при отрицательной полярности [96].

В работе Daniele Merli, Luca Pretali, Elisa Fasani, Angelo Albini, Antonella Profumo был предложен дифференциальный импульсный вольтамперометрический метод, основанный на окислении линезолида на стеклоуглеродном электроде. Электрохимический процесс был изучен с использованием различных электрохимических методов и подтвержден ВЭЖХ-МС/МС [38].

В работе Cios A., Kuś K., Szymura-Oleksiak J. разработан метод ВЭЖХ с УФ- и диодно-матричной детекцией для количественного определения линезолида в сыворотке крови. Хроматографирование проводили в обращенно-фазовом варианте на колонке RP-18 с подвижной фазой, состоящей из 50 мМ фосфатного буферного раствора и ацетонитрила (74:26), скорректированного до рН 3,5 ортофосфорной кислотой. Образцы сыворотки крови депротеинизировали метанолом, центрифугировали, а затем супернатант анализировали с помощью метода ВЭЖХ [51].

Для количественного определения линезолида в таблетированных и инъекционных лекарственных формах авторами Patel S.A., Patel P.U., Patel N.J., Patel M.M., Bangoruya U.V. были разработаны и апробированы методы жидкостной хроматографии и УФ-спектрофотометрический. Анализ методом жидкостной хроматографии в варианте изократического элюирования проводили на колонке RP-18 с использованием подвижной фазы, состоящей из метанол – вода очищенная – ацетонитрил (40:40:20), скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин. УФ-спектрофотометрическое определение проводили при длине волны 251 нм [59].

Rink R. Mali, Dr. A.P. Gorle для проведения анализа линезолида в субстанции и таблетках готовили стандартный раствор растворением 10 мг линезолида в 100 мл фосфатного буферного раствора рН 7,4 до концентрации 100

мкг/мл. Затем методом разведения готовили раствор с концентрацией 10 мкг/мл и сканировали в УФ-диапазоне 200-400 нм. Максимум поглощения наблюдался при 251 нм [93].

Исследование авторов Naik A.D., Pai S.P.N. описывает спектрофотометрический метод определения линезолида в субстанции и таблетках. Метод основан на окислении линезолида железа цитратом в присутствии 1,10-фенантролина с образованием комплекса красновато-оранжеватого цвета. Измерение проводилось при 510 нм [100].

K.V.V. Satyanarayana и P. Nageswara Rao описали три спектрофотометрических метода, разработанных для определения линезолида в субстанции и таблетках. Эти методы основаны на окислении линезолида железа хлоридом в присутствии 1,10-фенантролина (метод А) 2,2'-бипиридила (метод Б), или калия феррицианида (метод С) с образованием цветных комплексов. Оптическую плотность растворов измеряли при 510, 522 и 758 нм для А, В и С методов соответственно [117].

Для количественного определения линезолида в субстанции и лекарственных препаратах УФ-спектрофотометрическим методом в качестве растворителя использовался метанол 20%, аналитическая длина волны – 251 нм [66].

Bebawy L.I. представил способ определения линезолида в субстанции и таблетках в присутствии его продуктов щелочной деструкции. Метод основан на разделении линезолида от его продуктов щелочной деструкции методом ТСХ с последующим денситометрическим измерением пятен при 244 нм. Разделение проводили на силикагеле 60 F (254), используя изобутанол – аммиак (9:1) в качестве подвижной фазы [40].

Описан ВЭЖХ-анализ для определения линезолида в сыворотке крови и моче. ВЭЖХ-интегрированная пробоподготовка позволяет напрямую вводить образцы сыворотки крови и мочи без какой-либо предварительной обработки. Линейный метод экстракции реализуется путем автоматического переключения из экстракционной колонны в аналитическую колонку. После того, как матрица

пройдет экстракционную колонну, оставшийся аналит будет количественно перенесен в аналитическую колонку, где будет проведено разделение методом ВЭЖХ в режиме изократического элюирования. Линезолид детектируется по максимуму поглощения при 260 нм. Описанный процесс позволяет очистить образец и определить антибиотик в течение 20 мин [31].

Borner K., Borner E., Lode H. описали метод ВЭЖХ для определения линезолида в биожидкостях человека. После осаждения сывороточных белков перхлорной кислотой, свободный от белка супернатант отделяли методом обращенно-фазовой хроматографии в режиме изократического элюирования на колонке Nucleosil-100 5C18 при 250 нм. Подвижная фаза состояла из смеси ацетонитрил – натрий-ацетатный буферный раствор – вода очищенная (180:100:720), доведенной до pH 3,7. Мочу разбавляли водным буферным раствором [43].

Известен метод ВЭЖХ для определения линезолида в грудном молоке после осаждения белка метанолом. Хроматографическое разделение проводили на колонке C18 ($250 \times 4,6$ мм с размером частиц 5 мкм) с использованием подвижной фазы ацетонитрил – 10 мМ уксусной кислоты раствор (25:75) при скорости потока 1 мл/мин и длине волны 250 нм [58].

Mohammed S.A., Eissa M.S., Ahmed H.M. для количественного определения линезолида в плазме крови использовали в качестве внутреннего стандарта гвайфенезин. Аналит и внутренний стандарт были извлечены из плазмы методом экстракции белка с использованием метанола в качестве осаждающего растворителя. Предварительно обработанные образцы вводили в подвижную фазу, состоящую из смеси ацетонитрил – вода очищенная – метанол (20:70:10) в изократическом режиме элюирования со скоростью потока 1,5 мл/мин с УФ-детекцией при 251 нм. Разделение было выполнено с использованием Agilent ODSC 18 [99].

Belal F., El-Din M.K., Eid M.I., El-Gamal R.M. разработали спектрофлуориметрический метод определения тербинафина гидрохлорида и линезолида в лекарственных препаратах. Предлагаемый способ основан на

измерении флуоресценции исследуемых препаратов в водном растворе при длине волны 336 нм после возбуждения при 275 нм для тербинафина и 375 нм после возбуждения при 254 нм для линезолида [133].

Метод ВЭТСХ применяется для количественного анализа линезолида как в субстанции, так и в лекарственных формах. В этом методе в качестве стационарной фазы использовали алюминиевые пластиинки, покрытые силикагелем 60F-254. Система растворителей состояла из толуол – ацетон (5:5). R_f линезолида при использовании данной системы равнялся $0,29+/-0,01$. Линезолид подвергали кислотному, щелочному гидролизу, окислению и фотодеградации. Разрушенные продукты также были хорошо отделены от чистого препарата. Денситометрический анализ линезолида проводили в режиме поглощения при 254 нм [139].

Phillips O.A., Abdel-Hamid M.E. и al-Hassawi N.A. разработали метод жидкостной хроматографии в совокупности с масс-спектрометрией для определения линезолида в плазме крови с использованием метода мониторинга выбранных реакций. Линезолид и внутренний стандарт были извлечены из биологических образцов методом ТФЭ и проанализированы на колонке CLC-CN C18 с подвижной фазой ацетонитрил – 20 мМ аммония ацетата раствор (4:1) в обращенно-фазовом варианте. Детектирование проводили с помощью масс-спектрометра LCQ (Finnigan), оснащенного системой химической ионизации при атмосферном давлении и запрограммированного в режиме положительной МС/МС для измерения фрагментов ионов линезолида и внутреннего стандарта при m/z 296,2 и 223,2 соответственно. Время выполнения анализа составило менее 3,5 мин. Количественный анализ проводился на основе отношения площади пика линезолида к внутреннему стандарту [105].

1.3. Общая характеристика и методы анализа эфавиренза

По химической структуре эфавиренз относится к производным бензоксазина. Обладает слабыми кислотными свойствами и характеризуется гидрофобностью за счёт наличия трёх атомов фтора и других фрагментов структуры. Эфавиренз

метаболизируется главным образом системой цитохрома P450 до гидроксилированных производных, которые затем связываются с глюкуроновой кислотой с образованием глюкуронидов. Токсичное воздействие на центральную нервную систему обусловлено влиянием на нейроны его основного метаболита – 8-гидрокси-эфавиренз [53]. Приблизительно 14-34% от принятой дозы эфавиренза выводится почками, менее 1% дозы эфавиренза выводится почками в неизмененном виде.

Для анализа эфавиренза в литературных источниках встречаются такие методы, как ВЭЖХ с УФ-детекцией [34; 37; 50; 56; 63; 64; 77; 78; 79; 98; 106; 113; 120; 121; 122; 124; 126; 129], ВЭЖХ-МС/МС [62; 80; 128; 131], ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией [57], КЭ [104] и другие (табл. 3).

Таблица 3 – Методы анализа эфавиренза

Метод	Объект анализа	Пробоподготовка	Ссылка
Спектрофотометрия	Лекарственный препарат	–	[110; 137]
	Лекарственный препарат /моча	–	[140]
Вольтамперометрия	Лекарственный препарат	–	[55]
Капиллярный электрофорез	Сыворотка крови	ТФЭ	[104]
ВЭЖХ: Фотометрическое детектирование	Сыворотка крови	–	[68]
	Плазма крови	Осаждение белков этилацетатом/ ацетонитрилом/ ЖЖЭ диэтиловым эфиром после подщелачивания	[65; 79; 98; 106]
Флуориметрическое детектирование	Плазма крови	Экстракция гексан-метиленхлоридом	[57]
ВЭЖХ-МС/МС	Плазма крови	Осаждение белков смесью подвижной фазы/ЖЖЭ	[33; 42]
	Сыворотка крови	ТФЭ	[73]
	Слюна	ТФЭ	[62]
ВЭТСХ	Лекарственный препарат	–	[101]

Методы ВЭЖХ с УФ-детекцией направлены на одновременное количественное определение нескольких лекарственных средств, но имеют ограниченную селективность и чувствительность. Это требует относительно длительного времени анализа и большого объема выборки. Напротив, методы ВЭЖХ-МС/МС предпочтительны из-за более короткого времени выполнения анализа, а также высокой селективности и чувствительности. Различные методы пробоподготовки, такие как ЖЖЭ [50; 122; 129], ТФЭ [56; 63; 113; 121; 124] и осаждение белка с последующим разбавлением [122] были использованы для извлечения эфавиренза из плазмы крови в сочетании с упариванием экстракта досуха с последующим восстановлением. Кроме того, необходима сложная настройка аппаратуры, состоящая из комбинации двух систем ВЭЖХ.

Mogatle S. и Kanfer I. для разработки количественного метода анализа эфавиренза в плазме крови предложили следующие условия: подвижная фаза, состоящая из муравьиной кислоты раствора 0,1 М, ацетонитрила и метанола (43:52:5), движущаяся со скоростью 0,3 мл/мин через колонку Phenomenex Luna C (18) (2), заполненную обращенной фазой (150×2 мм с размером частиц 5 мкм), при 40°C. Натрия диклофенак был использован как внутренний стандарт и был детектирован с эфавирензом при 247 нм и 275 нм соответственно. Пробоподготовка включала добавление подвижной фазы к 100 мкл плазмы крови для осаждения белков с последующим непосредственным введением 10 мкл супернатанта в колонку [98].

Для определения эфавиренза в плазме крови авторами Shweta Gupta, Rajesh Kesarla, Narendra Chotai и Abdelwahab Omri был разработан метод обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования. Метод был разработан с использованием хроматографической колонки Waters X-Terra Shield, RP18 (50×4,6 мм с размером частиц 3,5 мкм) и подвижной фазы, состоящей из фосфатного буферного раствора pH 3,5 и ацетонитрила (30:70). Элюат детектировали с помощью УФ-детектора при 260 нм со скоростью потока подвижной фазы 1,5 мл/мин. В качестве внутреннего стандарта использовался тенофовир дисопроксил фумарат. Пробоподготовка, в отличие от ранее представленного метода, состояла

в добавлении к плазме крови этилацетата с последующим центрифугированием. Органическую фазу выпаривали путем продувки азотом. Твердый остаток восстанавливали 100 мкл подвижной фазы и вводили в колонку в объеме 20 мкл. Время удерживания эфавиренза и тенофовира дисопроксил фумарата составило 5,941 мин и 4,356 мин соответственно [65].

В методике, представленной в статье Veldkamp A.I., предварительная обработка образца плазмы крови проводилась путем осаждения белка ацетонитрилом и последующего упаривания экстракта для концентрирования аналита. Препарат отделяют от эндогенных соединений методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования с УФ-детектированием при 246 нм [106].

Определение эфавиренза в плазме крови методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детекцией отличается применением для ЖЖЭ эфира диэтилового после подщелачивания. Подвижная фаза представляла собой смесь ацетонитрила и воды очищенной, движущуюся со скоростью 1,2 мл/мин. УФ-детектирование проводилось при длине волны 247 нм. Время удерживания для эфавиренза и внутреннего стандарта были 5,3 и 4,5 мин соответственно [79].

В методике количественного определения эфавиренза в плазме крови методом ВЭЖХ анализ и внутренний стандарт дулоксетин экстрагировали из плазмы крови методом ЖЖЭ, затем разделяли на колонке BDS hyperersil C18 (150×4,6 мм с размером частиц 5 мкм), заполненной обращенной фазой, с использованием подвижной фазы, состоящей из ацетонитрила и 50 мМ натрия дигидроортофосфата раствора pH 5,5 (48:52) при температуре колонки 30°C. Скорость потока – 0,8 мл/мин. Детектирование проводилось с применением масс-спектрометра, оснащенного системой электрораспылительной ионизации [42].

Селективный и высокочувствительный метод определения эфавиренза был разработан с применением метода ВЭЖХ в tandemе с масс-спектрометрией в режиме отрицательной ионизации с многократным мониторингом реакции. Пробоподготовка образца включала осаждение белка ацетонитрилом с последующим разбавлением водой очищенной один к одному. Эфавиренз и 13

Cб-эфавиренз (внутренний стандарт) были обнаружены с помощью следующих переходов: m/z 314.20243.90 и m/z 320.20249.90 соответственно. В качестве растворителей для подвижной фазы использовали муравьиной кислоты раствор 0,1% в воде очищенной и муравьиной кислоты раствор 0,1% в ацетонитриле при скорости потока 0,3 мл/мин. Общее время анализа составляло 5 мин, а время удерживания для внутреннего стандарта и эфавиренза составило приблизительно 2,6 мин [33].

Метод обращенно-фазовой ВЭЖХ с диодным детектором применялся для одновременного определения абакавира, эфавиренза и валганцикловира в сыворотке крови. Разделение проводилось на колонке Waters Spherisorb (250×4,6 мм с размером частиц 5 мкм) в изократическом режиме элюирования, используя в качестве подвижной фазы смесь ацетонитрил – метанол – калия дигидроортофосфат (40:20:40) при pH 5,0 и скорости потока 1,0 мл/мин [68].

В работе [57] описан метод ВЭЖХ с флуориметрической детекцией количественного определения эфавиренза в плазме крови и качественной оценки стереохимической целостности эфавиренза в образцах плазмы крови. После добавления внутреннего стандарта образцы плазмы крови экстрагировали смесью растворителей гексан – метиленхлорид (65:35). Экстракты выпаривали досуха и восстанавливали в подвижной фазе. Обращенно-фазовую хроматографию использовали для количественного анализа, тогда как хроматографию с колонкой, содержащей хиральную стационарную фазу (динитробензоиллейцин), использовали для стереохимической оценки.

В работе Pereira E.A., Micke G.A., Tavares M.F. представлен метод КЭ для одновременного разделения некоторых антиретровирусных препаратов, в том числе эфавиренза. Анализы были выполнены с применением капилляра из плавленого кварца длиной 48,5 см (эффективная длина 40 см) с использованием проточного буфера, состоящего из 20 mM натрия додецилсульфата раствора, 10 mM натрия тетрабората раствора, ацетонитрила 30% и этанола 5%. Образцы вводили гидродинамически, применяя давление 50 мБар в течение 6 с. Все анализируемые вещества были разделены в течение 10 мин при напряжении 20

кВ. Пробоподготовка образцов сыворотки крови проводилась методом ТФЭ с применением картриджей Waters Oasis HLB. В качестве внутреннего стандарта для количественной оценки был выбран ставудин [104].

Для количественного определения эфавиренза в слюне предложен метод ВЭЖХ-МС/МС. Пробоподготовка образца слюны осуществлялась методом ТФЭ на картриджах C18. Аналиты разделяли методом ВЭЖХ (хроматографическая колонка Phenomenex Kinetex C18, внутренний диаметр 150×3 мм, размер частиц 2,6 мкм) и детектировали с помощью масс-спектрометрии в режиме электрораспылительной положительной ионизации с многократным контролем реакции. Градиентное элюирование проводилось с увеличением концентрации метанола при скорости потока 0,4 мл/мин. Общее время анализа составило 8,4 мин, время удерживания для внутреннего стандарта (резерпина) – 5,4 мин, а для эфавиренза – 6,5 мин [62].

Метод ВЭЖХ-МС/МС с ионизационным переключателем полярности был разработан и апробирован для количественного определения эфавиренза в комбинированной терапии с другими антиретровирусными препаратами в сыворотке крови с применением тройного квадрупольного масс-спектрометра в режиме многократного мониторинга реакций. Для извлечения исследуемых препаратов и внутреннего стандарта апробарбитала использовалась ТФЭ. Разделение проводилось на колонке с гексилсиланом (150×2 мм), используя в качестве подвижной фазы смесь из ацетонитрила и 20 мМ аммоний-ацетатного буферного раствора с pH, доведенным до 4,5, с использованием уксусной кислоты ледяной в режиме градиентного элюирования [73].

Спектрофотометрический метод количественного определения эфавиренза в субстанции и таблетках с использованием нафтолового реагента был предложен в работе [137]. Метод основан на реакции эфавиренза с натрия нитритом и хлористоводородной кислоты раствором с образованием N-нитрозосоединения, которое вступает в реакцию с β-нафтоловом. Измерение оптической плотности полученного раствора желтого цвета проводят при 561 нм.

УФ-спектрофотометрический метод для количественной оценки эфавиренза в субстанции и таблетках был представлен авторами M.B.R.C. Reddy и G.V.S. Gillessa B. качестве растворителя применялась смесь метанол – вода очищенная (30:70). Аналитическая длина волны – 320 нм [110].

Метод УФ-спектрофотометрии используется для количественного анализа эфавиренза в субстанции, лекарственном препарате и моче в работе [140]. В качестве оптимального растворителя применяется метанол, аналитическая длина волны – 247 нм.

Описан метод определения эфавиренза в разбавленном щелочном электролите методом катодной адсорбционной инверсионной вольтамперометрии на ртутном пленочном электроде. Оптимальными условиями эксперимента были: 2×10^{-3} моль натрия гидроксида раствор, потенциал накопления – 0,10 В, амплитуда импульса 50 мВ и частота сканирования $50 \text{ мВ} \text{ s}^{-1}$ [55].

Метод ВЭТСХ применяется для одновременного определения эфавиренза с эмтрицитабином и тенофовиром в комбинированной таблетированной форме. В качестве неподвижной фазы использовались пластинки, покрытые силикагелем 60F 254, а в качестве подвижной фазы хлороформ – метанол (90:10), дающий высокое разрешение для каждого препарата. Денситометрическую оценку каждого препарата проводили при 262 нм [101].

В ходе проведения анализа литературных источников, было установлено, что рекомендуемый НД метод оценки качества в субстанции и таблетках, покрытых оболочкой, линезолида, эфавиренза и таблеток, покрытых оболочкой, офлоксацина – ВЭЖХ. Рекомендуемый метод для оценки качества субстанции офлоксацина – ацидиметрия в среде неводных растворителей. Описание различных методик ВЭЖХ анализа часто встречается и в статьях зарубежных авторов. Каждая из рассмотренных методик отличается применением особой пробоподготовки объектов исследования или ее отсутствием, а также проведением порядка аналитической процедуры. В каждом конкретном случае

авторы предлагают использование разных колонок, подвижных фаз и детекторов. Очевидно, что эти обстоятельства приводят к необходимости каждый раз изменять параметры хроматографической системы и проводить ее калибровку, что требует высокой квалификации персонала, значительно увеличивает продолжительность всего анализа и существенно повышают стоимость анализа. Кроме того, методики количественного определения предполагают применение стандартных образцов и аппаратуры импортного производства, дорогостоящего и не всегда доступного для российских лабораторий. Следовательно, разработка унифицированных, экономичных и экспрессных методик обнаружения и количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза методом ВЭЖХ на хроматографе отечественного производства является актуальной задачей, которая была решена в данной работе. Осуществление данной цели позволит снизить расходы на проведение контроля и более широко внедрить ВЭЖХ в практику фармацевтического анализа. Так как данный метод не лишен недостатков, разработка альтернативного метода количественного анализа исследуемой группы препаратов является необходимой.

Такой оптический метод анализа как спектрофотометрия, в ряде случаев имеет существенное преимущество перед другими методами. В частности, отличается простотой методик анализа, экспрессностью, доступностью, отсутствием высокотоксичных реагентов. Его применение позволит уменьшить стоимость, токсичность и погрешность анализа, повысить воспроизводимость. Следовательно, использование спектрофотометрического метода анализа для осуществления поставленной цели является перспективным, но может быть затруднено дефицитом или малодоступностью ГСО исследуемых веществ. Производство ГСО является дорогостоящим, поэтому часто возникает необходимость применять оптические образцы сравнения, которые могут их заменить. Решение данной задачи предложено в представленной работе.

Так как в литературе практически отсутствует информация о химико-токсикологическом исследовании офлоксацина, линезолида и эфавиренза, необходимо разработать методики изолирования, обнаружения и количественного

определения данных фторсодержащих веществ как самостоятельно, так и в сочетании с лекарственными веществами различных фармакологических групп в биологических объектах и вещественных доказательствах методами экстракции, УФ-спектрофотометрии, ТСХ и ВЭЖХ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты и методы исследования

Для разработки методик идентификации, разделения и количественного определения были использованы субстанции, отвечающие требованиям НД; офлоксацин (серии: DC-0301H-1411001, YF00V140107, PH048517; АО «Фармасинтез», Россия, г. Иркутск) [14], линезолид (серии: 061405896, 06147065, 06147517; АО «Фармасинтез», Россия, г. Иркутск) [20], эфавиренз (серии: EFVB16021, EFVB16024, EFVB16027; АО «Фармасинтез», Россия, г. Иркутск) [30], дифенгидрамин (серия M150903; ООО «НПФ «КЕМ», Россия, п. Кузьмоловский), прокаин (серия 20170547; «Хубэй Максфарм Индастриз Ко., Лтд.», Китай), морфин (серия 81213; ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия, г. Москва); лекарственные формы: таблетки «Офлоксацин», покрытые оболочкой, с содержанием офлоксацина по 0,2 г (серии: 030516, 020116, 010218; ООО «Озон», Россия, г. Жигулёвск), таблетки «Амизолид», покрытые оболочкой, с содержанием линезолида по 0,2 г (серии: 150916, 120916, 140916; АО «Фармасинтез», Россия, г. Иркутск), таблетки «Регаст», покрытые оболочкой, с содержанием эфавиренза по 0,6 г (серии: 393116, 322116, 371116; АО «Фармасинтез», Россия, г. Иркутск), таблетки «Амитриптилин» с содержанием амитриптилина по 0,025 г (серия 121117; ООО «Озон», Россия, г. Жигулёвск), таблетки «Фенобарбитал» с содержанием фенобарбитала по 0,1 г (серия 171106; ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия, г. Курск), капсулы «Рифампицин» с содержанием рифампицина по 0,15 г (серия 070418; РУП «Белмедпрепараты», Республика Беларусь, г. Минск), таблетки «Мелипрамин», покрытые плёночной оболочкой, с содержанием имипрамина по 0,025 г (серия 6009N0917; ЗАО «Фармацевтический завод «ЭГИС», Венгрия, г. Будапешт).

В таблице 4 представлены описания, свойства и дозировки исследуемых лекарственных веществ, а также НД.

Таблица 4 – Исследуемые лекарственные вещества

Вещество	Описание, физические свойства	Суточная доза, мг	НД на субстанцию и лекарственные формы
Офлоксацин (\pm)-9-Фтор-2,3-дигидро-3-метил-10-(4-метил-1-пiperазинил)-7-оксо-7Н-пиридо[1,2,3,-de]-1,4-бензоксазин-6-карбоновая кислота	<p>Желтовато-белые или почти белые кристаллы или кристаллический порошок.</p> <p>Практически нерастворим в воде. Мало растворим в метаноле, хлористом метилене, умеренно растворим в хлороформе, растворим в уксусной кислоте ледяной.</p>	200-800	<p>Офлоксацин субстанция АО «Фармасинтез», Россия НД № 42-14653-07</p> <p>Офлоксацин таблетки, покрытые оболочкой, 200 мг. Фармакопейная статья предприятия АО «Фармасинтез», Россия НД № 42-14653-07</p>
Линезолид (S)-N-(3-[3-фторо-4-(морфонил-4-ил)фенил]-2-оксо-1,3-оксазолидин-5-ил)метил)ацетамид	<p>Белый или почти белый кристаллический порошок, с характерным запахом. Умеренно растворим в метаноле и ацетоне, мало растворим в воде и спирте 96%.</p>	800-1200	<p>Линезолид субстанция АО «Фармасинтез», Россия НД № 000704-120913</p> <p>Амизолид таблетки, покрытые оболочкой, 200 мг. Фармакопейная статья предприятия АО «Фармасинтез», Россия НД № 002276-111013</p>
Эфавиренз (4S)-6-хлор-4-(циклогексилэтинил)-1,4-дигидро-4-(трифторметил)-2H-3,1-бензоксазин-2-он	<p>Белый или почти белый аморфный порошок.</p> <p>Практически нерастворим в воде, легко растворим в метаноле и дихлорметане.</p>	600	<p>Эфавиренз субстанция АО «Фармасинтез», Россия НД № 000520-260313</p> <p>Регаст таблетки, покрытые оболочкой, 600 мг. Фармакопейная статья предприятия АО «Фармасинтез», Россия НД № 002554-310714</p>

В таблице 5 представлены методы исследования, предложенные НД [13; 14; 19; 20; 29; 30].

Таблица 5 – Методы исследования, предложенные НД и их недостатки

Вещество	Методы количественного определения, предложенные в НД	Недостатки предлагаемых в НД методов
Офлоксацин субстанция	Количественное определение – ацидиметрия в среде неводных растворителей [20].	<ul style="list-style-type: none"> – Метод трудоёмкий; – работа предполагает применение токсичных летучих растворителей; – необходимость иметь герметизированную титровальную установку; – во избежание погрешности, используемые реагенты должны соответствовать требованиям НД.
Офлоксацин таблетки, покрытые оболочкой	Количественное определение – ВЭЖХ [19].	<ul style="list-style-type: none"> – Метод трудоёмкий; – длительность выполнения; – применение токсичных органических растворителей, дорогостоящих реактивов и приборов;
Линезолид субстанция	Количественное определение – ВЭЖХ [14].	<ul style="list-style-type: none"> – представленные условия разработаны с применением импортного оборудования, малодоступного для многих лабораторий.
Линезолид таблетки, покрытые оболочкой	Количественное определение – ВЭЖХ [13].	
Эфавиренз субстанция	Количественное определение – ВЭЖХ [30].	
Эфавиренз таблетки, покрытые оболочкой	Количественное определение – ВЭЖХ [29].	

Используемые в работе методы: оптические (спектроскопия в УФ – области), ЖЖЭ, электрохимические (рН-метрия), хроматографические (тонкослойная и высокоэффективная жидкостная хроматографии) и статистические. Результаты экспериментальных исследований статистически обработаны с применением пакета программ для Windows XP (Microsoft Excel), используя критерии Стьюдента и Фишера. Различия статистически значимы при доверительной вероятности $p < 0,05$.

Для измерения оптической плотности растворов и регистрации электронных спектров применялся спектрофотометр СФ-2000 (ЗАО "ОКБ СПЕКТР", г. Санкт-Петербург). Исследование проводилось в кварцевых кюветах с толщиной рабочего слоя 1 см на фоне растворителя. Показатель величины рН

контролировался универсальным иономером ИТ-1101 (ООО "Измерительная техника", г. Москва).

Для выбора условий разделения исследуемых веществ методом ТСХ использовались готовые хроматографические пластины на основе силикагеля «Сорб菲尔 УФ-254» (ТУ 26-11-17-89), «Армсорб УФ-254» (ТУ 6-09-37-918-88), которые имеют высокую степень активности, стандартизированную толщину сорбента. Исследуемые пластины помещались в камеры хроматографические 12×20 см. Детекция пятен проводилась путем просмотра пластин в УФ-свете с применением ультрафиолетового облучателя УФС-254 при длине волны 254 нм после опрыскивания их реактивом Драгендорфа.

Для проведения исследования методом ВЭЖХ применялся микроколоночный жидкостный хроматограф с ультрафиолетовым спектрофотометрическим детектором «Милихром А-02» отечественного производства (ЗАО «ЭкоНова», Новосибирск). Оптимальными условиями хроматографирования офлоксацина, линезолида и эфавиренза являются: хроматографическая колонка (75×2 мм), заполненная полимерным сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ с размером частиц 5 мкм («Bischoff Analysentechnik und Gerate GmbH», Германия). Эффективность колонки – 4000 т.т. Температура термостата хроматографической колонки – 40°C. Для проведения пробоподготовки применялись: pH-метр «Анион 4100» (Россия, г. Новосибирск), центрифуга «Eppendorf» 13200 об/мин (Германия), ультразвуковая баня «Bandelin SONOREX» (Германия). Вода очищенная дополнительно очищена с помощью системы «Norganic, Millipore Corporation» (США). Для перемешивания жидкостей использовался прибор Шейкер S-3.08L («ELMI», Латвия).

Оптические образцы сравнения

Рабочими стандартными образцами, используемыми в данной работе, являются фармацевтические субстанции лекарственных веществ, содержание основного вещества в которых не ниже 99,9%. Оптические образцы сравнения: калия феррицианид («ч.д.а.», серия 070816, «Союзхимпром»), калия хромат

(«ч.д.а.», серия 160217, «Союзхимпром»), отвечающие требованиям ГОСТа. Свойства указанных оптических образцов сравнения представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Свойства оптических образцов сравнения

Вещество	ГОСТ	Описание	Свойства
Калия феррицианид $K_3[Fe(CN)_6]$,	4206-75	Тёмно-красные ромбические кристаллы	Растворим в воде. Нерастворим в этаноле, диэтиловом эфире, ацетоне, анилине, толуоле, этилацетате, пиридине и изопропаноле.
Калия хромат K_2CrO_4	4459-75	Жёлтые кристаллы ромбической сингонии	Растворим в воде. Плохо растворим в этаноле.

Реактивы

Применяемые неорганические кислоты, щелочи и органические растворители, а также исследуемые образцы сравнения отвечали требованиям ГОСТов и подвергались дополнительной очистке по ранее разработанным методикам при необходимости. Характеристика используемых реактивов приведена в таблице 7.

Таблица 7 – Характеристика реактивов

Название реактива	Описание	НД
Аммиака раствор концентрированный 25%	Бесцветная прозрачная жидкость с характерным острый (резким) запахом	ГОСТ 3760-79 «ч.д.а.»
Аммония сульфат	Бесцветные кристаллы или гранулы белого цвета	ГОСТ 3769-78 «ч.д.а.»
Ацетон	Бесцветная, прозрачная, легко воспламеняющаяся жидкость с характерным запахом	ТУ 6-09-3513-86 «о.с.ч.»
Ацетонитрил	Прозрачная, бесцветная жидкость	ТУ 2634-002-80529938-2015 «о.с.ч.»
Бензол	Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость	ГОСТ 5955-75 «х.ч.»
Вода очищенная	Бесцветная, прозрачная жидкость без запаха	Государственная фармакопея (ГФ) XIV ФС.2.2.0020.18
Метиленхлорид (дихлорметан)	Бесцветная жидкость	ГОСТ 9968-86 «х.ч.»
Метанол	Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость	ГОСТ 6995-77 «х.ч.»
Натрия гидроксида раствор 0,1 М	Бесцветная прозрачная жидкость	ГОСТ 4398-86 «х.ч.»
Натрия сульфат	Бесцветные прозрачные, выветривающиеся на воздухе	ГОСТ 4171-76 «ч.д.а.»

	кристаллы или белый кристаллический порошок	
Натрия хлорид	Белые кубические кристаллы или белый кристаллический порошок	ГОСТ 4233-77 «ч.д.а.»
Спирт 95%	Бесцветная, прозрачная, летучая, воспламеняющаяся жидкость; гигроскопична	ТУ 6-09-1710-77 «х.ч.»
Толуол	Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость	ТУ 2631-020-44493179-98 «х.ч.»
Хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М	Бесцветная прозрачная летучая жидкость, своеобразного запаха, кислого вкуса	ТУ 2112-129-05757587-07 «х.ч.»
Хлорная кислота	Прозрачная, бесцветная или со слабым желтоватым оттенком жидкость	ТУ 6-09-2878-84 «х.ч.»
Хлороформ (трихлорметан)	Прозрачная, бесцветная тяжелая подвижная жидкость с характерным запахом	ТУ 6-09-4263-76 «х.ч.»
Этилацетат	Прозрачная, бесцветная жидкость	ТУ 18-16-291-80 «х.ч.»
Эфир диэтиловый	Прозрачная, бесцветная, летучая, очень подвижная, легко воспламеняющаяся жидкость, гигроскопична	ТУ 2600-001-43852015-10 с изм. №1

Методика приготовления реактива Драгендорфа: (1 раствор – 1,7 г висмута основного нитрата растворяется в 100 г уксусной кислоты разведенной 20%; 2 раствор – 40 г калия йодида растворяется в 100 г воды очищенной; перед проведением детекции смешивается 20 мл 1 раствора, 5 мл 2 раствора и 40 мл воды очищенной).

2.2. Методики исследований

Очистка субстанций лекарственных веществ для получения рабочего стандартного образца (РСО): навеска испытуемого вещества растворяется в достаточном объеме спирта 95% для получения насыщенного раствора. Приготовленный раствор нагревается и сразу фильтруется через фильтр из бумаги лабораторной фильтровальной (ГОСТ 12026-76). Фильтрат охлаждается при температуре 0-10°C. Осевшие кристаллы отфильтровываются через фильтр из бумаги лабораторной фильтровальной (ГОСТ 12026-76), затем перекристаллизовываются с последующей очисткой активированным углем.

Методика проведения спектрофотометрических исследований: точная навеска препарата растворяется в небольшом объеме растворителя в мерной колбе определенной вместимости, доводится растворителем до метки. Затем аликовтная часть раствора переносится в другую мерную колбу, объем раствора доводится до метки этим же растворителем. Далее оптическая плотность приготовленного раствора измеряется при аналитической длине волны на спектрофотометре в кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используется растворитель. Параллельно проводится измерение оптической плотности раствора образца сравнения.

Методика построения калибровочных графиков для метода ВЭЖХ: точная навеска препарата помещается в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяется в определенном растворителе, далее 10 мл полученного раствора центрифугируется (13400 об/мин, 10 мин). Методом разбавления готовятся стандартные растворы для градуировки с концентрацией по исследуемому веществу 0,6, 0,3, 0,15, 0,1 и 0,05 мг/мл.

Методика обнаружения исследуемых веществ методом ТСХ: с помощью микроширица на линию старта готовых хроматографических пластинок («Сорб菲尔» или «Армсорб») наносится определенное количество раствора стандартного образца вещества - свидетеля (СОВС) и раствора исследуемого препарата. Пластиинки высушиваются на воздухе, затем хроматографируются восходящим способом. После подъема фронта растворителя на 10 см выше линии старта пластиинки вынимаются и сушатся на воздухе в течение 15-20 мин. Величина хроматографической подвижности R_f рассчитывается по формуле:

$$R_f = \frac{L_x}{L_s}, \quad (1)$$

где L_x – расстояние от линии старта до центра пятна исследуемого вещества; L_s – расстояние от линии старта до линии финиша.

Методика анализа методом ВЭЖХ: испытуемый раствор вводится в колонку в объеме 2 мкл. Регистрация хроматограмм проводится в значениях длин

волн, соответствующих коротковолновым максимумам. Результаты обрабатываются в программе «Microsoft Excel».

Методика приготовления модельного образца мочи: к 25 мл мочи добавляется раствор вещества в терапевтической, токсической или летальной дозировке. Расчет вносимых доз исследуемых веществ выполняется с учетом объема мочи – 25 мл. Таким образом, концентрация офлоксацина, линезолида и эфавиренза в модельном образце мочи соответствует 8,0; 40,0; 80,0 мг/мл. Полученные смеси настаиваются при комнатной температуре в течение 24 часов.

Методика изолирования офлоксацина, линезолида или эфавиренза: 1 мл раствора исследуемого препарата помещается в пробирку с 2 мл воды очищенной, 1 мл электролита и по каплям добавляется хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М до pH 6; 5; 4; 3; 2; или амиака раствором 10% до pH 7; 8; 9; 10; 11; 12 (значение pH контролируется с помощью иономера) и 3 мл органического растворителя. Содержимое пробирки взбалтывается и помещается в делительную воронку. После разделения фаз слой органического растворителя отделяется. Экстракция проводится повторно необходимое количество раз, извлечения объединяются. Растворители удаляются при комнатной температуре. Полученные после испарения экстрагента сухие остатки используются для приготовления испытуемых растворов и хроматографируются. Расчет степени извлечения исследуемого вещества (Х, %) проводится методом ВЭЖХ.

Методика изолирования лекарственных веществ других фармакологических групп: 3 мл модельного образца мочи переносится в делительную воронку, добавляется натрия гидроксида раствор 0,1 М до pH 9,0-10,0; 3 мл хлороформа и экстрагируется двукратно в течение 7 мин. Хлороформные извлечения переносятся в пробирку к сухому остатку, полученному выше. Органический растворитель удаляется в токе воздуха [9].

ГЛАВА 3. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Исследуемые в данной работе фторсодержащие лекарственные вещества обладают свойством поглощать электромагнитное излучение. Учитывая наличие данного свойства, возможно использование метода спектрофотометрии для разработки методик количественного определения.

Несмотря на то, что большинство НД на лекарственные субстанции и препараты рекомендуют для их анализа такой современный метод как ВЭЖХ, спектрофотометрические методы в фармакопейном анализе сохраняют важное место [1]. В этом направлении ежегодно проводятся оригинальные исследования как отечественных, так и зарубежных авторов. Спектрофотометрия включена в ГФ РФ [72], Международную [15] и во все национальные фармакопеи.

Определение концентрации лекарственных веществ спектрофотометрическим методом, согласно ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях», обычно проводят с применением стандартного образца. Данный вариант анализа является более надежным и точным. Но, не все лаборатории располагают в наличии набором ГСО на множество применяемых в медицинской практике лекарственных веществ. В частности, это может быть связано с достаточно высокой стоимостью ГСО. Поиск веществ, обладающих рядом необходимых оптических свойств и способных заменить ГСО, является актуальной задачей фармацевтического анализа. Кроме того, предлагаемый оптический образец сравнения должен быть доступным и недорогостоящим. В представленной работе исследованы оптические свойства офлоксацина, линезолида и эфавиренза и возможность применения спектрофотометрического анализа для их количественного определения методом внешнего стандарта с применением оптических образцов сравнения. Предлагаемые методики не требуют дорогостоящих и токсичных реагентов, обеспечивают хорошую воспроизводимость, просты в выполнении.

3.1. Оптимизация условий спектрофотометрического анализа офлоксацина в субстанции и лекарственной форме

С целью оптимизации условий спектрофотометрического определения офлоксацина были изучены стабильность растворов при хранении и спектры поглощения растворов офлоксацина в интервале pH 1,0-13,0, полученные в ультрафиолетовом диапазоне длин волн от 200 до 400 нм.

УФ-спектры поглощения офлоксацина (рис. 1) характеризуются тремя полосами поглощения с максимумами поглощения при длинах волн 226 ± 1 нм, 293 ± 1 нм и 329 ± 1 нм (pH 3,1), 226 ± 1 нм, 293 ± 1 нм и 327 ± 1 нм (pH 1,1), а также 226 ± 1 нм, 294 ± 1 нм и 326 ± 1 нм (pH 2,78). При pH 12,67 в УФ-спектре поглощения офлоксацина имеется плечо при длинах волн 239-255 нм и максимумы поглощения при длинах волн 289 ± 1 нм и 334 ± 1 нм. Кроме этого, при всех значениях pH на УФ-спектрах поглощения офлоксацина происходит батохромный сдвиг с одновременным гиперхромным эффектом в области до 294 нм, однако, при переходе к 326 нм наблюдается гипсохромный сдвиг с одновременным гипохромным эффектом. Изучение стабильности растворов офлоксацина в течение суток показало, что при всех значениях pH значительного изменения оптических свойств офлоксацина не происходит (рис. 2).

Для анализа в качестве растворителя офлоксацина был выбран хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М, так как в данном растворителе офлоксацин хорошо растворим, а полученный раствор стабилен.

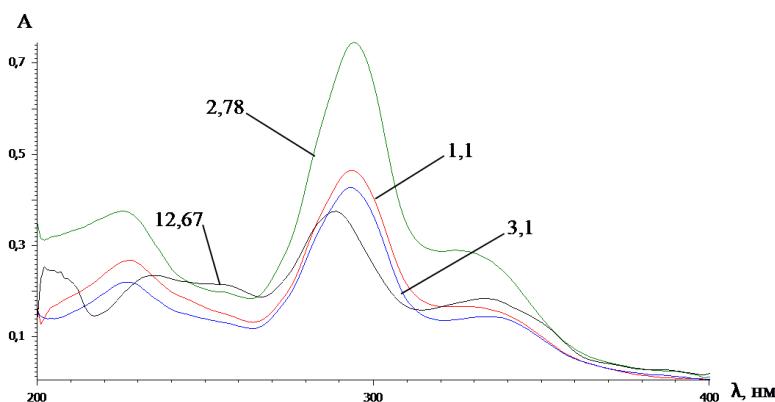


Рисунок 1 – УФ-спектры поглощения 0,0005% растворов офлоксацина при различных значениях pH. Номер кривой соответствует значению pH

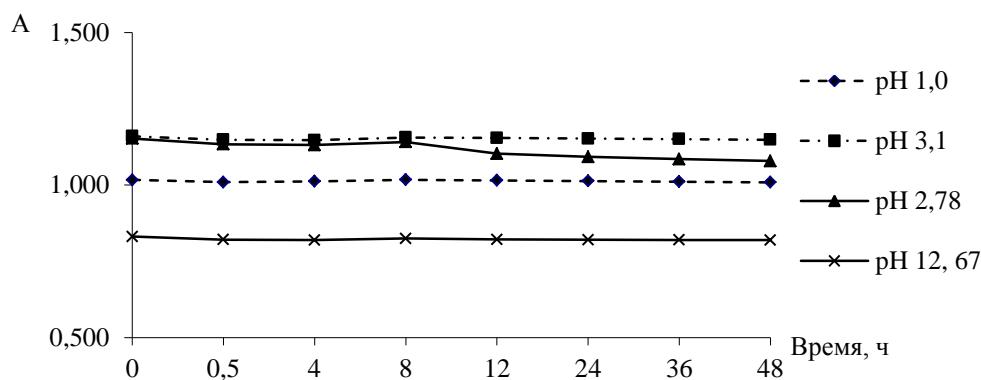


Рисунок 2 – Зависимость оптической плотности растворов офлоксацина от времени хранения при различных значениях pH

Так как спектрофотометрический метод является относительным, для определения количественного содержания офлоксацина в субстанции необходимо выбрать оптический образец сравнения. Оптические образцы сравнения – это доступные в чистом виде органические и неорганические соединения, обладающие определёнными оптическими характеристиками, позволяющими применять их для анализа в методе УФ-спектрофотометрии. Растворы этих веществ при хранении длительное время являются устойчивыми. Выбор такого соединения для анализа основывается на факторах, влияние которых необходимо учитывать: растворитель, применяемый для растворения лекарственного вещества, аналитическую длину волны исследуемого вещества, а также оптимальную область поглощения оптического образца сравнения [4].

Для методики количественного определения офлоксацина в качестве оптического образца сравнения было предложено вещество неорганической природы – калия феррицианид. Данный оптический образец сравнения выпускается промышленностью квалификации «ч.д.а.» и имеет ГОСТ 4206-75, регламентирующий его качество, кроме того, он является доступным для многих химических лабораторий, так как имеет низкую стоимость. Содержание в нем основного вещества, определенное химическим методом, составляет не менее 99,9%.

Спектры поглощения растворов калия феррицианида [5] в диапазоне pH 1,1-5,0 отличаются тремя полосами поглощения с максимумами при длинах волн

$261\pm1\text{ нм}$, $303\pm1\text{ нм}$ и $421\pm1\text{ нм}$. Спектры поглощения раствора калия феррицианида в промежутке pH 9,0-13,0 характеризуются тремя полосами поглощения с максимумами при длинах волн $261\pm1\text{ нм}$, $303\pm1\text{ нм}$ и $422\pm1\text{ нм}$ [11]. При изменении кислотности среды оптические свойства калия феррицианида не меняются. Оптимальными областями поглощения, в которых калия феррицианид может использоваться как оптический образец сравнения в спектрофотометрическом анализе лекарственных веществ, являются пределы 255 – 267 нм, 290 – 316 нм и 402 – 440 нм [5].

За аналитическую длину волны офлоксацина была взята длина волны 293 нм, что представляет собой длину волны максимума поглощения офлоксацина в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М, которая входит в оптимальный интервал поглощения калия феррицианида 290-316 нм. Это даёт основание предполагать, что для количественного определения исследуемого вещества спектрофотометрическим методом при использовании хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М как растворителя, в качестве оптимального оптического образца сравнения можно предложить калия феррицианид.

На рисунке 3 представлены УФ-спектры поглощения 0,0005% раствора офлоксацина и 0,012% раствора калия феррицианида в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М.

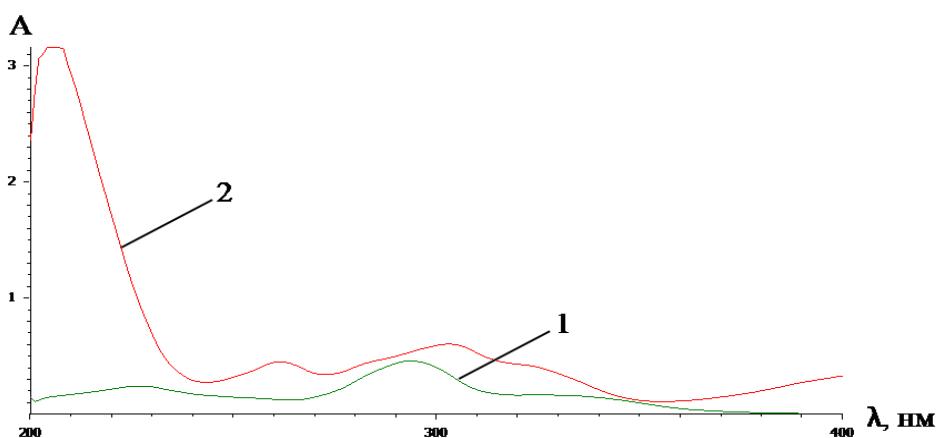


Рисунок 3 – УФ-спектры поглощения 0,0005% раствора офлоксацина и 0,012% раствора калия феррицианида в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М. 1 – офлоксацин; 2 – калия феррицианид

Так как офлоксацин и калия феррицианид отличаются по химическому составу и их удельные показатели поглощения не совпадают, необходимо произвести расчёт коэффициента пересчёта, представляющий собой отношение удельных показателей поглощения оптического E_{ooc} и рабочего E_{oc} образцов сравнения:

$$K_{nep} = \frac{E_{ooc}}{E_{oc}}, \quad (2)$$

где E_{oc} – удельный показатель поглощения рабочего образца сравнения исследуемого вещества; E_{ooc} – удельный показатель поглощения оптического образца сравнения.

Результаты определения коэффициента пересчета представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результаты расчета коэффициента пересчета для определения офорлоксацина спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду

Метрологические характеристики ($n=10$, $P=0,95\%$)						
$K_{пер}$	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E} \%$	S_r
0,0455	$2,27 \cdot 10^{-7}$	$4,76 \cdot 10^{-4}$	$1,51 \cdot 10^{-4}$	0,0003	0,75	0,0105

Используя предложенные условия, далее представлена методика количественного определения офорлоксацина в субстанции спектрофотометрическим методом.

Методика количественного определения офорлоксацина в субстанции: точная навеска субстанции (около 0,0500 г офорлоксацина) количественно переносится в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М, доводится объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивается. 1 мл полученного раствора помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводится объем раствора до метки хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М и перемешивается. Измеряется оптическая плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 293 нм в кварцевой кювете с длиной рабочего слоя 10 мм. Хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М используется в качестве раствора сравнения. Параллельно измеряется

оптическая плотность раствора оптического образца сравнения калия феррицианида.

Методика приготовления раствора оптического образца сравнения калия феррицианида: точная навеска оптического образца сравнения (около 0,1200 г калия феррицианида) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М, объём раствора доводится этим же растворителем до метки и перемешивается. 5 мл полученного раствора помещается в мерную колбу вместимостью 50 мл, объём раствора доводится хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М до метки и перемешивается.

Расчет результатов количественного содержания оффлоксацина проводится по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{ooc} \cdot K_{nep} \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100}{A_{ooc} \cdot a_x \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - W)} \cdot 100, \quad (3)$$

где A_{ooc} и A_x – оптические плотности оптического образца сравнения и определяемого вещества соответственно, a_x и a_{ooc} – точные навески определяемого вещества и оптического образца сравнения соответственно, K_{nep} – коэффициент пересчета, W – потеря в массе при высушивании, %, 100 – коэффициент для пересчета в проценты.

В таблице 9 представлены результаты спектрофотометрического количественного определения трех серий субстанций оффлоксацина (допустимое количество 98,5-101,5%).

Таблица 9 – Результаты количественного анализа оффлоксацина в субстанции спектрофотометрическим методом

№ серии	Оптический образец сравнения	Метрологические характеристики (n=10, P=95%)						
		\bar{X} , %	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta\bar{X}$	\bar{E} , %	S_r
DC-0301Н-1411001	Калия феррицианид	99,91	1,1047	1,0511	0,3324	0,75	0,75	0,011
YF00V140107	Калия феррицианид	100,12	1,5327	1,2380	0,3915	0,88	0,88	0,012
PH048517	Калия феррицианид	99,86	0,5775	0,7599	0,2403	0,54	0,54	0,008

Относительная погрешность определения офлоксацина в субстанции не превышает 0,88%. Методика обеспечивает хорошую воспроизводимость (S_r составляет не более 0,012). Следовательно, количественное содержание офлоксацина в условиях контрольно-аналитических лабораторий можно проводить по калия феррицианиду, как более доступному веществу, чем ГСО офлоксацина.

Результаты сравнительной оценки методов количественного определения офлоксацина по разработанной методике и методике НД представлены в таблице 10 [20]. Из таблицы 10 следует, что метод спектрофотометрического определения офлоксацина по калия феррицианиду и метод НД дают правильные результаты ($t_{выч} < t_{табл}$) и не различаются по воспроизводимости ($F_{выч} < F_{табл}$). Однако, метод НД уступает спектрофотометрическому методу по продолжительности анализа и требует использования токсичных и летучих растворителей (уксусный ангидрид).

Таблица 10 – Сравнительная оценка методов количественного определения офлоксацина в субстанции ($n=10$, $t(P, f)_{табл}=2,26$; $P=95\%$; $F(P, f_1, f_2)_{табл}=4,85$; $P=99\%$)

Наименование метода	μ	$\bar{X}, \%$	S_2	S	$\bar{E}, \%$	$t_{выч}$	$F_{выч}$	Продолжительность анализа, мин.	Число операций
Ацидиметрия в среде уксусного ангидрида	100	100,12	1,2477	1,1170	0,80	0,34	1,24	40	6
Спектрофотометрия по калию феррицианиду	100	99,92	1,0040	1,0020	0,72	0,24		20	6

Те же условия применимы и для разработки методики определения количественного содержания офлоксацина в таблетках «Офлоксацин» по 0,2 г, покрытых оболочкой.

Методика количественного определения офлоксацина в таблетках по 0,2 г, покрытых оболочкой: точная навеска порошка растертых покрытых оболочкой таблеток офлоксацина (около 0,0780 г) количественно переносится в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в хлористоводородной кислоты

растворе 0,1 М, объем раствора доводится этим же растворителем до метки и перемешивается. Раствор фильтруется, первые 10 мл фильтрата отбрасываются и 1 мл полученного раствора помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, объем раствора доводится до метки хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М и перемешивается. Измеряется оптическая плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 293 нм в кварцевой кювете с длиной рабочего слоя 10 мм. Хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М используется в качестве раствора сравнения. Параллельно измеряется оптическая плотность раствора оптического образца сравнения калия феррицианида. Полученные результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Результаты количественного определения офлоксацина в таблетках «Офлоксцин» по 0,2 г, покрытых оболочкой, по калия феррицианиду (допустимое количество 90-110%)

Метрологические характеристики (n=10, P=95%)							
№ серии	\bar{X} ,%	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta \bar{X}$	\bar{E} , %	Sr
030516	99,27	2,3897	1,5459	0,4888	1,10	1,11	0,016
020116	99,16	1,8122	1,3462	0,4257	0,96	0,96	0,014
010218	100,63	1,4568	1,2070	0,3817	0,86	0,86	0,012

Результаты сравнительной оценки методов количественного определения офлоксацина в таблетках по 0,2 г, покрытых оболочкой, по разработанной методике и методике НД [19] представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Сравнительная оценка методов количественного определения офлоксацина в таблетках по 0,2 г, покрытых оболочкой (n=10, t (P, f) (табл)=2,26; P=95%; F (P, f₁, f₂) (табл)=4,85; P=99%)

Наименование метода	μ	\bar{X} , %	S_2	S	\bar{E} , %	$t_{выч}$	$F_{выч}$	Продолжительность анализа мин.	Число операций
ВЭЖХ (НД)	100	100,29	1,41	1,19	0,85	0,78	1,21	35	7
Спектрофотометрия по калия феррицианиду	100	100,08	1,17	1,08	0,77	0,23		25	7

Установлено, что методика анализа офлоксацина в таблетках по 0,2 г, покрытых оболочкой, спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду и методика НД дают правильные результаты ($t_{выч} < t_{табл}$) и не различаются по воспроизводимости ($F_{выч} < F_{табл}$). Однако, предложенная нами методика требует использования менее дорогостоящего образца сравнения, стоимость одного анализа уменьшается более чем в 2 раза.

Разработанные методики были валидированы по следующим основным показателям: линейность, прецизионность (сходимость, воспроизводимость), специфичность, аналитическая область методики.

Для оценки правильности предложенных методик были приготовлены модельные растворы офлоксацина различной концентрации (80%, 100%, 120%) и проведены определения содержания исследуемого действующего вещества в испытуемых растворах ($n=3$), используя в качестве оптического образца сравнения калия феррицианид. В таблицах 13 и 14 представлены полученные результаты оценки правильности методик количественного определения офлоксацина в субстанции и таблетках, покрытых оболочкой, по оптическому образцу сравнения калия феррицианиду спектрофотометрическим методом.

Таблица 13 – Результаты оценки правильности методики количественного определения офлоксацина в субстанции по калия феррицианиду спектрофотометрическим методом

Содержание офлоксацина, %	Оптический образец сравнения			\bar{E} , %	Допустимое \bar{E} , %		
	Калия феррицианид						
	1	2	3				
80	79,17	79,33	78,92	0,65	< 2%		
100	100,53	100,68	100,23	0,57	< 2%		
120	119,13	119,52	119,9	0,80	< 2%		

Таблица 14 – Результаты оценки правильности методики количественного определения офлоксацина в таблетках по 0,2 г, покрытых оболочкой, по калия феррицианиду спектрофотометрическим методом

Содержание оффлоксацина, %	Оптический образец сравнения			\bar{E} , %	Допустимое \bar{E} , %		
	Калия феррицианид						
	1	2	3				
80	78,87	79,19	79,11	0,52	< 2%		
100	101,48	100,93	101,11	0,69	< 2%		
120	121,08	121,23	120,84	0,40	< 2%		

Для построения градуировочной зависимости и установления диапазона аналитической области методики были проанализированы модельные растворы офлоксацина шести уровней концентраций. Оценка степени линейности проводилась путём определения коэффициента корреляции.

Представленная на рисунке 4 графическая зависимость оптической плотности от концентрации раствора офлоксацина в хлористоводородной кислоте растворе 0,1 М линейна и описывается уравнением $y=84,03x+0,008$. Коэффициент корреляции равен 0,9997, что указывает на соблюдение линейности. Линейная зависимость наблюдается в интервале концентраций 2,5-25 мкг/мл.

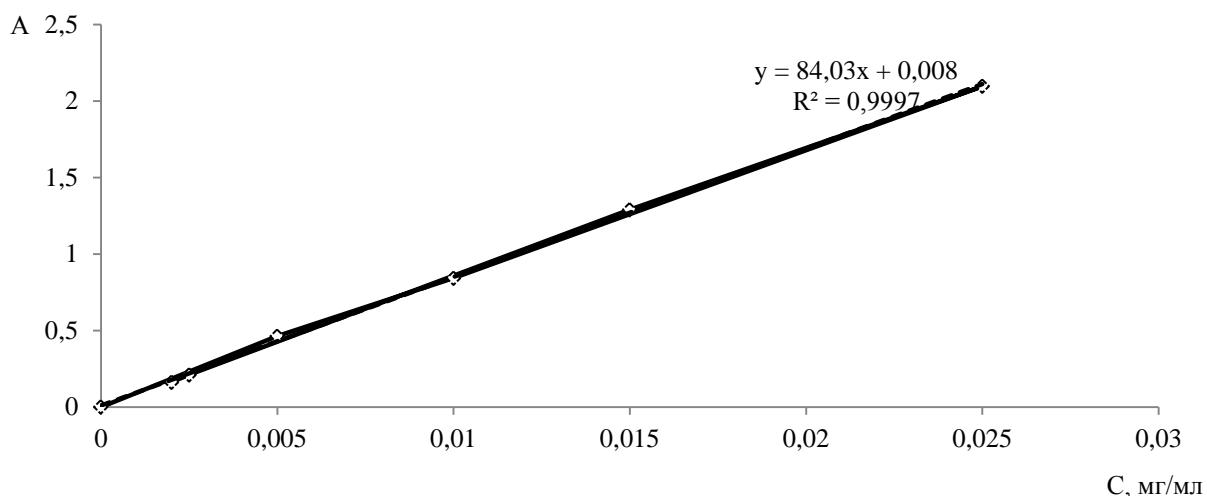


Рисунок 4 – Градуировочная зависимость оптической плотности от концентрации офлоксацина в хлористоводородной кислоте растворе 0,1 М

Из анализа приведенных в таблице 15 результатов можно сделать вывод, что метод внешнего стандарта для количественного анализа офлоксацина в

субстанции и таблетках пригоден для получения достаточно надежных и воспроизводимых результатов.

Таблица 15 – Результаты валидации методик количественного определения офлоксацина по калия феррицианиду спектрофотометрическим методом

Параметры	Критерии валидности	Результаты испытания офлоксацина	
		в субстанции	в таблетках
Специфичность		Специфична	Специфична
Прецизионность:			
1.Сходимость	RSD < 2% $t_{табл} \geq t_{выч}$	RSD=0,75, $t_{выч}=0,27$ ($t_{табл}=2,26$), n=10	RSD=0,86, $t_{выч}=1,65$ ($t_{табл}=2,26$), n=10
2.Воспроизводимость	RSD < 3% $t_{табл} \geq t_{выч}$	RSD=0,88, $t_{выч}=0,31$ ($t_{табл}=2,26$), n=10	RSD=0,96, $t_{выч}=1,97$ ($t_{табл}=2,26$), n=10
Линейность результатов	$R^2 \geq 0,999$	$R^2=0,9997;$ $y=84,03x+0,008$	$R^2=0,9997;$ $y=84,03x+0,008$
Аналитическая область методики	интервал концентраций	2,5-10 мкг/мл	2,5-10 мкг/мл

Предложенные методики количественного определения офлоксацина в субстанции и таблетках, покрытых оболочкой, могут быть рекомендованы для включения в НД.

3.2. Оптимизация условий спектрофотометрического анализа линезолида в субстанции и лекарственной форме

Для того, чтобы оптимизировать условия УФ-спектрофотометрического анализа линезолида, необходимо изучить оптические свойства линезолида в интервале pH 1,0-13,0 в диапазоне длин волн 200-400 нм.

УФ-спектры поглощения линезолида (рис. 5) характеризуются одной полосой поглощения с максимумами при длинах волн: 258±1 (pH 5,5); 244±1 нм (pH 1,0); 251±1 нм (pH 6,4); 250±1 нм (pH 12,5). Увеличение pH раствора до 5,5 приводит к батохромному смещению максимума поглощения до 258 нм с одновременным гиперхромным эффектом. Дальнейший сдвиг pH в щелочную среду до 12,5 приводит к гипсохромному смещению более длинноволнового максимума на 8 нм с одновременным гипохромным эффектом.

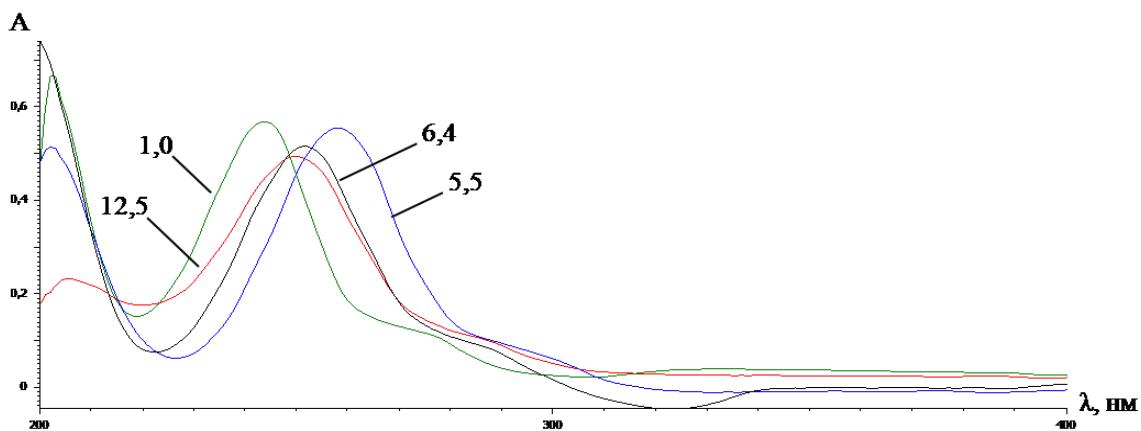


Рисунок 5 – УФ-спектры поглощения 0,001% растворов линезолида при различных значениях рН. Номер кривой соответствует значению рН

Исследование стабильности растворов линезолида (рис. 6) показало, что линезолид стабилен как при рН 1,0, так и при рН 5,5. В связи с тем, что в спирте 95% линезолид хорошо растворим, а полученный раствор стабилен, в качестве растворителя для количественного определения линезолида можно предложить спирт 95%.

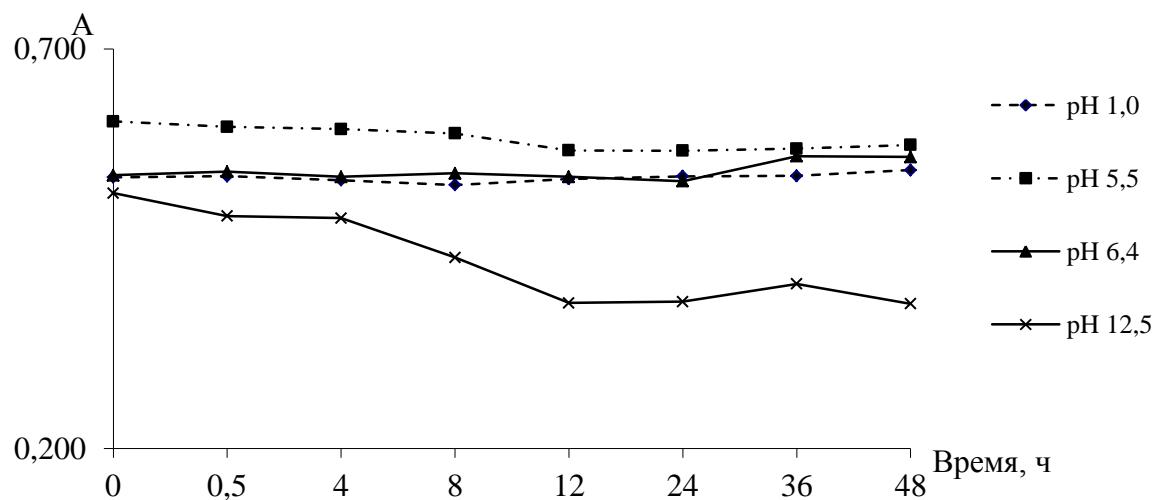


Рисунок 6 – Зависимость оптической плотности растворов линезолида от времени хранения при различных значениях рН

Для методики количественного определения линезолида в качестве оптического образца сравнения было предложено вещество неорганической природы – калия феррицианид.

Аналитической длиной волны линезолида была выбрана длина волны 258 нм, что представляет собой максимум поглощения линезолида в спирте 95% и входит в оптимальный интервал поглощения калия феррицианида 255-267 нм. Из этого следует, что для количественного определения исследуемого вещества спектрофотометрическим методом при использовании спирта 95% как растворителя, в качестве оптимального оптического образца сравнения можно предложить калия феррицианид.

На рисунке 7 представлены УФ-спектры поглощения 0,001% раствора линезолида и 0,02% раствора калия феррицианида в спирте 95%.

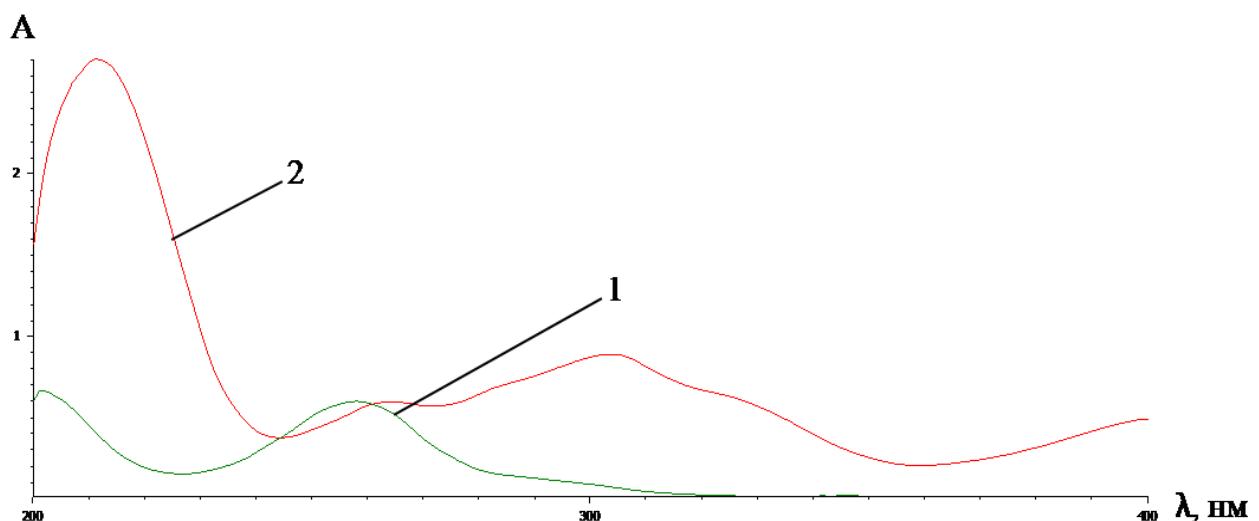


Рисунок 7 – УФ-спектры поглощения 0,001% раствора линезолида и 0,02% раствора калия феррицианида в спирте 95%. 1 – линезолид; 2 – калия феррицианид

В связи с тем, что линезолид и калия феррицианид отличаются по химическому составу и их удельные показатели поглощения не совпадают, в формулу расчета результатов количественного анализа линезолида следует ввести коэффициент пересчета. Результаты определения коэффициента пересчета для количественного анализа линезолида спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты определения коэффициента пересчета для количественного анализа линезолида спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду

Метрологические характеристики (n=10, P=0,95%)						
K _{пер}	S ²	S	S _{X̄}	ΔX̄	Ē %	S _r
0,0524	2,41·10 ⁻⁷	4,91·10 ⁻⁴	1,55·10 ⁻⁴	3,51·10 ⁻⁴	0,67	0,0094

Методика количественного определения линезолида в субстанции: точная навеска субстанции (около 0,0500 г линезолида) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 20 мл спирта 95%, доводится объем раствора до метки водой очищенной и перемешивается. 1 мл полученного раствора помещается в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем раствора доводится до метки спиртом 95% и перемешивается. Измеряется оптическая плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 258 нм в кварцевой кювете с длиной рабочего слоя 10 мм. Спирт 95% применяется в качестве раствора сравнения. Параллельно измеряется оптическая плотность раствора оптического образца сравнения калия феррицианида.

Методика приготовления раствора оптического образца сравнения калия феррицианида: точная навеска оптического образца сравнения (около 0,2000 г калия феррицианида) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 20 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, объем раствора доводится этим же растворителем до метки и перемешивается. 5 мл полученного раствора помещается в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем раствора доводится до метки спиртом 95% и перемешивается.

Расчет результатов количественного содержания линезолида проводится по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{ooc} \cdot K_{nep} \cdot 5 \cdot 100 \cdot 50}{A_{ooc} \cdot a_x \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - W)} \cdot 100, \quad (4)$$

где A_{ooc} и A_x – оптические плотности оптического образца сравнения и определяемого вещества соответственно, a_{ooc} и a_x – точные навески оптического

образца сравнения и определяемого вещества соответственно, K_{nep} – коэффициент пересчета, W – потеря в массе при высушивании, %, 100 – коэффициент для пересчета в проценты.

Проведённые исследования показали (табл. 17), что количественное содержание линезолида в трех сериях субстанции входит в пределы допустимого количества линезолида (98,0-102%).

Относительная погрешность определения линезолида в субстанции не превышает 0,73%. Методика обеспечивает хорошую воспроизводимость (S_r составляет не более 0,010). Это означает, что для количественного анализа линезолида в условиях контрольно-аналитических лабораторий можно использовать калия феррицианид, как более доступное вещество, чем ГСО линезолида.

Таблица 17 – Результаты количественного анализа линезолида в субстанции спектрофотометрическим методом

№ серии	Оптический образец сравнения	Метрологические характеристики (n=10, P=95%)						
		\bar{X} , %	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta \bar{X}$	\bar{E} , %	S_r
061405896	Калия феррицианид	99,92	0,8973	0,9473	0,2996	0,68	0,68	0,009
06147065	Калия феррицианид	99,75	1,0398	1,0197	0,3225	0,73	0,73	0,010
06147517	Калия феррицианид	100,05	0,7161	0,8462	0,2676	0,60	0,60	0,008

В таблице 18 представлены результаты сравнительной оценки методов количественного определения линезолида по разработанной методике и методике НД [14].

Таблица 18 – Сравнительная оценка методов количественного определения линезолида в субстанции (n=10, t (P, f) (табл)=2,26; P=95%; F (P, f₁, f₂) (табл)=4,85; P=99%)

Наименование метода	μ	\bar{X} , %	S^2	S	\bar{E} , %	$t_{выч}$	$F_{выч}$	Продолжительность анализа, мин.	Число операций
ВЭЖХ (НД)	100	99,62	1,1021	1,0498	0,75	1,15		50	7
Спектрофотометрия по калия феррицианиду	100	99,82	0,5259	0,7252	0,52	0,81	2,10	20	6

Из представленных данных видно, что метод спектрофотометрического определения линезолида по калия феррицианиду и метод НД дают правильные результаты ($t_{выч} < t_{табл}$) и не различаются по воспроизводимости ($F_{выч} < F_{табл}$). Метод НД уступает методу спектрофотометрического определения по продолжительности анализа и предполагает использование дорогостоящего оборудования и материалов.

Найденные условия спектрофотометрического определения линезолида были использованы для количественного определения лекарственной формы линезолида.

Методика количественного определения линезолида в таблетках по 0,2 г, покрытых оболочкой: точная навеска порошка растертых покрытых оболочкой таблеток линезолида (около 0,0696 г) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 20 мл спирта 95%, объем раствора доводится до метки водой очищенной и перемешивается. Раствор фильтруется, первые 10 мл фильтрата отбрасываются. 1 мл полученного раствора помещается в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем раствора доводится до метки спиртом 95% и перемешивается. Измеряется оптическая плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 258 нм в кварцевой кювете с длиной рабочего слоя 10 мм. Спирт 95% применяется в качестве раствора сравнения. Параллельно измеряется оптическая плотность раствора образца сравнения калия феррицианида. Методика приготовления раствора оптического образца сравнения приведена выше.

Из приведенных в таблице 19 данных следует, что количественное определение линезолида спектрофотометрическим методом в таблетках, покрытых оболочкой, по оптическому образцу сравнения калия феррицианиду отвечает нормативным требованиям (допустимое количество 95-105%). Относительная погрешность определения не превышает 1,28%. Представленная методика обеспечивает хорошую воспроизводимость (S_r не превышает 0,018).

Таблица 19 – Результаты количественного анализа линезолида в таблетках «Амизолид» по 0,2 г, покрытых оболочкой, спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду

№ серии	Метрологические характеристики (n=10, P=95%)						
	\bar{X} ,%	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta \bar{X}$	\bar{E} , %	S_r
150916	100,38	3,2104	1,7918	0,5666	1,28	1,28	0,018
120916	99,06	2,6107	1,6158	0,5110	1,15	1,17	0,016
140916	99,65	1,1874	1,0897	0,3446	0,78	0,78	0,011

Проведена сравнительная оценка результатов количественного определения линезолида в таблетках по 0,2 г, покрытых оболочкой, по разработанной методике и методике НД [13]. Результаты представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Сравнительная оценка методов количественного определения линезолида в таблетках по 0,2 г, покрытых оболочкой, (n=10, t (P, f) (табл)=2,26; P=95%; F (P, f₁, f₂) (табл)=4,85; P=99%)

Наименование метода	Метрологические характеристики								
	μ ,%	\bar{X}	S^2	S	\bar{E} ,%	$t_{выч}$	$F_{выч}$	Продолжительность анализа, мин.	
ВЭЖХ (НД)	100	100,21	1,1860	1,09	0,78	0,59	1,27	40	7
Спектрофотометрия по калию феррицианиду	100	99,74	0,9341	0,9665	0,69	0,84		25	7

Метод количественного определения линезолида в таблетках по 0,2 г, покрытых оболочкой, по калия феррицианиду спектрофотометрическим методом и метод НД дают правильные результаты ($t_{выч} < t_{табл}$) и не различаются по воспроизводимости ($F_{выч} < F_{табл}$).

Разработанные методики были валидированы по следующим основным показателям: линейность, прецизионность (сходимость, воспроизводимость), специфичность, аналитическая область методики.

Для установления диапазона аналитической области методики и линейности результатов были проанализированы модельные растворы линезолида шести

уровней концентраций. Для оценки степени линейности рассчитывался коэффициент корреляции.

Представленная на рисунке 8 графическая зависимость оптической плотности от концентрации раствора линезолида в спирте 95% линейна и описывается уравнением $y=54,22x+0,017$. Коэффициент корреляции равен 0,9995, что указывает на соблюдение линейности. Линейная зависимость наблюдается в интервале концентраций 2,5-25 мкг/мл.

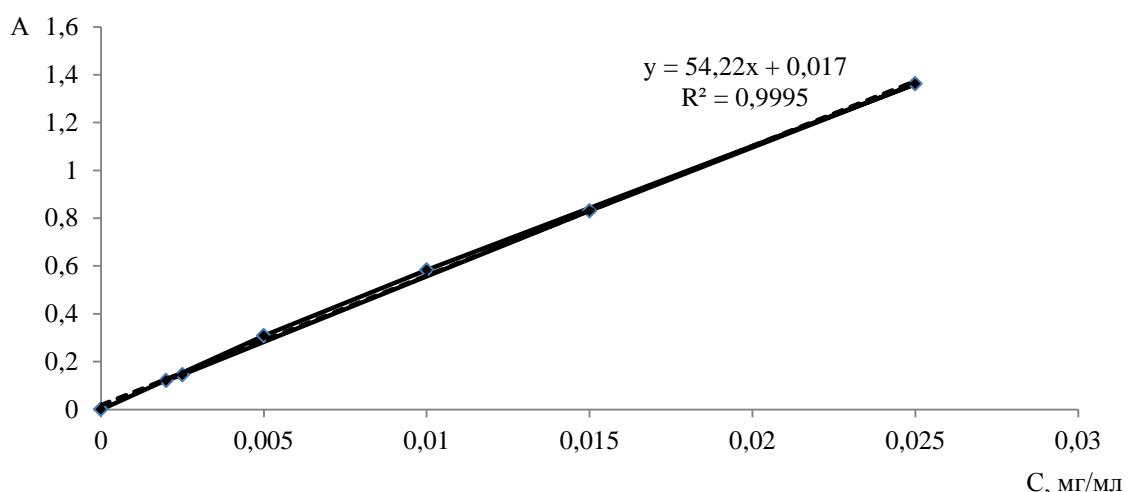


Рисунок 8 – Градуировочная зависимость оптической плотности от концентрации линезолида в спирте 95%

Оценка правильности предложенных методик состояла в приготовлении модельных растворов линезолида определенной концентрации (80%, 100%, 120%) и последующего определения содержания исследуемого действующего вещества в испытуемых растворах ($n=3$), используя в качестве внешнего образца сравнения калия феррицианид.

В таблицах 21 и 22 представлены полученные результаты оценки правильности методик количественного определения линезолида в субстанции и таблетках, покрытых оболочкой, по оптическому образцу сравнения калия феррицианиду спектрофотометрическим методом.

Таблица 21 – Результаты оценки правильности методики спектрофотометрического определения линезолида в субстанции по калия феррицианиду

Содержание линезолида, %	Оптический образец сравнения			E, %	Допустимое E, %		
	Калия феррицианид		3				
	1	2					
80	81,30	81,65	81,10	0,85	< 2%		
100	99,55	99,80	100,15	0,75	< 2%		
120	119,65	119,25	119,45	0,42	< 2%		

Таблица 22 – Результаты оценки правильности методики спектрофотометрического определения линезолида в таблетках по 0,2 г, покрытых оболочкой, по калия феррицианиду

Содержание линезолида, %	Оптический образец сравнения			E, %	Допустимое E, %		
	Калия феррицианид		3				
	1	2					
80	80,52	80,46	80,80	0,56	< 2%		
100	100,36	100,56	100,93	0,71	< 2%		
120	120,74	120,53	120,09	0,68	< 2%		

Из анализа приведенных в таблице 23 результатов можно сделать вывод, что метод внешнего стандарта для количественного определения линезолида в субстанции и таблетках пригоден для получения достаточно надежных и воспроизводимых результатов.

Таблица 23 – Результаты валидации методик количественного определения линезолида спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду

Параметры	Критерии валидности	Результаты испытания линезолида	
		в субстанции	в таблетках
Специфичность		Специфична	Специфична
Прецизионность:			
1. Сходимость	RSD < 2% $t_{\text{табл}} \geq t_{\text{выч}}$	RSD=0,60, $t_{\text{выч}}=0,19$ ($t_{\text{табл}}=2,26$), n=10	RSD=0,78, $t_{\text{выч}}=1,01$ ($t_{\text{табл}}=2,26$), n=10
2. Воспроизводимость	RSD < 3% $t_{\text{табл}} \geq t_{\text{выч}}$	RSD=0,73, $t_{\text{выч}}=0,77$ ($t_{\text{табл}}=2,26$), n=10	RSD=1,17, $t_{\text{выч}}=1,84$ ($t_{\text{табл}}=2,26$), n=10
Линейность результатов	$R^2 \geq 0,999$	$R^2=0,9995;$ $y=54,22x+0,017$	$R^2=0,9995;$ $y=54,22x+0,017$
Аналитическая область методики	интервал концентраций	2,5-25 мкг/мл	2,5-25 мкг/мл

Представленные методики количественного анализа линезолида в субстанции и таблетках, покрытых оболочкой, могут быть рекомендованы для включения в НД.

3.3. Оптимизация условий спектрофотометрического анализа эфавиренза в субстанции и лекарственной форме

Для проведения оптимизации условий разрабатываемых методик количественного анализа были изучены оптические свойства эфавиренза в интервале pH 1,0-13,0 в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм. В УФ-спектрах эфавиренза (рис. 9) при варьировании значений pH значительных изменений не происходит. УФ-спектры поглощения эфавиренза характеризуются одной полосой поглощения и имеют максимумы: 248±1 нм (pH 5,35); 248±1 нм (pH 1,0); 248±1 нм (pH 5,25); 267±1 нм (pH 12,5). Кроме того, при увеличении pH до 12,3 нм происходит батохромный сдвиг с одновременным гиперхромным эффектом.

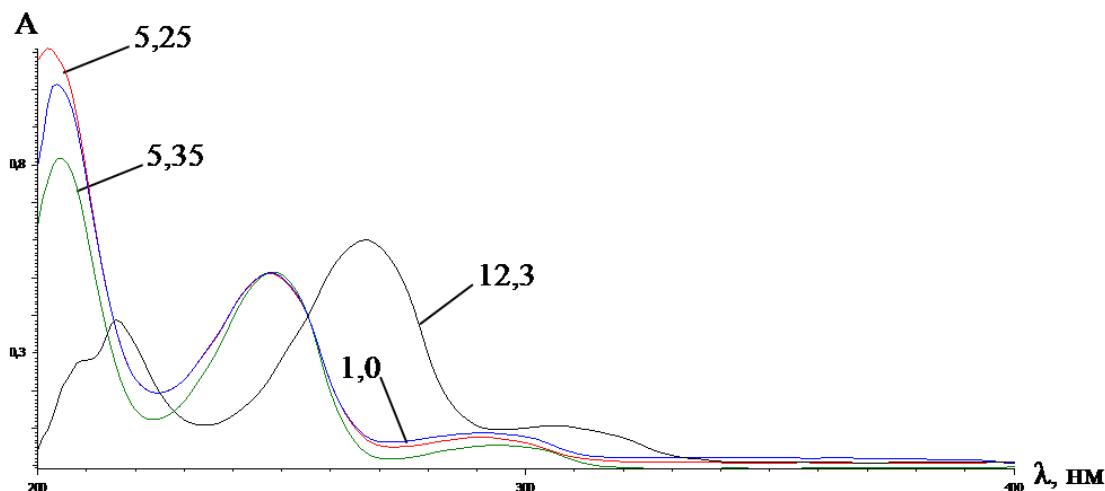


Рисунок 9 – УФ-спектры поглощения 0,001% растворов эфавиренза при различных значениях pH. Номер кривой соответствует значению pH

Анализ стабильности растворов эфавиренза показал сохранение оптических свойств при pH 5,35 и pH 12,3. При других значениях pH растворы менее стабильны (рис. 10).

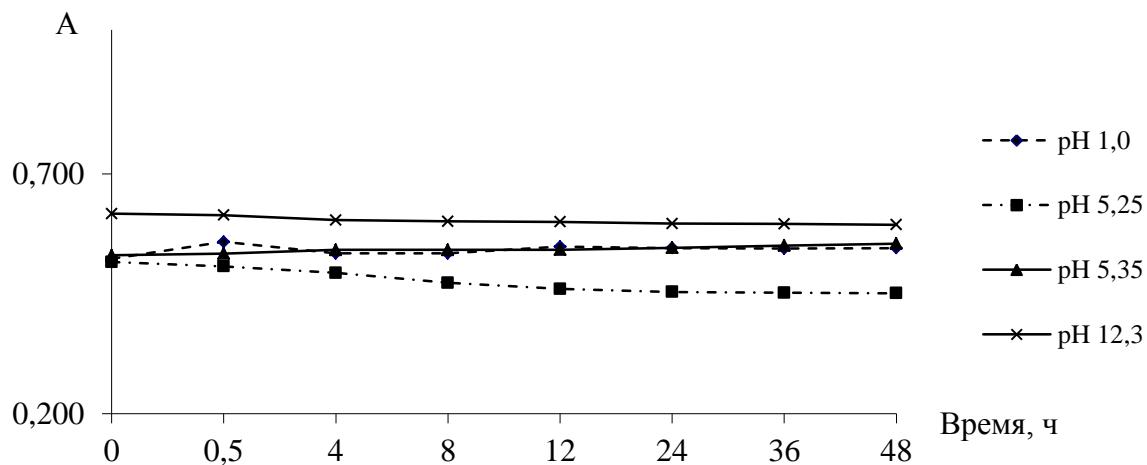


Рисунок 10 – Зависимость оптической плотности растворов эфавиренза от времени хранения при различных значениях pH

Следовательно, натрия гидроксида раствор 0,1 М (pH 12,3), можно предложить как растворитель для анализа эфавиренза. Для приготовления растворов первого разведения использовался спирт 95%, так как анализируемое вещество в нём имеет хорошую растворимость.

В качестве аналитической была выбрана длина волны 267 нм, соответствующая длинноволновому максимуму поглощения эфавиренза в натрия гидроксида растворе 0,1 М.

Как оптимальные образцы сравнения для эфавиренза были рассмотрены вещества неорганической природы: калия феррицианид и калия хромат. Растворы образцов сравнения использовались в концентрации 0,02% для калия феррицианида и 0,003% для калия хромата.

В интервале pH 10,0-13,0 УФ-спектры поглощения растворов калия хромата [5] характеризуются двумя полосами поглощения с максимумами при 275 ± 1 нм и 373 ± 1 нм. При повышении кислотности pH среды (pH 7,5) наблюдается уменьшение интенсивности поглощения калия хромата без изменения максимумов. Дальнейшее изменение pH растворов в сторону кислотности (pH 5,0-1,1) приводит к гипсохромному сдвигу максимумов поглощения. При уменьшении кислотности pH среды в УФ-спектрах поглощения калия хромата наблюдаются максимумы при 257 ± 1 нм и 350 ± 1 нм.

Обосновано, что оптимальные области поглощения, при которых можно использовать калия хромат в качестве оптического образца сравнения в спектрофотометрическом анализе лекарственных веществ, установлены в пределах 264-286 нм, 357-389 нм [5].

Аналитическая длина волны эфавиренза (267 нм) входит в интервал, оптимальный для калия феррицианида (255-267 нм) и калия хромата (264-286 нм). Из вышепредставленных данных следует, что для количественного определения исследуемого вещества спектрофотометрическим методом при использовании натрия гидроксида раствора 0,1 М как растворителя, в качестве оптимальных оптических образцов сравнения можно предложить калия феррицианид и калия хромат.

На рисунках 11 и 12 представлены УФ-спектры поглощения 0,001% раствора эфавиренза и выбранных образцов сравнения в натрия гидроксида растворе 0,1 М.

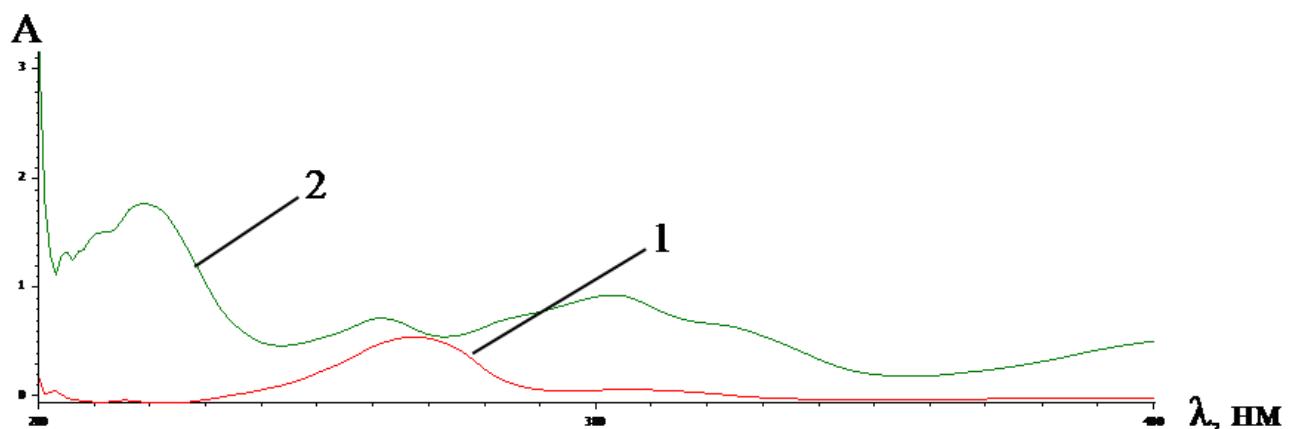


Рисунок 11 – УФ-спектры поглощения 0,001% раствора эфавиренза и 0,02% раствора калия феррицианида в натрия гидроксида растворе 0,1 М. 1 – эфавиренз; 2 – калия феррицианид

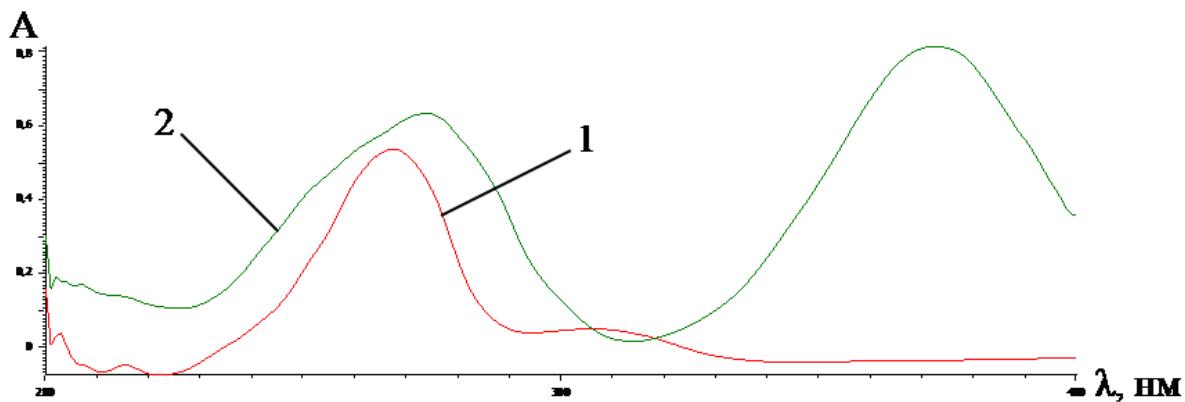


Рисунок 12 – УФ-спектры поглощения раствора 0,001% эфавиренза и 0,003% калия хромата в натрия гидроксида растворе 0,1 М. 1 – эфавиренз; 2 – калия хромат

Так как эфавиренз и выбранные оптические образцы сравнения отличаются по химическому составу и их удельные показатели поглощения не совпадают, в расчётную формулу необходимо ввести коэффициент пересчета. В таблицах 24 и 25 приведены полученные данные для установления коэффициента пересчета.

Таблица 24 – Результаты определения коэффициента пересчета для количественного анализа эфавиренза спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду

Метрологические характеристики (n=10, P=95%)						
K _{пер}	S ²	S	S _Ȑ	ΔȐ	Ȑ %	S _r
0,0526	$3,66 \cdot 10^{-7}$	$6,05 \cdot 10^{-4}$	$1,91 \cdot 10^{-4}$	$4,32 \cdot 10^{-4}$	0,82	0,0110

Таблица 25 – Результаты определения коэффициента пересчета для количественного анализа эфавиренза спектрофотометрическим методом по калия хромату

Метрологические характеристики (n=10, P=95%)						
K _{пер}	S ²	S	S _Ȑ	ΔȐ	Ȑ %	S _r
0,3008	$1,05 \cdot 10^{-5}$	0,0032	0,0010	0,0023	0,77	0,0108

Найденные условия для спектрофотометрического анализа эфавиренза были применены для количественного определения в субстанции исследуемого препарата.

Методика количественного определения эфавиренза в субстанции: точная навеска субстанции (около 0,0500 г эфавиренза) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 40 мл спирта 95%, объем раствора доводится водой очищенной до метки и перемешивается. 1 мл полученного раствора помещается в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем раствора доводится до метки натрия гидроксида раствором 0,1 М и перемешивается. Измеряется оптическая плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 267 нм в кварцевой кювете с длиной рабочего слоя 10 мм. Натрия гидроксида раствор 0,1 М применяется в качестве раствора сравнения. Параллельно измеряется оптическая плотность растворов оптических образцов сравнения калия феррицианида и калия хромата.

Методика приготовления раствора оптического образца сравнения калия феррицианида: точная навеска оптического образца сравнения (около 0,2000 г калия феррицианида) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 20 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М, объем раствора доводится этим же растворителем до метки и перемешивается. 5 мл полученного раствора помещается в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем раствора доводится натрия гидроксида раствором 0,1 М до метки и перемешивается.

Методика приготовления раствора оптического образца сравнения калия хромата: точная навеска оптического образца сравнения (около 0,1700 г калия хромата) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 20 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М, объем раствора доводится этим же растворителем до метки и перемешивается. 1 мл полученного раствора помещается в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем раствора доводится натрия гидроксида раствором 0,1 М до метки и перемешивается.

Расчет результатов количественного содержания эфавиренза по калия феррицианиду проводится по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{ooc} \cdot K_{nep} \cdot 5 \cdot 100 \cdot 50}{A_{ooc} \cdot a_x \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - W)} \cdot 100, \quad (5)$$

Расчет результатов количественного содержания эфавиренза по калия хромату проводится по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{ooc} \cdot K_{nep} \cdot 1 \cdot 100 \cdot 50}{A_{ooc} \cdot a_x \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - W)} \cdot 100, \quad (6)$$

где A_x и A_{ooc} – оптические плотности определяемого вещества и оптического образца сравнения соответственно, a_x и a_{ooc} – точные навески определяемого вещества и оптического образца сравнения соответственно, K_{nep} – коэффициент пересчета, 100 – коэффициент для пересчета в проценты, W – потеря в массе при высушивании, %.

Данные количественного анализа эфавиренза в субстанции спектрофотометрическим методом по оптическим образцам сравнения укладываются в допустимые пределы содержания (98-102%) и приведены в таблице 26.

Таблица 26 – Результаты количественного анализа эфавиренза в субстанции спектрофотометрическим методом

№ серии	Оптический образец сравнения	Метрологические характеристики (n=10, P=95%)						
		$\bar{X}, \%$	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta \bar{X}$	$\bar{E} \%$	S_r
EFVB1 6021	Калия феррицианид	99,63	1,4658	1,2107	0,3829	0,87	0,87	0,012
	Калия хромат	99,68	0,8486	0,9212	0,2913	0,66	0,66	0,009
EFVB1 6024	Калия феррицианид	100,18	0,6981	0,8355	0,2642	0,60	0,60	0,008
	Калия хромат	100,16	0,8126	0,9015	0,2851	0,64	0,64	0,009
EFVB1 6027	Калия феррицианид	99,80	0,4221	0,6497	0,2055	0,46	0,47	0,007
	Калия хромат	99,83	0,6383	0,7989	0,2526	0,57	0,57	0,008

Относительная погрешность количественного анализа эфавиренза в субстанции спектрофотометрическим методом по оптическим образцам сравнения не превышает 0,87%. Методики обеспечивают хорошую воспроизводимость (S_r составляет не более 0,012). Из представленных данных следует, что результаты, полученные при определении эфавиренза по калия феррицианиду и калия хромату, являются сопоставимыми.

Таким образом, определение количества эфавиренза возможно с применением любого из предложенных оптических образцов сравнения, являющимся наиболее доступным для данной контрольно-аналитической лаборатории.

Результаты сравнительной оценки методов количественного определения эфавиренза по разработанным методикам и методике НД представлены в таблице 27 [30].

Таблица 27 – Сравнительная оценка методов количественного определения эфавиренза в субстанции ($n=10$, $t(P, f)_{\text{табл}}=2,26$; $P=95\%$; $F(P, f_1, f_2)_{\text{табл}}=4,85$; $P=99\%$)

Наименование метода	μ	\bar{X} , %	S^2	S	$\bar{E}, \%$	$t_{\text{выч}}$	$F_{\text{выч}}$	Продолжительность анализа, мин.	Число операций
ВЭЖХ (НД)	100	99,96	1,8614	1,3643	0,98	0,10	1,31	35	7
Спектрофотометрия по калия феррицианиду	100	100,29	1,4240	1,1933	0,85	0,78		20	6
Спектрофотометрия по калия хромату	100	100,10	1,6801	1,2962	0,93	0,25	1,11	20	6

Полученные по разработанным методикам и методикам НД результаты хорошо согласуются. По величинам дисперсий результатов, полученных по разработанной методике, и методике, предложенной НД (табл. 27), был вычислен и сравnen с табличным значением критерия Фишера для соотношения воспроизводимости разработанных методик [16]. Спектрофотометрический метод определения эфавиренза по оптическому образцу сравнения дает правильные результаты. По продолжительности анализа разработанная методика менее длительна, чем методика НД.

Разработанные методики количественного анализа эфавиренза в субстанции были применены для определения количественного содержания эфавиренза в таблетках «Регаст» по 0,6 г.

Методика количественного определения эфавиренза в таблетках по 0,6 г, покрытых оболочкой: точная навеска порошка растертых покрытых оболочкой таблеток эфавиренза (около 0,1000 г) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 40 мл спирта 95%, объем раствора доводится водой очищенной до метки и перемешивается. Раствор фильтруется, первые 10 мл фильтрата отбрасываются. 1 мл полученного раствора помещается в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем раствора доводится до метки натрия гидроксида раствором 0,1 М и перемешивается. Измеряется оптическая плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 267 нм в кварцевой кювете с длиной рабочего слоя 10 мм. Натрия гидроксида раствор 0,1 М применяется в качестве раствора сравнения. Параллельно измеряется оптическая плотность растворов образцов сравнения калия феррицианида и калия хромата. Методика приготовления растворов оптических образцов сравнения приведена выше.

Результаты количественного анализа эфавиренза в таблетках, покрытых оболочкой, спектрофотометрическим методом трех серий по предложенным оптическим образцам сравнения представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Результаты количественного анализа эфавиренза в таблетках по 0,6 г, покрытых оболочкой, спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду и калия хромату (допустимое количество 92,5-107,5%)

Метрологические характеристики (n=10, P=95%)								
№ серии	Оптический образец сравнения	\bar{X} , %	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta \bar{X}$	$E\%$	S_r
393116	Калия феррицианид	99,77	1,3045	1,1421	0,3612	0,82	0,82	0,011
322116		99,69	1,4632	1,2096	0,3825	0,86	0,87	0,012
371116		99,44	1,0813	1,0399	0,3288	0,74	0,75	0,010
393116	Калия хромат	99,76	0,8696	0,9325	0,2949	0,67	0,67	0,009
322116		99,83	0,5602	0,7485	0,2367	0,53	0,54	0,007
371116		99,90	0,5315	0,7290	0,2305	0,52	0,52	0,007

Результаты сравнительной оценки методик количественного определения эфавиренза в таблетках по 0,6 г, покрытых оболочкой, по разработанной методике и методике НД [29] представлены в таблице 29.

Таблица 29 – Сравнительная оценка методов количественного определения эфавиренза в таблетках по 0,6 г, покрытых оболочкой ($n=10$, $t(P, f)_{(табл)}=2,26$; $P=95\%$; $F(P, f_1, f_2)_{(табл)}=4,85$; $P=99\%$)

Наименование метода	μ	$\bar{X}, \%$	S_2	S	$E, \%$	$t_{выч}$	$F_{выч}$	Продолжительность анализа мин.	Число операций
ВЭЖХ (НД)	100	99,97	1,5827	1,2581	0,90	0,08		45	7
Спектрофотометрия по калия феррицианиду	100	100,19	1,5600	1,2490	0,89	0,47	1,01	25	7
Спектрофотометрия по калия хромату	100	100,38	0,9417	0,9704	0,69	1,23	1,68	25	7

Установлено, что метод количественного определения эфавиренза в таблетках по 0,6 г, покрытых оболочкой, по калия феррицианиду спектрофотометрическим методом и метод НД дают правильные результаты ($t_{выч} < t_{табл}$) и не различаются по воспроизводимости ($F_{выч} < F_{табл}$).

Разработанные методики были валидированы по следующим основным показателям: линейность, прецизионность (сходимость, воспроизводимость), специфичность, аналитическая область методики.

Для установления диапазона аналитической области методики и линейности результатов были проанализированы модельные растворы эфавиренза шести уровней концентраций. Для оценки степени линейности рассчитывался коэффициент корреляции.

Представленная на рисунке 13 графическая зависимость оптической плотности от концентрации раствора эфавиренза в натрия гидроксида растворе 0,1 М линейна и описывается уравнением $y=55,99x+0,017$. Коэффициент корреляции равен 0,9997, что указывает на соблюдение линейности. Линейная зависимость наблюдается в интервале концентраций 2,5-25 мкг/мл.

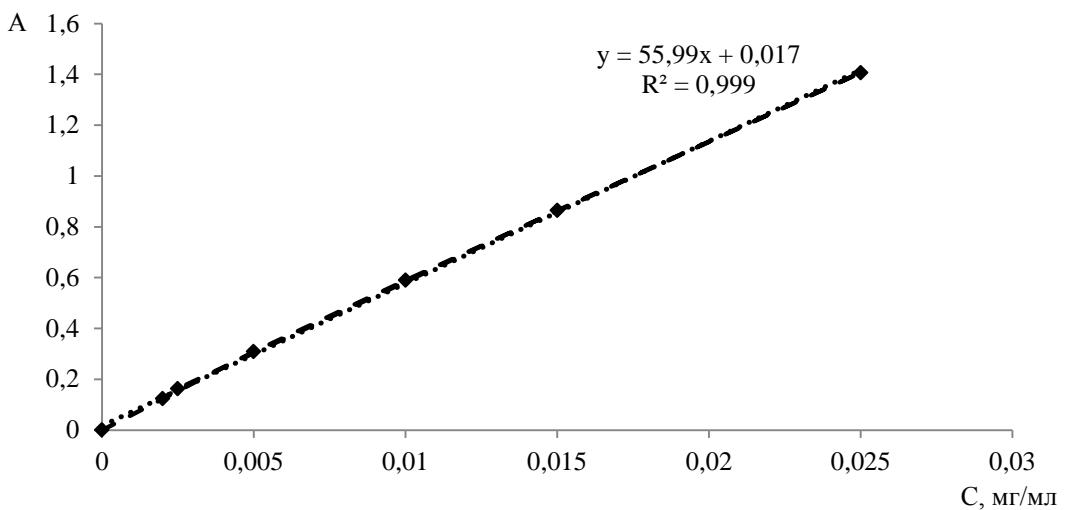


Рисунок 13 – Градиуровочная зависимость оптической плотности от концентрации эфавиренза в натрия гидроксида растворе 0,1 М

Оценка правильности предложенных методик осуществлялась путём приготовления модельных растворов эфавиренза с определенной концентрацией (80%, 100%, 120%) и дальнейшего определения содержания исследуемого действующего вещества в испытуемых растворах ($n=3$), используя в качестве внешних образцов сравнения калия феррицианид и калия хромат. В таблицах 30 и 31 представлены полученные результаты оценки правильности методик количественного определения эфавиренза в субстанции и таблетках, покрытых оболочкой по калия феррицианиду и калия хромату спектрофотометрическим методом.

Таблица 30 – Результаты оценки правильности методики спектрофотометрического определения субстанции эфавиренза по калия феррицианиду и калия хромату

Содержание эфавиренза, %	Оптический образец сравнения								Допустимое E, %	
	Калия феррицианид			E, %	Калия хромат			E, %		
	1	2	3		1	2	3			
80	80,52	80,42	80,11	0,66	79,73	79,63	79,32	0,67	< 2%	
100	99,53	99,33	99,74	0,51	99,35	99,14	99,48	0,43	< 2%	
120	120,45	120,84	120,19	0,67	119,52	118,69	119,05	0,87	< 2%	

Таблица 31 – Результаты оценки правильности методики спектрофотометрического определения эфавиренза в таблетках, покрытых оболочкой, по калия феррицианиду и калия хромату

Содержание эфавиренза, %	Оптический образец сравнения								Допустимое E, %	
	Калия феррицианид			E, %	Калия хромат			E, %		
	1	2	3		1	2	3			
80	79,83	80,13	79,91	0,48	80,02	80,38	80,10	0,59	< 2%	
100	99,97	100,34	100,51	0,68	100,21	100,65	100,82	0,78	< 2%	
120	120,90	121,05	121,25	0,36	119,97	120,35	119,71	0,67	< 2%	

Из анализа приведенных в таблицах 32 и 33 результатов можно сделать вывод, что метод внешнего стандарта для количественного анализа эфавиренза в субстанции и таблетках пригоден для получения достаточно надежных и воспроизводимых результатов.

Таблица 32 – Результаты валидации методик количественного определения эфавиренза спектрофотометрическим методом в субстанции

Параметры	Критерии валидности	Результаты испытания эфавиренза по оптическим образцам сравнения	
		Калия феррицианид	Калия хромат
Специфичность		Специфична	Специфична
2. Сходимость	RSD< 2% $t_{табл} \geq t_{выч}$	RSD=0,60 $t_{выч}=0,68$ ($t_{табл}=2,26$), n=10	RSD=0,57 $t_{выч}=0,67$ ($t_{табл}=2,26$), n=10
3. Воспроизводимость	RSD< 3% $t_{табл} \geq t_{выч}$	RSD=0,87 $t_{выч}=0,97$ ($t_{табл}=2,26$), n=10	RSD=0,66 $t_{выч}=1,10$ ($t_{табл}=2,26$), n=10
Линейность результатов	$R^2 \geq 0,99$	$R^2=0,9997$; $y=55,99x+0,017$	$R^2=0,9997$; $y=55,99x+0,017$
Аналитическая область методики	интервал концентраций	3-13 мкг/мл	3-13 мкг/мл

Таблица 33 – Результаты валидации методик количественного определения эфавиренза спектрофотометрическим методом в таблетках, покрытых оболочкой

Параметры	Критерии валидности	Результаты испытания эфавиренза по оптическим образцам сравнения	
		Калия феррицианид	Калия хромат
Специфичность		Специфична	Специфична
2.Сходимость	RSD< 2% $t_{табл} \geq t_{выч}$	RSD=0,82 $t_{выч}=0,64$ ($t_{табл}=2,26$), n=10	RSD=0,52 $t_{выч}=0,43$ ($t_{табл}=2,26$), n=10
3.Воспроизводимость	RSD< 3% $t_{табл} \geq t_{выч}$	RSD=0,87 $t_{выч}=0,81$ ($t_{табл}=2,26$), n=10	RSD=0,67 $t_{выч}=0,81$ ($t_{табл}=2,26$), n=10
Линейность результатов	$R^2 \geq 0,99$	$R^2=0,9997;$ $y=55,99x+0,017$	$R^2=0,9997;$ $y=55,99x+0,017$
Аналитическая область методики	интервал концентраций	3-13 мкг/мл	3-13 мкг/мл

Представленные методики количественного анализа эфавиренза в субстанции и таблетках, покрытых оболочкой, могут быть рекомендованы для включения в НД.

3.4. Оптимизация условий количественного анализа фторсодержащих лекарственных средств в лекарственных формах методом микроколоночной ВЭЖХ с многоволновой фотометрической детекцией

Для количественного анализа действующих веществ в таблетках офлоксацина, линезолида и эфавиренза был выбран обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ. Для проведения исследования применялся микроколоночный жидкостный хроматограф «Милихром А-02» отечественного производства ЗАО «ЭкоНова», Новосибирск.

Оптимальными условиями хроматографирования офлоксацина, линезолида и эфавиренза являются: хроматографическая колонка (75×2 мм), неподвижная фаза: полимерный сорбент ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (рН 2,8); элюент Б – ацетонитрил. Градиентный режим элюирования: 550 мкл 27% Б; 550 мкл от 27% до 100% Б; 900 мкл 100% Б (0-14 мин). Скорость потока подвижной

фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°С.

Для разработки методик количественного анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза методом ВЭЖХ необходимо обосновать выбор оптимальных хроматографических условий.

Выбор неподвижной фазы: за счет наличия атомов азота с неподеленной парой электронов, молекулы исследуемых веществ обладают основными свойствами, что является причиной асимметрии их пиков на хроматограмме при нейтральных рН среды элюента и отсутствии добавок, блокирующих остаточные силанольные группы. Следовательно, в работе применялся полимерный сорбент, который не проявляет ионообменных свойств по отношению к аминам, что приводит к получению симметричных хроматографических пиков.

Выбор подвижной фазы: подвижная фаза представляет собой смесь двух элюентов: элюент А – лития перхлората раствор 4 М в растворе хлорной кислоты 0,1 М – вода очищенная (5: 95); элюент Б – ацетонитрил. Градиент: 3700 мкл от 5% Б до 70% Б. Предложенные элюенты обладают в коротковолновой области УФ-спектра высокой прозрачностью и не содержат УФ-поглощающие примеси, которые проявляются на хроматограмме в виде «лишних» пиков. Лития перхлорат в составе подвижной фазы приводит к значительному улучшению формы хроматографических пиков протонированных аминов и уменьшению их ширины (рН 2,8), подавляя в присутствии катиона-конкурента Li^+ ионообменные взаимодействия с остаточными силанольными группами адсорбента [10].

Показано, что в предложенной системе элюентов пики исследуемых веществ хроматографируются в виде симметричных пиков. Доказательством этого являются величины коэффициентов асимметрии, рассчитанные на уровне 10% высоты пиков, не превышающие величину 1,5. Полученные данные представлены в таблице 34. Это свидетельствует об отсутствии значимых ионообменных взаимодействий в предложенной системе. Таким образом, данная хроматографическая система является оптимальной для хроматографического

анализа лекарственных веществ, способных к взаимодействию с открытыми силанольными группами сорбента.

Таблица 34 – Коэффициенты асимметрии офлоксацина, линезолида и эфавиренза

Исследуемое вещество	$A_{10\%}$
Офлоксацин	1,04
Линезолид	0,95
Эфавиренз	1,08

Выбор длин волн детектирования: для проведения регистрации УФ-спектров использовались стандартные растворы офлоксацина, линезолида и эфавиренза в метаноле с концентрацией 0,5 мг/мл. УФ-спектры регистрировались в течение анализа вблизи максимума пика с шагом 2 нм в интервале длин волн 200–360 нм. В ходе анализа применялось нормирование УФ-спектров с целью исключить зависимость от концентрации исследуемого вещества. Для нормирования УФ-спектров величина поглощения (A_x) при длине волны λ_x делилась на величину поглощения ($A_{баз}$) при базовой длине волны ($\lambda_{баз}$). Базовой длиной волны для нормирования УФ-спектров была выбрана 210 нм (т.к. для удобства выбирается длина волны максимального поглощения или близкая к ней) [27]. Нормированные УФ-спектры офлоксацина, линезолида и эфавиренза представлены на рисунках 14-16.

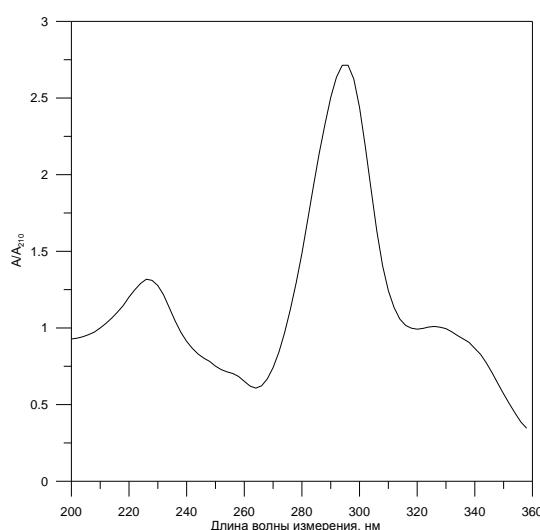


Рисунок 14 – Нормированный УФ-спектр раствора офлоксацина

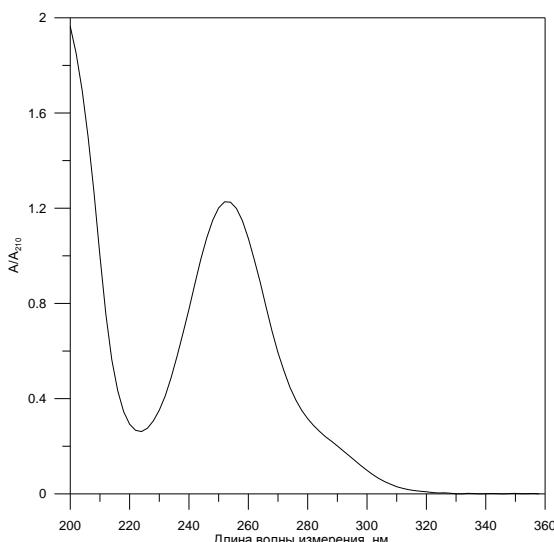


Рисунок 15 – Нормированный УФ-спектр раствора линезолида

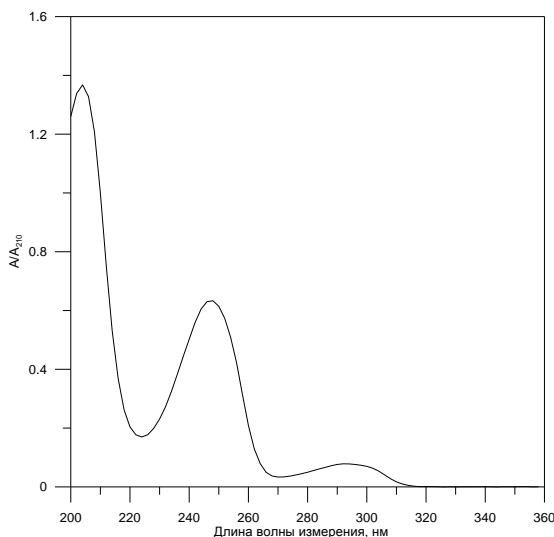


Рисунок 16 – Нормированный УФ-спектр раствора эфавиренза

Длины волн максимального поглощения и минимального поглощения исследуемых фторсодержащих веществ приведены в таблице 35.

Таблица 35 – Длины волн максимального и минимального поглощения офлоксацина, линезолида и эфавиренза

Исследуемое вещество	λ_{\max} , нм	λ_{\min} , нм
Офлоксацин	226, <u>296</u>	254, 318
Линезолид	196, <u>252</u>	224
Эфавиренз	<u>204</u> , 248, 292	224, 270

В таблице 36 приведены спектральные отношения для офлоксацина, линезолида и эфавиренза, рассчитанные как отношение площадей пиков, зарегистрированных при длинах волн λ_x и λ_{210} .

Дополнительные длины волн (220, 230, 240, 280 нм) применяются для расчета спектральных отношений, использование которых для идентификации пиков в реальных пробах существенно повышает надежность определения исследуемых компонентов [27].

Таблица 36 – Спектральные отношения для офлоксацина, линезолида и эфавиренза

Исследуемое вещество	Время удерживания, T_R , мкл	Спектральное отношение, $A(\lambda_x)/A(\lambda_{210})$						
		A_{220}/A_{210}	A_{230}/A_{210}	A_{240}/A_{210}	A_{250}/A_{210}	A_{260}/A_{210}	A_{280}/A_{210}	A_{300}/A_{210}
Офлоксацин	1539	1,191	1,259	0,882	0,725	0,626	1,413	2,289
Линезолид	1612	0,299	0,356	0,771	1,183	1,052	0,312	0,096
Эфавиренз	3449	0,205	0,234	0,505	0,614	0,208	0,050	0,069

На рисунках 17-19 приведены зарегистрированные при всех длинах волн хроматограммы стандартных растворов офлоксацина, линезолида и эфавиренза в метаноле с концентрацией 0,5 мг/мл.

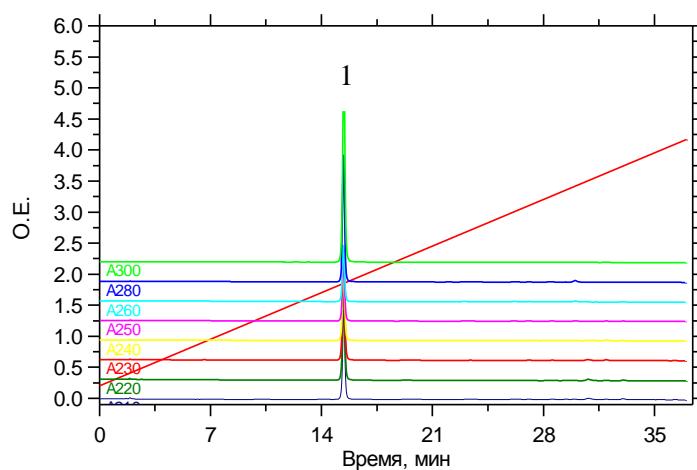


Рисунок 17 – Хроматограмма стандартного раствора офлоксацина в метаноле с концентрацией 0,5 мг/мл. Пик 1 – офлоксацин ($T_R = 1539$ мкл)

Времена удерживания офлоксацина, линезолида и эфавиренза составляют 15,39 мин, 16,12 мин и 34,49 мин соответственно.

Для количественного анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в лекарственных формах использовался метод внешнего стандарта.

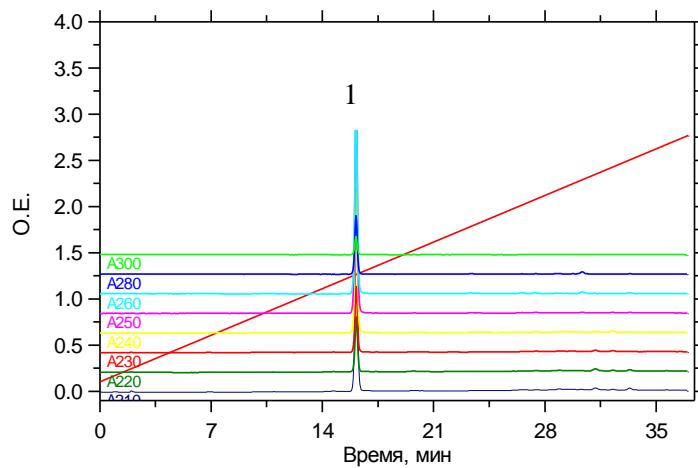


Рисунок 18 – Хроматограмма стандартного раствора линезолида в метаноле с концентрацией 0,5 мг/мл. Пик 1 – линезолид ($T_R = 1612$ мкл)

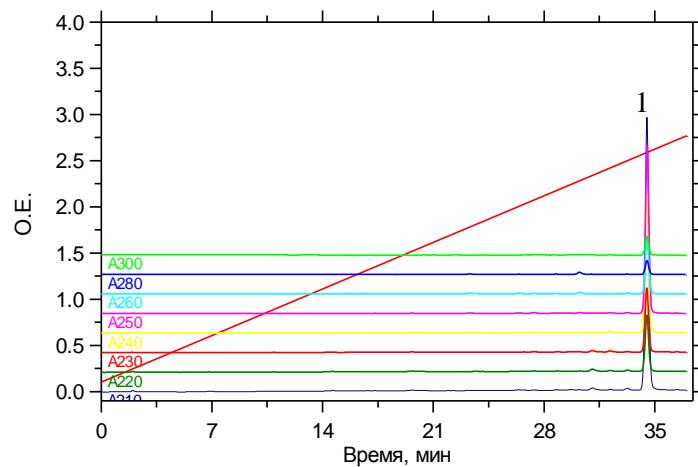


Рисунок 19 – Хроматограмма стандартного раствора эфавиренза в метаноле с концентрацией 0,5 мг/мл. Пик 1 – эфавиренз ($T_R = 3449$ мкл)

На рисунках 20-22 представлены зарегистрированные при всех длинах волн хроматограммы таблеток офлоксацина, линезолида и эфавиренза, покрытых оболочкой.

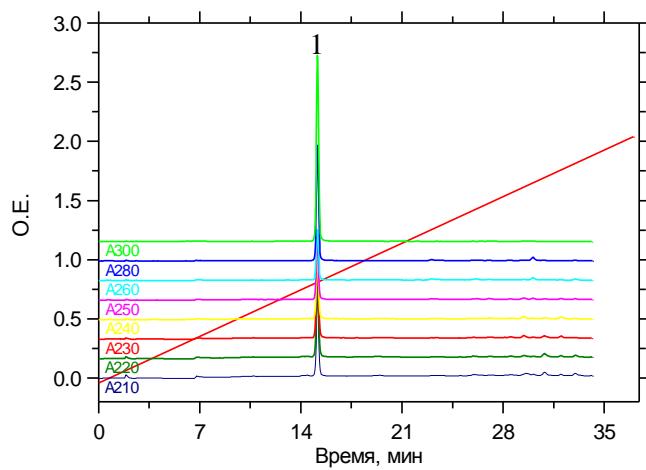


Рисунок 20 – Хроматограмма метанольного раствора готовой лекарственной формы таблеток «Офлоксацин» по 0,2 г. Пик 1 – офлоксацин

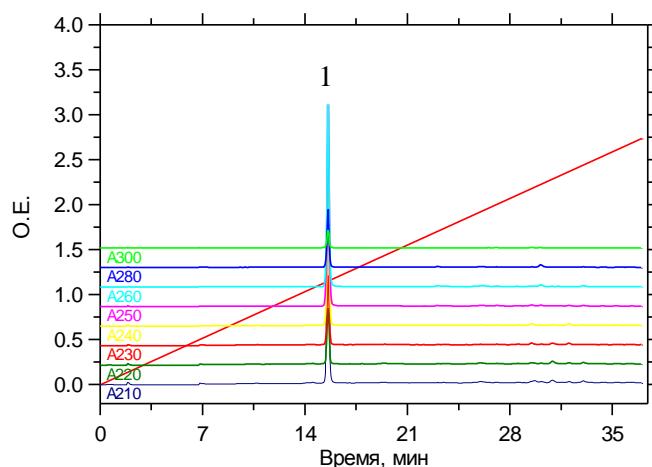


Рисунок 21 – Хроматограмма метанольного раствора готовой лекарственной формы таблеток «Амизолид» по 0,6 г. Пик 1 – линезолид

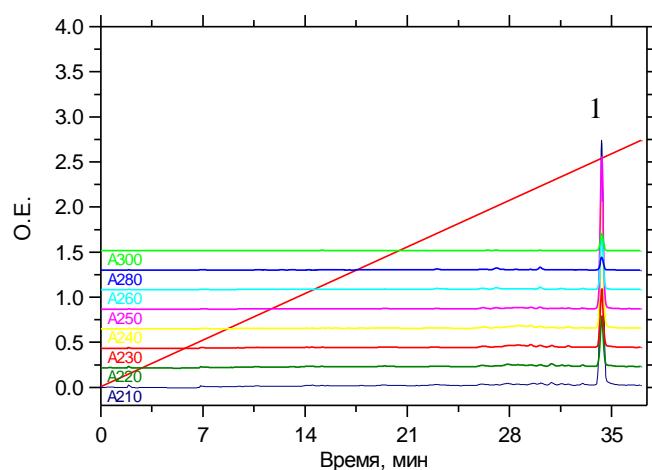


Рисунок 22 – Хроматограмма метанольного раствора готовой лекарственной формы таблеток «Регаст» по 0,6 г. Пик 1 – эфавиренз

Сравнение объемов удерживания и спектральных отношений пиков линезолида, офлоксацина и эфавиренза на хроматограммах готовых лекарственных форм «Амизолид», «Офлоксацин» и «Регаст», представленное в таблице 37, с соответствующими параметрами пиков хроматограмм стандартных растворов, показывает соответствие в пределах ошибки (различие величин спектральных отношений не превышает 0,05, а расхождение во временах удерживания не более 3%). Таким образом, на основании совпадения (в пределах ошибки) времен удерживания и спектральных отношений основных действующих веществ и соответствующих им субстанций можно сделать вывод, что компонентный состав исследованных лекарственных препаратов соответствует составу, заявленному производителем.

Таблица 37 – Сравнение объемов удерживания и спектральных отношений для офлоксацина, линезолида и эфавиренза в субстанции и таблетках, покрытых оболочкой

Торговое наименование	Действующее вещество	V _R , мкл	Спектральное отношение, A _{λx} /A _{λ210}							Примечание
			A ₂₂₀ /A ₂₁₀	A ₂₃₀ /A ₂₁₀	A ₂₄₀ /A ₂₁₀	A ₂₅₀ /A ₂₁₀	A ₂₆₀ /A ₂₁₀	A ₂₈₀ /A ₂₁₀	A ₃₀₀ /A ₂₁₀	
Амизолид	Линезолид	1598	0,295	0,365	0,781	1,200	1,052	0,309	0,094	Совп.
	Линезолид (ст)	1612	0,299	0,356	0,771	1,183	1,052	0,312	0,096	
Офлоксацин	Офлоксацин	1516	1,186	1,252	0,886	0,728	0,627	1,417	2,281	Совп.
	Офлоксацин (ст)	1539	1,191	1,259	0,882	0,725	0,626	1,413	2,289	
Регаст	Эфавиренз	3431	0,204	0,234	0,507	0,616	0,207	0,050	0,069	Совп.
	Эфавиренз (ст)	3449	0,205	0,234	0,505	0,614	0,208	0,050	0,069	

Примечание: V_R – объем удерживания.

Для обращенно – фазовой хроматографии зависимость времени удерживания органического соединения от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе имеет вид:

$$\lg k' = b - p \lg C, \quad (7)$$

где k' – коэффициент емкости; C – концентрация ацетонитрила в элюенте, моль/л; b и p – константы.

В связи с тем, что пара офорлоксацин – линезолид при градиенте 3700 мкл от 5% Б до 70% Б разделена не полностью, полное разделение этих соединений

может быть достигнуто при изменении формы градиента. Для линезолида и офлоксацина были записаны хроматограммы при различных концентрациях ацетонитрила в элюенте и рассчитаны соответствующие коэффициенты емкости. Экспериментальные данные для построения зависимости в координатах $\lg k' - \lg C$ представлены в таблице 38.

Таблица 38 – Результаты расчёта коэффициентов ёмкости офлоксацина и линезолида в зависимости от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе

Концентрация ацетонитрила в подвижной фазе,		$\lg C$	Линезолид		Офлоксацин	
%	моль/л		k'	$\lg k'$	k'	$\lg k'$
18	3,453	0,538	5,95	0,7745	5,46	0,7372
20	3,837	0,584	4,52	0,6551	3,97	0,5988
25	4,796	0,681	2,62	0,4183	2,18	0,3385

Зависимости удерживания от концентрации ацетонитрила представлены на рисунке 23.

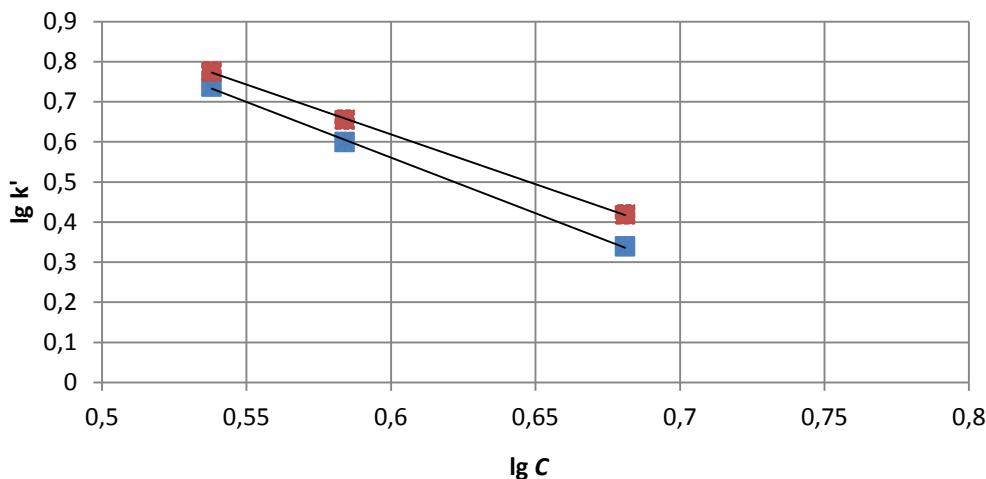


Рисунок 23 – График зависимости времени удерживания линезолида (■) и офлоксацина (□) от концентрации ацетонитрила в элюенте

Из диаграммы видно, что разрешение линезолида и офлоксацина увеличивается с увеличением концентрации ацетонитрила.

Для построения градуировочной зависимости времени удерживания от силы сигнала при совместном присутствии этих соединений (и эфавиренза) был выбран следующий режим элюирования: 550 мкл 27% Б; 550 мкл от 27% до 100% Б; 900 мкл 100% Б. В этих условиях пики линезолида и офлоксацина разделены до базовой линии (рис. 24).

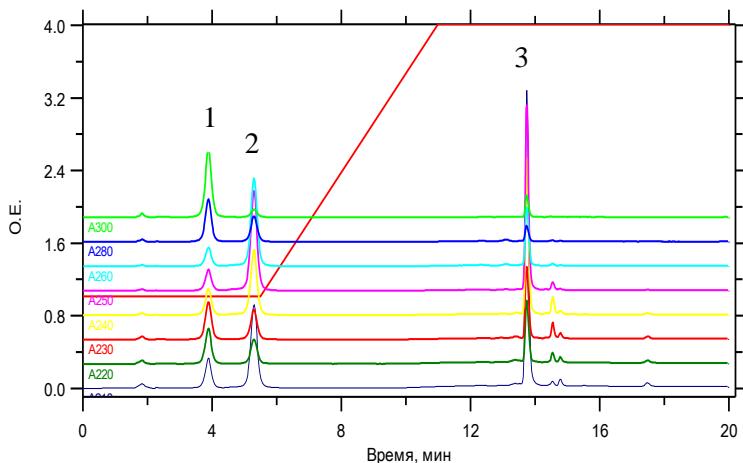


Рисунок 24 – Хроматограмма стандартного раствора офлоксацина, линезолида и эфавиренза в метаноле, 0,3 мг/мл по каждому компоненту. Пики: 1 – офлоксацин; 2 – линезолид; 3 – эфавиренз

Подобранные хроматографические условия использовались для разработки методик количественного анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в таблетках, покрытых оболочкой.

Методика количественного определения офлоксацина в таблетках по 0,2 г, покрытых оболочкой, методом ВЭЖХ: точная навеска таблеточной массы офлоксацина (около 0,7500 г) помещается в пробирку вместимостью 20 мл, прибавляется 10 мл метанола, плотно закрывается, взбалтывается в течение 20 мин и обрабатывается на ультразвуковой бане в течение 10 мин. Аликвота суспензии объемом 1 мл переносится в пробирку и центрифугируется (13400 об/мин, 5 мин). Аликвота полученного раствора объемом 100 мкл переносится в чистую пробирку, добавляется 900 мкл метанола. Полученный раствор вводится в хроматографическую колонку в объеме 2 мкл.

Методика приготовления раствора РСО офлоксацина: точная масса субстанции офлоксацина (около 0,0500 г) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 80 мл метанола, объем раствора доводится до метки этим же растворителем, перемешивается. Полученный раствор вводится в хроматографическую колонку в объеме 2 мкл.

Последовательно хроматографируются испытуемый раствор и раствор РСО офлоксацина. Условия хроматографического анализа: неподвижная фаза – ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (рН 2,8); элюент Б: ацетонитрил. Режим элюирования: градиентный – 550 мкл 27% Б, 550 мкл от 27% - 100% Б, 900 мкл 100% Б. Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки 40°С.

Методика количественного определения линезолида в таблетках по 0,6 г, покрытых оболочкой, методом ВЭЖХ: точная навеска таблеточной массы линезолида (около 0,2500 г) помещается в пробирку вместимостью 20 мл, прибавляется 10 мл метанола, плотно закрывается, взбалтывается в течение 20 мин и обрабатывается на ультразвуковой бане в течение 10 мин. Аликвота суспензии объемом 1 мл переносится в пробирку и центрифугируется (13400 об/мин, 5 мин). Аликвота полученного раствора объемом 100 мкл переносится в чистую пробирку, добавляется 900 мкл метанола. Полученный раствор вводится в хроматографическую колонку в объеме 2 мкл.

Методика приготовления раствора РСО линезолида: точная масса субстанции линезолида (около 0,0500 г) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 80 мл метанола, объем раствора доводится до метки этим же растворителем, перемешивается. Полученный раствор вводится в хроматографическую колонку в объеме 2 мкл.

Последовательно хроматографируются испытуемый раствор и раствор РСО линезолида. Условия хроматографического анализа: неподвижная фаза ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (рН 2,8); элюент Б: ацетонитрил. Режим элюирования: градиентный – 550 мкл 27% Б, 550 мкл от 27% - 100% Б, 900 мкл 100% Б. Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°С.

Методика количественного определения эфавиренза в таблетках по 0,6 г, покрытых оболочкой, методом ВЭЖХ: точная навеска таблеточной массы

эфавиренза (около 0,2500 г) помещается в пробирку вместимостью 20 мл, прибавляется 10 мл метанола, плотно закрывается, взбалтывается в течение 20 мин и обрабатывается на ультразвуковой бане в течение 10 мин. Аликвота суспензии объемом 1 мл переносится в пробирку и центрифугируется (13400 об/мин, 5 мин). Аликвота полученного раствора объемом 100 мкл переносится в чистую пробирку, добавляется 900 мкл метанола. Полученный раствор вводят в хроматографическую колонку в объеме 2 мкл.

Методика приготовления раствора РСО эфавиренза: точная масса субстанции эфавиренза (около 0,0500 г) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 80 мл метанола, объем раствора доводится до метки этим же растворителем, перемешивается. Полученный раствор вводится в хроматографическую колонку в объеме 2 мкл.

Последовательно хроматографируются испытуемый раствор и раствор РСО эфавиренза. Условия хроматографического анализа: неподвижная фаза ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (рН 2,8); элюент Б: ацетонитрил. Режим элюирования: градиентный – 550 мкл 27% Б, 550 мкл от 27% - 100% Б, 900 мкл 100% Б. Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°C.

Расчет результатов количественного содержания веществ (Х, мкг) методом ВЭЖХ проводится по формуле:

$$X = \frac{S \cdot C_{cm}}{S_{cm}}, \quad (8)$$

где S_{cm} – площадь пика стандартного раствора, S – площадь пика испытуемого вещества, C_{cm} – концентрация стандартного раствора, мкг/мл.

По результатам хроматографического исследования рассчитано содержание линезолида, офлоксацина и эфавиренза в таблетках, покрытых оболочкой (табл. 39).

Таблица 39 – Результаты количественного анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в таблетках, покрытых оболочкой, методом ВЭЖХ

Лекарственная форма	№ серии	\bar{X} , мг	Метрологические характеристики (n=7, P=95%)						
			$\bar{X}, \%$	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta\bar{X}, \%$	E%	Sr
Офлоксацин таблетки, покрытые оболочкой, по 200 мг	030516	201,33	100,67	1,96	1,28	0,48	1,18	1,18	0,013
	020116	197,50	98,75	1,70	1,30	0,49	1,21	1,22	0,013
	010218	199,33	99,67	1,16	1,08	0,41	1,00	1,00	0,011
Линезолид таблетки, покрытые оболочкой, по 600 мг	150916	601,15	100,19	1,38	1,17	0,44	1,09	1,08	0,012
	120916	598,32	99,72	0,96	0,98	0,37	0,91	0,91	0,010
	140916	598,97	99,83	1,28	1,13	0,43	1,05	1,05	0,011
Эфавиренз таблетки, покрытые оболочкой, По 600 мг	393116	595,75	99,29	2,21	1,49	0,56	1,38	1,39	0,015
	322116	596,03	99,34	1,42	1,19	0,45	1,10	1,11	0,012
	371116	595,52	99,25	1,52	1,23	0,47	1,14	1,15	0,012

Разработанные методики были валидированы по следующим основным показателям: линейность, прецизионность (сходимость, воспроизводимость), специфичность, аналитическая область методики.

Для оценки правильности предложенных методик были приготовлены модельные растворы офлоксацина, линезолида и эфавиренза различной концентрации (80%, 100%, 120%) от заявленного количества в таблетках, покрытых оболочкой, и проведены определения содержания исследуемого действующего вещества в испытуемых растворах (n=3) методом ВЭЖХ (табл. 40).

Таблица 40 – Результаты оценки правильности методики количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в субстанции методом ВЭЖХ

Содержание, %	ВЭЖХ				Допустимое Е, %	
	Офлоксацин					
	1	2	3	E, %		
80	80,15	80,81	79,94	1,40	< 2%	
100	100,78	100,25	99,51	1,58	< 2%	
120	120,85	119,81	121,22	1,51	< 2%	
Линезолид						
	1	2	3	E, %		
80	79,89	79,94	80,86	1,69	< 2%	
100	100,04	101,11	100,55	1,32	< 2%	
120	119,79	120,38	119,73	1,42	< 2%	
Эфавиренз						
	1	2	3	E, %		
80	80,04	80,36	79,50	1,35	< 2%	
100	101,41	100,59	100,53	1,21	< 2%	
120	120,90	119,90	121,25	1,44	< 2%	

Приготовление растворов для построения градуировочной зависимости

1. Методика приготовления стандартного раствора офлоксацина с концентрацией 4,0 мг/мл для построения градуировочной зависимости: готовятся 3 стандартных раствора офлоксацина в метаноле с концентрацией 4 мг/мл, для чего в каждую из 3-х мерных колб объемом 50 мл помещается точная навеска предварительно растертых таблеток (328,5 мг) офлоксацина (400 мг) и добавляется в каждую около 30 мл метанола. Для полного растворения действующего вещества колбы обрабатываются в ультразвуковой ванне в течение 15–20 мин (до полного рассыпания таблетки), доводятся до метки метанолом. Аликвота объемом около 10 мл центрифугируется (13400 об/мин, 10 мин). Методом разбавления готовятся стандартные растворы для градуировки с концентрацией по офлоксации 0,6, 0,3, 0,15, 0,1 и 0,05 мг/мл.

2. Методика приготовления стандартного раствора линезолида с концентрацией 4,0 мг/мл для построения градуировочной зависимости: готовятся 3 стандартных раствора линезолида в метаноле с концентрацией 4 мг/мл, для чего в каждую из 3-х мерных колб объемом 50 мл помещается одна таблетка амизолида (200 мг) и добавляется в каждую около 30 мл метанола. Для полного растворения действующего вещества колбы обрабатываются в ультразвуковой ванне в течение 15–20 мин (до полного рассыпания таблетки), доводятся до метки метанолом. Аликвота объемом около 10 мл центрифугируется (13400 об/мин, 10 мин). Методом разбавления готовятся стандартные растворы для градуировки с концентрацией по линезолиду 0,6, 0,3, 0,15, 0,1 и 0,05 мг/мл.

3. Методика приготовления стандартного раствора эфавиренза с концентрацией 4,0 мг/мл для построения градуировочной зависимости: готовятся 3 стандартных раствора эфавиренза в метаноле с концентрацией 4 мг/мл, для чего в каждую из 3-х мерных колб объемом 50 мл помещается одна таблетка стокрина (200 мг) и добавляется около 30 мл метанола. Для полного растворения действующего вещества колбы обрабатываются в ультразвуковой ванне в течение 15–20 мин (до полного рассыпания таблетки), доводятся до метки метанолом. Аликвота объемом около 10 мл центрифугируется (13400 об/мин, 10 мин). Методом разбавления готовятся стандартные растворы для градуировки с концентрацией по эфавирензу 0,6, 0,3, 0,15, 0,1 и 0,05 мг/мл.

Линейность метода оценивалась, анализируя градуировочные графики, построенные по данным количественного определения модельных растворов офлоксацина, линезолида и эфавиренза с различными концентрациями. Каждый раствор для градуировки хроматографируется 3 раза. Затем рассчитываются площади пиков определяемых компонентов, находится среднее значение площади пика для каждой концентрации и обрабатываются результаты в программе «Microsoft Excel» для получения уравнения градуировочной зависимости. Концентрация определяемого соединения в хроматографируемом растворе рассчитывается по градуировочному уравнению.

Метод обеспечивает хорошую линейность с коэффициентом корреляции 1,0

для офлоксацина в интервале от 0,05 до 0,6 мг/мл; 0,998 для линезолида в промежутке концентраций от 0,05 до 0,6 мг/мл; 1,0 для эфавиренза в промежутке концентраций 0,05 до 0,6 мг/мл. Градуировочные графики построены по данным, находящимся в таблицах 41-43, и представлены на рисунках 25-27.

Таблица 41 – Данные для построения градуировочного графика зависимости площади пика раствора офлоксацина от концентрации

Концентрация офлоксацина в растворе, мг/мл	Значение площади пика на хроматограмме, усл.ед·сек (объем пробы 2 мкл, $\lambda=300$ нм)	Среднее значение площади пика, усл.ед·сек (объем пробы 2 мкл, $\lambda=300$ нм)
0,6	34,802 34,892 35,779	35,158
0,3	17,374 17,752 17,824	17,65
0,15	8,814 9,059 8,945	8,939
0,1	5,86 5,891 6,008	5,920
0,05	3,056 3,011 3,040	3,036

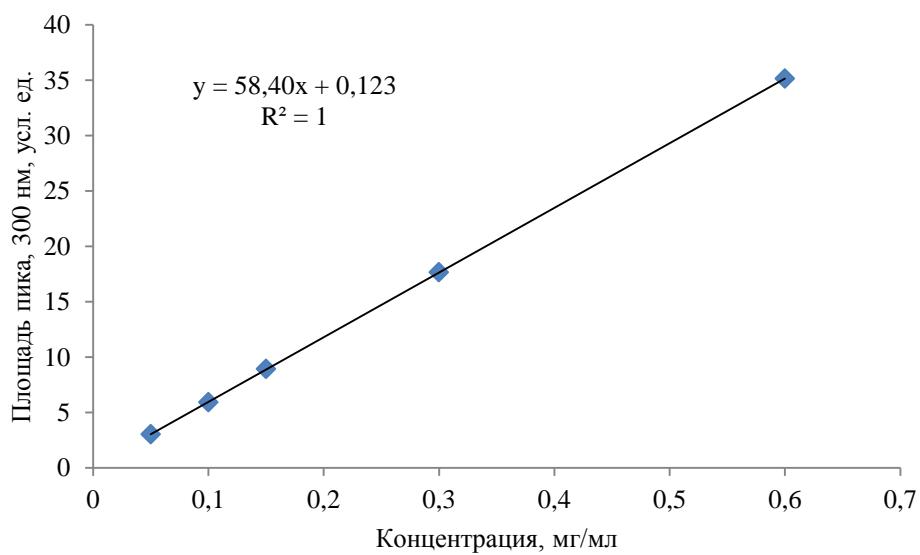


Рисунок 25 – Градуировочный график зависимости площади пика раствора офлоксацина от концентрации

Таблица 42 – Данные для построения градуировочного графика зависимости площади пика раствора линезолида от концентрации

Концентрация линезолида в растворе, мг/мл	Значение площади пика на хроматограмме, усл.ед·сек (объем пробы 2 мкл, $\lambda=250$ нм)	Среднее значение площади пика, усл.ед·сек (объем пробы 2 мкл, $\lambda=250$ нм)
0,6	55,556 53,887 55,011	54,818
0,3	25,483 25,392 26,064	25,646
0,15	13,648 13,308 13,517	13,491
0,1	9,337 9,753 9,429	9,506
0,05	5,008 4,827 4,843	4,893

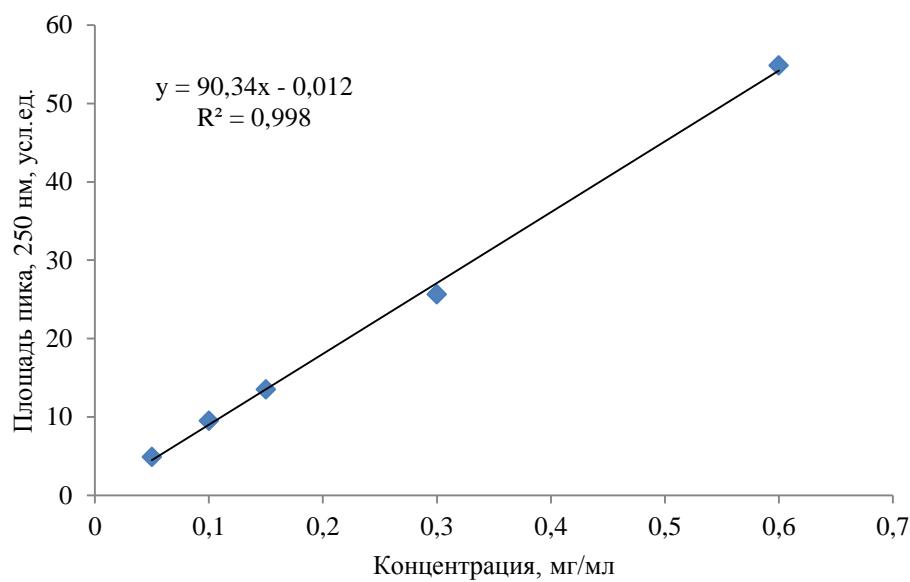


Рисунок 26 – Градуировочный график зависимости площади пика раствора линезолида от концентрации

Таблица 43 – Данные для построения градуировочного графика зависимости площади пика раствора эфавиренза от концентрации

Концентрация эфавиренза в растворе, мг/мл	Значение площади пика на хроматограмме, усл.ед·сек (объем пробы 2 мкл, $\lambda=250$ нм)	Среднее значение площади пика, усл.ед·сек (объем пробы 2 мкл, $\lambda=250$ нм)
0,6	51,034 52,119 52,132	51,762
0,3	25,718 26,691 26,307	26,239
0,15	13,046 13,065 13,371	13,161
0,1	9,139 8,766 9,061	8,989
0,05	4,408 4,581 4,408	4,466

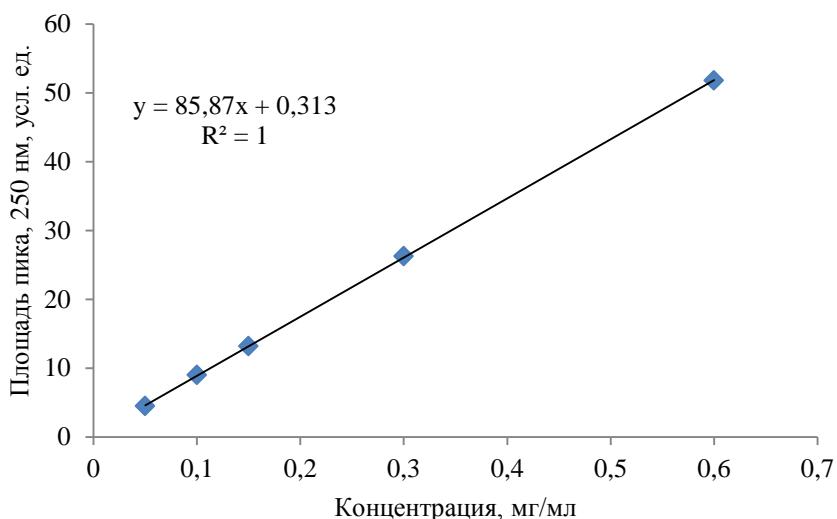


Рисунок 27 – Градуировочный график зависимости площади пика раствора эфавиренза от концентрации

Полученные результаты, представленные в таблице 44, свидетельствуют о пригодности предложенных методик.

Таблица 44 – Результаты валидации методик количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в таблетках, покрытых оболочкой, методом ВЭЖХ

Параметры	Критерии	Результаты испытания		
		Офлоксацин	Линезолид	Эфавиренз
Специфичность		Методика специфична	Методика специфична	Методика специфична
Пригодность хроматографической системы				
Эффективность колонки	не менее 3000 т.т.	4000 т.т.	4000 т.т.	4000 т.т.
Коэффициент асимметрии пика	не более 2	1,04	0,95	1,08
Прецизионность: Сходимость $t_{\text{табл}} \geq t_{\text{выч}}$	RSD≤ 2,0% ($t_{\text{табл}} = 2,45$), n=7	1,00 $t_{\text{выч}} = 0,81$	1,05 $t_{\text{выч}} = 0,40$	1,11 $t_{\text{выч}} = 1,47$
Воспроизводимость $t_{\text{табл}} \geq t_{\text{выч}}$	RSD≤ 3,0% ($t_{\text{табл}} = 2,45$), n=7	1,18 $t_{\text{выч}} = 1,38$	1,08 $t_{\text{выч}} = 0,43$	1,15 $t_{\text{выч}} = 1,61$
Линейность результатов	$R^2 \geq 0,990$	$R^2 = 1$ $y = 58,40x + 0,123$	$R^2 = 0,998$ $y = 90,34x - 0,012$	$R^2 = 1$ $y = 85,87x + 0,313$
Стабильность раствора	индивидуально	В течение суток	В течение суток	В течение суток

Из представленных данных можно сделать вывод, что разработанные методики количественного определения таблеток офорлоксацина, линезолида и эфавиренза методом ВЭЖХ позволяют определять содержание в них действующего вещества. Внедрение разработанных методик в практику позволит уменьшить стоимость анализа и трудоемкость, а также повысить воспроизводимость результатов количественного определения исследуемой группы фторсодержащих лекарственных веществ.

Сравнительная оценка результатов количественного анализа офорлоксацина, линезолида и эфавиренза в таблетках, покрытых оболочкой, полученных методами УФ-спектрофотометрии с использованием оптических образцов сравнения и ВЭЖХ (таблицы 11, 19, 28 и 38) показала, что получены близкие результаты. Предложенные методики рекомендованы для включения в НД на исследуемые лекарственные формы в качестве альтернативных.

Выводы по главе

1. Определены оптимальные условия спектрофотометрического определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза (оптимальный растворитель: хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М для офлоксацина, спирт 95% для линезолида и натрия гидроксида раствор 0,1 М для эфавиренза; аналитическая длина волны: 293 нм для офлоксацина, 258 нм для линезолида, 267 нм для эфавиренза; оптические образцы сравнения: калия феррицианид для офлоксацина, калия феррицианид для линезолида, калия феррицианид и калия хромат для эфавиренза; уравнение линейности: $y=84,03x+0,008$; $R^2=0,9997$ – для офлоксацина, $y=54,22x+0,017$; $R^2=0,9995$ – для линезолида, $y=55,99x+0,017$; $R^2=0,9997$ – для эфавиренза).

2. Разработаны и предложены методики спектрофотометрического определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в субстанции и таблетках, покрытых оболочкой, с использованием оптических образцов сравнения калия феррицианида и калия хромата. Относительная погрешность определения офлоксацина в субстанции не превышает 0,88%, в таблетках, покрытых оболочкой – 1,11%. Относительная погрешность определения линезолида в субстанции не превышает 0,73%, в таблетках, покрытых оболочкой – 1,28%. Относительная погрешность количественного анализа эфавиренза в субстанции спектрофотометрическим методом по оптическим образцам сравнения не превышает 0,87%, в таблетках, покрытых оболочкой – 0,87%.

3. Выявлены преимущества методики спектрофотометрического определения по оптическим образцам сравнения: хорошая воспроизводимость, отсутствие высокотоксичных реагентов, доступность и экспрессность анализа.

4. Проведена валидация методик количественного анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в субстанциях и таблетках, покрытых оболочкой, методом УФ-спектрофотометрии по оптическим образцам сравнения по критериям валидности: сходимость, воспроизводимость, специфичность, правильность, линейность результатов и аналитическая область методики. Полученные результаты свидетельствуют о пригодности разработанных методик

для количественного анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в субстанции и таблетках, покрытых оболочкой.

5. Оптимизированы хроматографические условия количественного анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза методом ВЭЖХ: хроматографическая колонка (75×2 мм), неподвижная фаза: полимерный сорбент ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (рН 2,8); элюент Б – ацетонитрил. Градиентный режим элюирования: 550 мкл 27% Б; 550 мкл от 27% до 100% Б; 900 мкл 100% Б (0-14 мин). Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°C.

6. Разработаны унифицированные методики количественного анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в лекарственных формах методом ВЭЖХ с применением отечественного микроколоночного жидкостного хроматографа «Милихром А-02». Относительная погрешность количественного анализа офлоксацина в таблетках, покрытых оболочкой, не превышает 1,22 %, линезолида в таблетках, покрытых оболочкой – 1,08%, эфавиренза в таблетках, покрытых оболочкой – 1,39%.

7. Проведена сравнительная оценка методик количественного анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в таблетках, покрытых оболочкой, УФ-спектрофотометрическим и ВЭЖХ методами, которая показала, что при применении обоих методов были получены близкие результаты и они могут быть предложены в качестве альтернативных для количественного анализа исследуемых фторсодержащих действующих веществ в таблетках, покрытых оболочкой.

8. Разработаны проекты изменений ФСП на субстанции и таблетки, покрытые оболочкой, офлоксацина, линезолида и эфавиренза с внесением разработанных методик в показатели «Количественное определение».

Глава 4. ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОФЛОКСАЦИНА, ЛИНЕЗОЛИДА И ЭФАВИРЕНЗА ПРИ КОМБИНИРОВАННЫХ ОТРАВЛЕНИЯХ

Количественному определению найденных химико-токсикологическим анализом веществ придаётся очень большое значение, и оно наряду с качественным анализом является обязательным для постановки заключения об обнаружении того или иного ядовитого вещества. Помимо классических аналитических методов, применяемых в токсикологической химии (весовыми, объёмными), всё больше находят применение физико-химические методы. В данной главе рассматривается возможность применения спектрофотометрических и хроматографических методов для разработки методик, пригодных для ХТА.

Для разработки методик изолирования в качестве биологического объекта была выбрана моча. Выбор объекта анализа основывался на следующих причинах: низкое содержание белков; моча может быть получена в достаточном количестве; в связи с тем, что большинство веществ экскретируется из организма с мочой, концентрация токсикантов и (или) метаболитов в ней, как правило, высока [8].

Проведенный анализ литературы и НД по контролю качества офлоксацина [19], линезолида [13; 14] и эфавиренза [29; 30] показал, что рекомендованным методом количественного определения исследуемых лекарственных препаратов является метод ВЭЖХ. Несмотря на то, что офлоксацин и линезолид широко применяется в антибактериальной терапии, а эфавиренз в комплексной антиретровирусной терапии, и встречаются случаи отравления данными препаратами [46; 70; 76; 82; 88; 91; 145], исследование литературы показало, что в ней отсутствуют данные об их химико-токсикологическом исследовании. Следовательно, разработка методик изолирования, обнаружения и количественного определения исследуемых лекарственных веществ из объектов биологического происхождения для целей химико-токсикологического и судебно-химического анализа, является важной задачей.

Для разработки методик экстракции офлоксацина, линезолида и эфавиренза из биологических объектов использовался метод ЖЖЭ. Так как ЖЖЭ является одним из самых низкоэнергоемких химико-технологических процессов, данный метод является эффективным и распространённым методом в ХТА, и может успешно конкурировать с иными массообменными процессами.

В ходе работы было изучено влияние нескольких факторов на степень экстракции офлоксацина, линезолида и эфавиренза из растворов: природа органического растворителя, pH среды, присутствие электролита, время и кратность экстракции.

Для определения степени изолирования веществ использовался метод ВЭЖХ. Условия хроматографического определения разработаны ранее и описаны в главе 3.

4.1. Оптимизация условий изолирования офлоксацина, линезолида и эфавиренза из модельного образца мочи

Для разработки методик изолирования необходимо рассмотреть химическую структуру исследуемых веществ. По химическому строению офлоксацин является веществом основного характера, так как содержит в своей структуре атомы азота, обладающие основными свойствами, характеризуется гидрофобностью из-за наличия в структуре атомов фтора, циклов и других гидрофобных фрагментов. Линезолид по химической структуре относится к производным оксазолидинона, поэтому, при изменении pH раствора происходит образование солевых форм по группам как основного, так и кислотного характера. Эфавиренз по химической структуре относится к производным бензоксазина, обладает слабыми кислотными свойствами и характеризуется гидрофобностью за счёт наличия трёх атомов фтора и других фрагментов структуры.

Выбор оптимального растворителя для экстракции основывается на растворимости исследуемых веществ в воде и органических растворителях. Подробно данные о растворимости офлоксацина, линезолида и эфавиренза представлены в главе 2. Следовательно, для растворения офлоксацина выбран хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М, линезолида – спирт 95%, эфавиренза

– натрия гидроксида раствор 0,1 М. Кроме того, данные растворители обеспечивают необходимую стабильность приготовленных растворов (Глава 3. Рис. 2, 6, 10).

Изучение растворимости офлоксацина, линезолида и эфавиренза показало, что эти лекарственные вещества хорошо растворяются в следующих органических растворителях: хлороформ, дихлорметан, эфир диэтиловый, этилацетат, толуол, бензол, поэтому эти растворители выбраны для изучения процесса экстракции.

В зависимости от pH раствора исследуемые вещества будут находиться в молекулярном или диссоцииированном состоянии, что приведёт к увеличению или уменьшению степени экстракции в органический растворитель. pH растворов варьировалась от 2 до 12 путём добавления хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М или аммиака раствора 10%.

На рисунке 28 представлены результаты экспериментальных исследований степени извлечения офлоксацина из растворов от органического растворителя и pH среды.

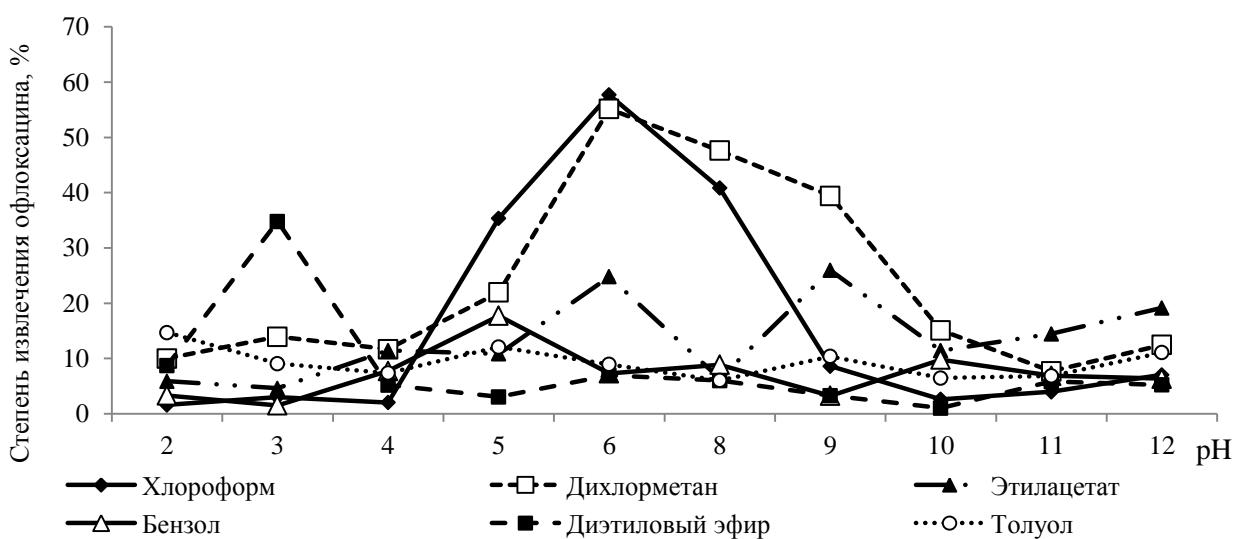


Рисунок 28 – График зависимости степени извлечения офлоксацина из растворов от органического растворителя и pH среды

Определено, что для экстракции офлоксацина из растворов оптимальными органическими растворителями являются хлороформ и дихлорметан, которые проявляют максимальную извлекающую способность при pH 6. Степень

извлечения офлоксацина из растворов составляет $57,69 \pm 0,45\%$ хлороформом и $55,16 \pm 0,34\%$ дихлорметаном.

Следующим этапом экспериментальных исследований являлось изучение влияния электролита на степень извлечения офлоксацина из растворов (рис. 29).

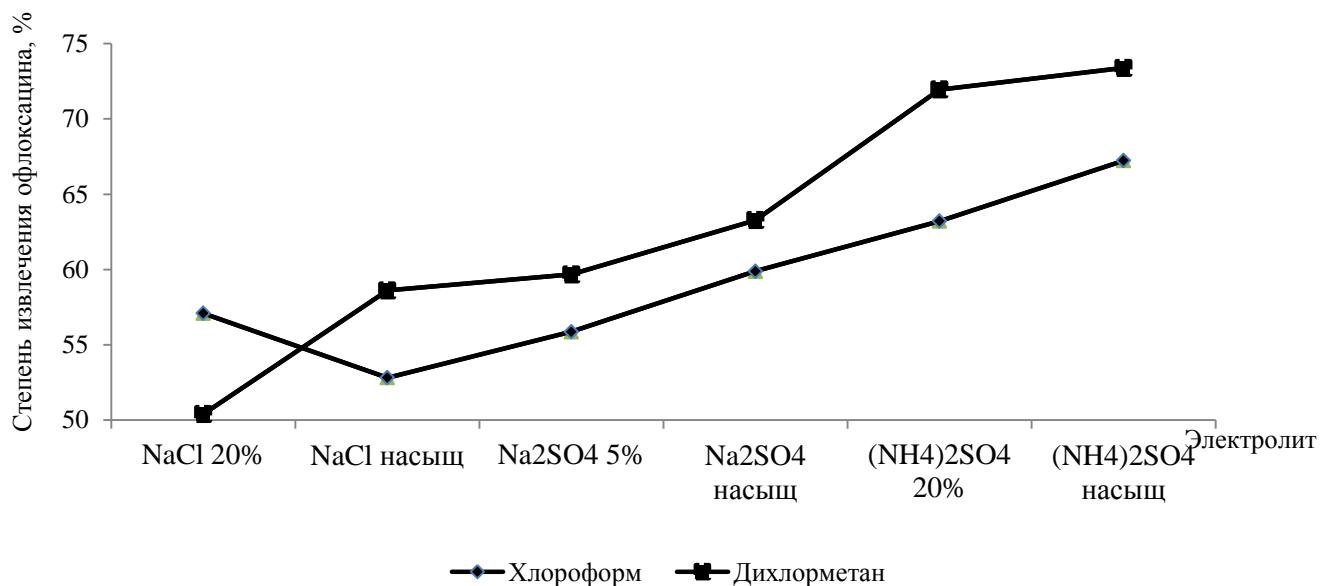


Рисунок 29 – График зависимости степени извлечения офлоксацина из растворов от добавляемого электролита

Изучение влияния электролита на степень экстракции офлоксацина показало, что аммония сульфата насыщенный раствор обладает высаливающим действием. Добавление данного электролита приводит к повышению извлекаемого вещества при применении хлороформа до $67,23 \pm 0,21\%$, дихлорметана – до $73,39 \pm 0,25\%$. Всаливающим действием для офлоксацина обладает натрия хлорида насыщенный раствор в случае экстракции хлороформом и натрия хлорида раствор 20% в случае экстракции дихлорметаном.

Затем для разработки методики было проведено определение влияния на степень извлечения офлоксацина из растворов времени и кратности экстрагирования (табл. 45, 46).

Таблица 45 – Результаты определения степени извлечения офлоксацина из растворов в зависимости от времени экстракции хлороформом и дихлорметаном

Время, мин	Степень извлечения хлороформом, %	Степень извлечения дихлорметаном, %
3	67,23±0,21	73,39±0,25
5	63,32±0,33	63,50±0,41
7	65,93±0,48	72,69±0,17

Таблица 46 – Результаты определения степени извлечения офлоксацина из растворов в зависимости от кратности экстракции хлороформом и дихлорметаном в течение трех мин

Кратность	Степень извлечения хлороформом, %	Степень извлечения дихлорметаном, %
Однократная	67,23±0,21	73,39±0,25
Двукратная	92,77±0,44	80,16±0,38
Трехкратная	82,21±0,59	85,51±0,47

Экспериментально доказано, что наилучшие результаты достигнуты при двукратном экстрагировании хлороформом и трёхкратном экстрагировании дихлорметаном в течение трех мин. За этот промежуток времени большинство молекул офлоксацина переходит в органическую фазу, а данное количество ступеней экстракции за счёт поступления свежих порций растворителей обеспечивает наибольшую полноту извлечения вещества.

На основании проведенных исследований была разработана методика изолирования офлоксацина из модельного образца мочи.

Методика изолирования офлоксацина из модельного образца мочи: 25 мл мочи, содержащей раствор таблеток офлоксацина в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М, настаивается при комнатной температуре в колбе вместимостью 100 мл в течение 24 часов и периодическом взбалтывании на приборе Шейкер S-3.08L. 1 мл модельного образца мочи помещается в пробирку, pH среды доводится до pH 6 аммиака раствором 10%, добавляется аммония сульфата насыщенного раствора 1 мл и хлороформ/дихлорметан 3 мл. Содержимое пробирки помещается в делительную воронку и взбалтывается в течение 3 мин. Слой экстрагента отделяется после разделения фаз. Экстракция проводится

повторно 3 мл хлороформа, и дважды 3 мл в случае экстрагирования дихлорметаном, извлечения объединяются. Растворители удаляются при комнатной температуре. Сухой остаток, полученный после испарения экстрагента, растворяется в 10 мл хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М и доводится до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл (для 0,2 г офлоксацина) или 50 мл (для 1,0 г и 2,0 г офлоксацина). 1 мл приготовленного раствора переносится в мерную колбу вместимостью 50 мл (для 0,2 г офлоксацина) или 100 мл (для 1,0 г и 2,0 г офлоксацина) и доводится до объема хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М. Степень экстракции офлоксацина определяется методом ВЭЖХ на отечественном хроматографе «Милихром А-02» с использованием предложенных оптимальных условий хроматографического исследования анализируемых смесей: неподвижная фаза: ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (рН 2,8), элюент Б: ацетонитрил. Режим элюирования: линейный градиент – 3700 мкл 5% - 70% Б. Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°C.

Методика приготовления раствора РСО офлоксацина: точная масса субстанции офлоксацина (около 0,0500 г) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 80 мл метанола, доводится объем раствора до метки, перемешивается. Полученный раствор вводится в колонку в объеме 2 мкл.

В таблицах 47 и 48 представлены результаты определения степени извлечения офлоксацина из модельного образца мочи.

Таблица 47 – Определение степени извлечения офлоксацина хлороформом из модельного образца мочи методом ВЭЖХ

Добавлено исследуемого вещества, г	n	f	\bar{X} , %	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta \bar{X}$	E, %	CV
0,2	6	5	72,70	0,29	0,54	0,22	0,56	0,77	0,74
1,0	6	5	73,21	0,36	0,60	0,25	0,63	0,86	0,82
2,0	6	5	76,64	0,12	0,34	0,14	0,36	0,47	0,44

Примечание: CV – коэффициент вариации.

Таблица 48 – Определение степени извлечения офлоксацина дихлорметаном из модельного образца мочи методом ВЭЖХ

Добавлено исследуемого вещества, г	n	f	\bar{X} , %	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta\bar{X}$	E, %	CV
0,2	6	5	79,98	0,51	0,72	0,29	0,75	0,94	0,90
1,0	6	5	75,94	0,23	0,48	0,20	0,50	0,66	0,63
2,0	6	5	74,69	0,15	0,39	0,16	0,41	0,55	0,53

В ходе проведённого исследования было определено, что из модельного образца мочи при экстракции хлороформом изолируется от 71,91% до 77,18% офлоксацина и от 74% до 80,87% при извлечении дихлорметаном.

Валидационная оценка методики, проведённая по показателям прецизионности и правильности [23], подтвердила пригодность разработанной методики для анализа, следовательно, она может быть рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа офлоксацина.

Согласно представленным на рисунке 30 данным, наибольшей извлекающей способностью обладают этилацетат и дихлорметан. Этилацетат извлекает в максимальном количестве линезолид при pH 5, дихлорметан при pH 4 соответственно. Степень экстракции линезолида из растворов составляет $80,66 \pm 0,33\%$ этилацетатом при pH 5 и $87,1 \pm 0,24\%$ дихлорметаном при pH 4.

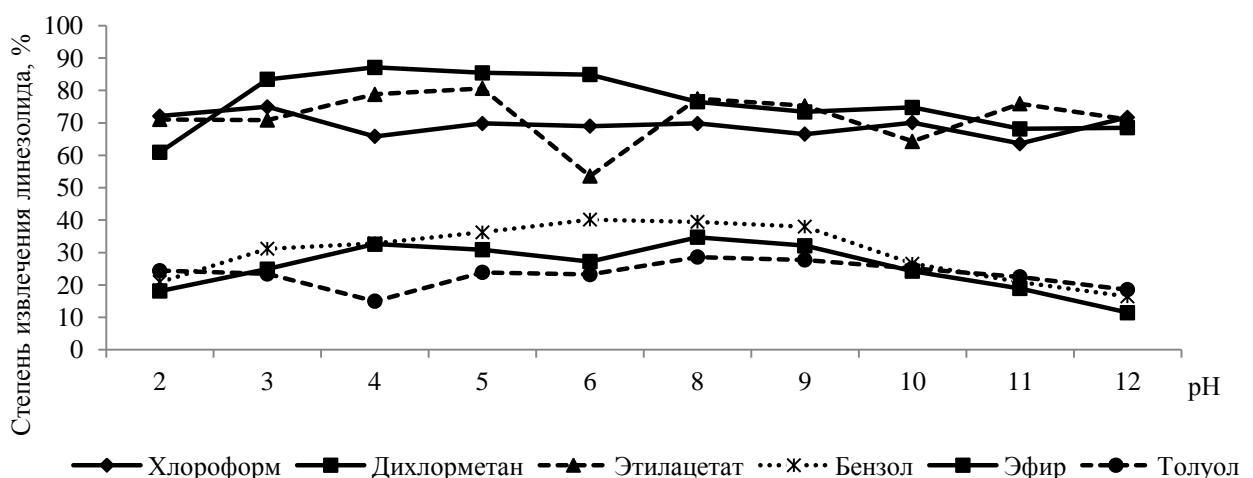


Рисунок 30 – График зависимости степени извлечения линезолида из растворов от органического растворителя и pH среды

При исследовании влияния электролита было установлено, что добавление аммония сульфата насыщенного раствора приводит к повышению количества извлекаемого вещества при применении этилацетата до $84,55\pm0,39\%$, дихлорметана – до $90,32\pm0,20\%$. Натрия сульфата раствор 5% проявил всаливающее действие как в случае экстракции этилацетатом, так и в случае экстракции дихлорметаном (рис. 31).

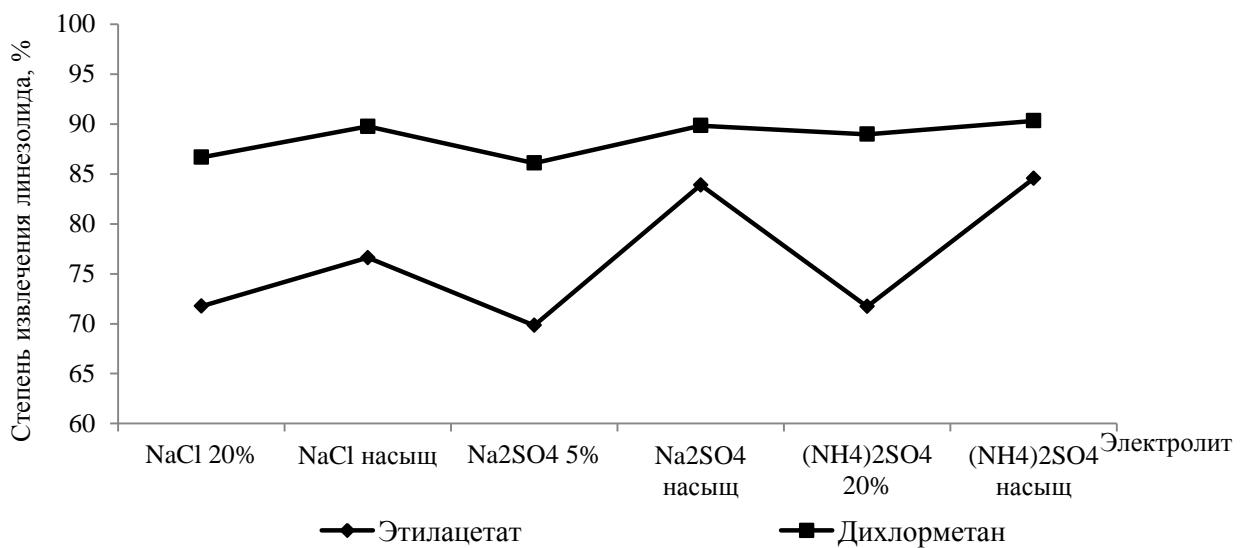


Рисунок 31 – График зависимости степени извлечения линезолида из растворов от добавляемого электролита

Изменение времени и кратности экстрагирования по-разному отражается на степень экстракции линезолида. Полученные данные по исследованию влияния данных факторов на степень экстракции представлены в таблицах 49, 50.

Из представленных данных следует, что наибольший выход линезолида (%) достигается при двукратном экстрагировании этилацетатом в течение 7 мин и дихлорметаном в течение 5 мин.

Таблица 49 – Результаты определения степени извлечения линезолида из растворов в зависимости от времени экстракции этилацетатом и дихлорметаном

Время, мин	Степень извлечения этилацетатом, %	Степень извлечения дихлорметаном, %
3	$84,55\pm0,41$	$90,32\pm0,35$
5	$85,23\pm0,23$	$92,47\pm0,15$
7	$87,34\pm0,50$	$90,66\pm0,27$

Таблица 50 – Результаты определения степени извлечения линезолида из растворов в зависимости от кратности экстракции этилацетатом в течение семи мин и дихлорметаном в течение пяти мин

Кратность	Степень извлечения этилацетатом, %	Степень извлечения дихлорметаном, %
Однократная	87,34±0,45	92,47±0,64
Двукратная	92,87±0,21	96,10±0,28
Трехкратная	88,40±0,52	93,50±0,17

Подобраные условия использовались для разработки методики изолирования линезолида из модельного образца мочи.

Методика изолирования линезолида из модельного образца мочи: 25 мл мочи, содержащей раствор таблеток линезолида в спирте 95%, настаивается при комнатной температуре в колбе вместимостью 100 мл в течение 24 часов и периодическом взбалтывании на приборе Шейкер S-3.08L. 1 мл (для 0,2 г линезолида) или 0,5 мл (для 1,0 г и 2,0 г линезолида) модельного образца мочи помещается в пробирку, pH среды доводится до pH 5 или pH 4 хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М соответственно, добавляется аммония сульфата насыщенного раствор 1 мл и этилацетат/дихлорметан 3 мл. Содержимое пробирки помещается в делительную воронку и взбалтывается в течение 7 мин/5 мин. Слой экстрагента отделяется после разделения фаз. Экстракция проводится повторно 3 мл этилацетатом/дихлорметаном, извлечения объединяются. Растворители удаляются при комнатной температуре. Полученный после испарения экстрагента сухой остаток растворяется в 10 мл спирта 95% и доводится до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл этим же растворителем. Аликовтная часть полученного раствора 2 мл (для 0,2 г линезолида) или 1 мл (для 1,0 г и 2,0 г линезолида) переносится в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводится до объема 100 мл спиртом 95%. Степень экстракции линезолида определяется методом ВЭЖХ на отечественном хроматографе «Милихром А-02» с использованием предложенных оптимальных условий хроматографического исследования анализируемых смесей: неподвижная фаза: ProntoSIL-120-5-C18

AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (рН 2,8), элюент Б: ацетонитрил. Режим элюирования: линейный градиент – 3700 мкл 5% - 70% Б. Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°C.

Методика приготовления раствора РСО линезолида: точная масса субстанции линезолида (около 0,0500 г) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 80 мл метанола, объем раствора доводится до метки, перемешивается. Полученный раствор вводится в колонку в объеме 2 мкл.

Полученные данные определения степени изолирования линезолида из модельного образца мочи представлены в таблицах 51 и 52.

Таблица 51 – Определение степени извлечения линезолида этилацетатом из модельного образца мочи методом ВЭЖХ

Добавлено исследуемого вещества, г	n	f	\bar{X} , %	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta \bar{X}$	E, %	CV
0,2	6	5	81,78	0,34	0,59	0,24	0,61	0,75	0,72
1,0	6	5	72,19	0,26	0,51	0,21	0,53	0,74	0,70
2,0	6	5	84,13	0,44	0,66	0,27	0,69	0,82	0,78

Таблица 52 – Определение степени извлечения линезолида дихлорметаном из модельного образца мочи методом ВЭЖХ

Добавлено исследуемого вещества, г	n	f	\bar{X} , %	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta \bar{X}$	E, %	CV
0,2	6	5	88,90	0,66	0,81	0,33	0,85	0,96	0,91
1,0	6	5	79,33	0,27	0,52	0,21	0,54	0,69	0,65
2,0	6	5	81,78	0,39	0,62	0,25	0,65	0,80	0,76

Как свидетельствуют полученные данные, из модельного образца мочи при экстракции этилацетатом изолируется от 71,53% до 84,86% линезолида и от 78,56% до 89,98% при извлечении дихлорметаном.

Полученные результаты валидационной оценки методики [23] подтверждают её пригодность, следовательно, разработанная методика может быть

рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа линезолида.

Исследуя влияние природы органического растворителя и pH среды на извлечение эфавиренза, было установлено, что эфир диэтиловый и дихлорметан являются оптимальными органическими растворителями и экстрагируют эфавиренз в максимальном количестве при pH 3 и 2 соответственно. Степень извлечения эфавиренза из растворов составляет $81,30 \pm 0,53\%$ эфиrom диэтиловым при pH 3 и $80,80 \pm 0,43\%$ дихлорметаном при pH 2 (рис. 32).

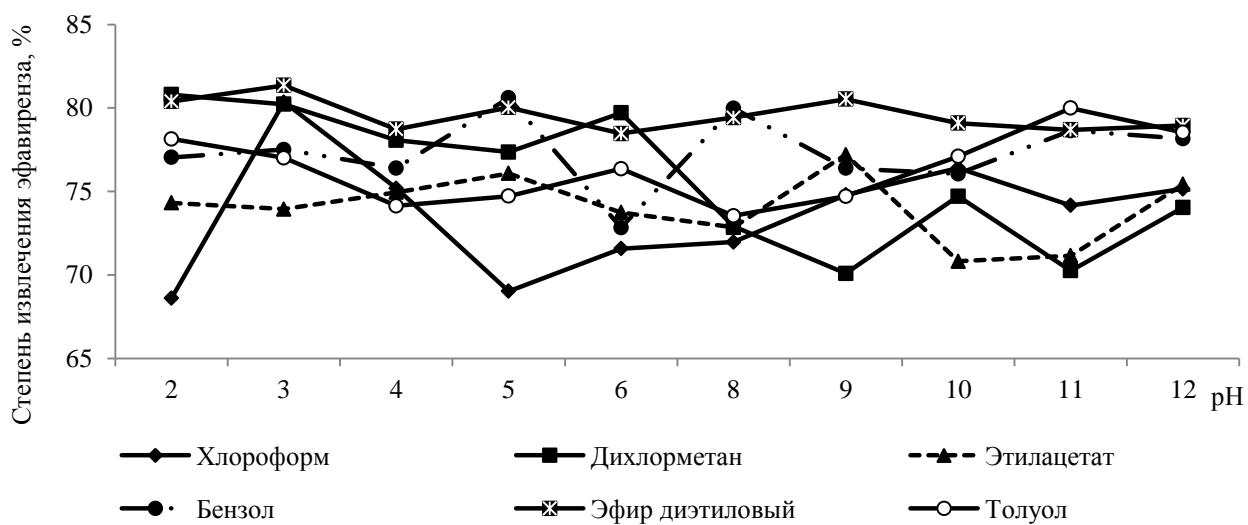


Рисунок 32 – График зависимости степени извлечения эфавиренза из растворов от органического растворителя и pH среды

Прибавление к испытуемому раствору электролитов приводило как к увеличению извлекающей способности органических растворителей, так и к уменьшению. Так, добавление натрия хлорида раствора 20% приводит к повышению количества эфавиренза при применении эфира диэтилового до $85,27 \pm 0,32\%$. Натрия хлорида насыщенный раствор улучшает экстрагируемость извлекаемого вещества при применении в качестве органического растворителя дихлорметана до $85,16 \pm 0,26\%$. Аммония сульфата насыщенный раствор проявил всаливающее действие в случае экстракции эфиrom диэтиловым, а при экстракции дихлорметаном всаливателем является аммония сульфата раствор

20%. Экспериментальные данные исследования влияния электролита на степень экстракции эфавиренза изображены в виде диаграммы (рис. 33).

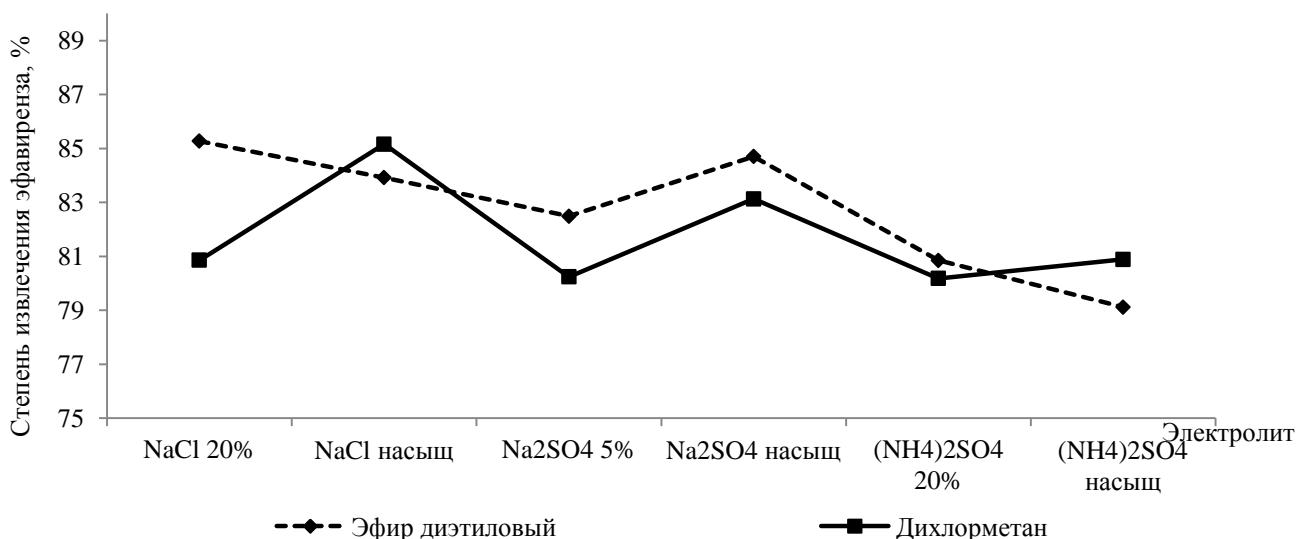


Рисунок 33 – График зависимости степени извлечения эфавиренза из растворов от добавляемого электролита

Влияние изменения времени и кратности экстракции на процесс извлечения эфавиренза представлено в таблицах 53 и 54.

Таблица 53 – Результаты определения степени извлечения эфавиренза из растворов в зависимости от времени экстракции эфиром диэтиловым и дихлорметаном

Время, мин	Степень извлечения эфиром диэтиловым, %	Степень извлечения дихлорметаном, %
3	85,27±0,32	85,16±0,26
5	84,83±0,13	86,86±0,12
7	85,90±0,71	88,21±0,14

Таблица 54 – Результаты определения степени извлечения эфавиренза из растворов в зависимости от кратности экстракции эфиром диэтиловым в течение трех мин и дихлорметаном в течение семи мин

Кратность	Степень извлечения эфиром диэтиловым, %	Степень извлечения дихлорметаном, %
Однократная	85,27±0,32	88,21±0,14
Двукратная	88,00±0,11	87,94±0,23
Трехкратная	89,17±0,18	91,58±0,10

Согласно полученным результатам, можно сделать вывод, что максимальная экстракция достигается при трехкратном экстрагировании эфиром диэтиловым в течение 3 мин и дихлорметаном в течение 7 мин.

Таким образом, используя предложенные оптимальные условия экстрагирования, была разработана методика изолирования эфавиренза из модельного образца мочи.

Методика изолирования эфавиренза из модельного образца мочи: 25 мл мочи, содержащей раствор таблеток эфавиренза в спирте 95%, настаивается при комнатной температуре в колбе вместимостью 100 мл в течение 24 часов и периодическом взбалтывании на приборе Шейкер S-3.08L. 1 мл (для 0,2 г эфавиренза) или 0,5 мл (для 1,0 г и 2,0 г эфавиренза) модельного образца мочи помещается в пробирку, pH среды доводится до pH 3 или pH 2 хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М соответственно, натрия хлорида раствор 20%/натрия хлорида насыщенного раствор 1 мл и эфир диэтиловый/дихлорметан 3 мл. Содержимое пробирки помещается в делительную воронку и взбалтывается в течение 3 мин/7 мин. Экстракция проводится трижды по 3 мл эфиром диэтиловым/дихлорметаном. Слой экстрагента отделяется после разделения фаз, извлечения объединяются. Растворители удаляются при комнатной температуре. Полученный после испарения экстрагента сухой остаток растворяется в 10 мл спирта 95% и доводится до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл этим же растворителем. Аликвотная часть полученного раствора 2 мл (для 0,2 г эфавиренза) или 1 мл (для 1,0 г и 2,0 г эфавиренза) переносится в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводится до объема 100 мл натрия гидроксида раствором 0,1 М. Степень экстракции эфавиренза определяется методом ВЭЖХ на отечественном хроматографе «Милихром А-02» с использованием предложенных оптимальных условий хроматографического исследования анализируемых смесей: неподвижная фаза: ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (pH 2,8), элюент Б: ацетонитрил. Режим элюирования: линейный градиент – 3700 мкл 5% - 70% Б. Скорость потока подвижной фазы –

100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°C.

Методика приготовления раствора РСО эфавиренза: точная масса субстанции эфавиренза (около 0,0500 г) помещается в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяется в 80 мл метанола, доводится объем раствора до метки, перемешивается. Полученный раствор вводится в колонку в объеме 2 мкл.

В таблицах 55 и 56 изображены результаты количественного определения эфавиренза после извлечения из модельного образца мочи.

Таблица 55 – Определение степени извлечения эфавиренза эфиром диэтиловым из модельного образца мочи методом ВЭЖХ

Добавлено исследуемого вещества, г	n	f	\bar{X} , %	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta \bar{X}$	E, %	CV
0,2	6	5	76,35	0,14	0,37	0,15	0,39	0,51	0,49
1,0	6	5	74,59	0,21	0,45	0,19	0,48	0,64	0,60
2,0	6	5	84,46	0,25	0,50	0,20	0,52	0,62	0,59

Таблица 56 – Определение степени извлечения эфавиренза дихлорметаном из модельного образца мочи методом ВЭЖХ

Добавлено исследуемого вещества, г	n	f	\bar{X} , %	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	$\Delta \bar{X}$	E, %	CV
0,2	6	5	81,67	0,39	0,62	0,25	0,65	0,80	0,76
1,0	6	5	75,27	0,31	0,56	0,23	0,59	0,78	0,74
2,0	6	5	84,29	0,24	0,49	0,20	0,51	0,60	0,58

Из анализа приведенных в вышепредставленных таблицах результатов определено, что из модельного образца мочи при экстракции эфиром диэтиловым изолируется от 73,94% до 85,21% эфавиренза и от 74,45% до 84,94% при извлечении дихлорметаном.

Проведенная валидационная оценка [23] показала пригодность методики для анализа, следовательно, разработанная методика может быть рекомендована для химико-токсикологического и судебно-химического анализа эфавиренза.

Выводы по главе

1. Исследовано влияние природы органического растворителя и pH среды на экстракцию офлоксацина, линезолида и эфавиренза из растворов. Для анализа применялись следующие органические растворители: хлороформ, дихлорметан, эфир диэтиловый, этилацетат, толуол, бензол. Установлено, что дихлорметан является оптимальным органическим растворителем для экстракции всех исследуемых веществ, извлекающий в максимальном количестве офлоксацин при pH 6, линезолид – при pH 4, эфавиренз – при pH 2. Кроме того, для изолирования офлоксацина предложен хлороформ при pH 6, для линезолида – этилацетат при pH 5, для эфавиренза – эфир диэтиловый при pH 3.

2. Определено влияние растворов электролитов на экстракцию офлоксацина, линезолида и эфавиренза из растворов. Установлено, что аммония сульфата насыщенный раствор увеличивает экстракцию офлоксацина и линезолида, натрия хлорида раствор 20% и натрия хлорида раствор насыщенный – эфавиренз при извлечении эфиром диэтиловым и дихлорметаном соответственно.

3. Увеличение времени экстракции до 5 мин увеличило степень экстракции линезолида при двукратном экстрагировании дихлорметаном, до 7 мин – степень экстракции линезолида при двукратном экстрагировании этилацетатом, а также эфавиренза при трехкратном экстрагировании дихлорметаном. Не изменяется уровень экстракции при увеличении времени экстракции, но повышается при изменении кратности экстракции – при двукратной и трехкратной экстракции офлоксацина при применении хлороформа и дихлорметана, эфавиренза – при трехкратной экстракции эфиром диэтиловым.

4. Разработанные методики были использованы для изолирования офлоксацина, линезолида и эфавиренза из модельного образца мочи с использованием ЖЖЭ. Степень извлечения офлоксацина из модельного образца мочи составляет от 74,00% до 80,87% при экстракции дихлорметаном и от 71,91% до 77,18% при экстракции хлороформом; при экстракции этилацетатом изолируется от 71,53% до 84,86% линезолида и от 78,56% до 89,98% при извлечении дихлорметаном; при экстракции эфиром диэтиловым изолируется от 73,94% до 85,21% эфавиренза и от 74,45% до 84,94% при извлечении дихлорметаном.

ГЛАВА 5. ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В КОМБИНАЦИЯХ С ДРУГИМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Идентификация лекарственных веществ, близких по структуре, является одной из самых сложных задач токсикологической химии. Для разделения смесей таких веществ и их идентификации применяются высокочувствительные и высокоселективные методы. К таким методам анализа относятся хроматографические методы анализа, в том числе ТСХ. В литературе имеются сведения об анализе индивидуальных лекарственных веществ (в том числе и хроматографическом), однако отсутствуют сведения об анализе их сочетаний. В связи с этим, поиск унифицированных условий хроматографирования различных сочетаний этих лекарственных веществ является важной и актуальной задачей.

5.1. Разделение и идентификация офлоксацина, линезолида и эфавиренза в комбинированных сочетаниях с лекарственными средствами различных фармакологических групп методом ТСХ

На начальном этапе исследования была определена хроматографическая подвижность офлоксацина, линезолида, эфавиренза и лекарственных средств других фармакологических групп – амитриптилина, дифенгидрамина, имипрамина, морфина, прокаина, рифампицина и фенобарбитала в общих системах растворителей, наиболее часто применяемых в ХТА для обнаружения веществ основного характера [7].

Разделение определяемых веществ на определенные группы, локализованные в хроматографические зоны, является критерием выбора общих систем растворителей.

В качестве общих систем для выбора условия разделения использовались:

I. Бензол – диоксан – аммиака раствор концентрированный 25% (12:7:1);

II. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1);

III. Хлороформ – спирт 95% – аммиака раствор концентрированный 25% (30:30:1);

IV. Толуол – ацетон – аммиака раствор концентрированный 25% (50:50:1);

V. Этилацетат – ацетон – спирт 95% – аммиака раствор концентрированный 25% (50:45:4:1);

VI. Спирт 95% – аммиака раствор концентрированный 25% (49,25:0,75);

VII. Этилацетат – метанол – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1).

В таблице 57 представлены результаты проведенных экспериментов.

Таблица 57 – Значения R_f исследуемых веществ в общих системах растворителей

Исследуемое вещество	Значение R_f в системе (n=6)						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Эфавиренз	0,65	0,51	0,86	0,89	0,86	0,72	0,92
Офлоксацин	0,01	0,01	0,30	0,01	0,01	0,02	0,19
Линезолид	0,40	0,33	0,88	0,33	0,93	0,78	0,55
Морфин	0,01	0,15	0,71	0,10	0,22 *	0,33	0,27
Амитриптилин	0,55	0,72	0,88	0,60	0,56	0,33	0,71
Прокайн	0,01	0,82	0,85	0,50	0,66	0,56	0,87; 0,78
Имипрамин	0,45	0,68	0,82	0,85	0,76	0,38	0,78
Рифампицин	0,03	0,01	0,38;0,53	0,08 *	0,15*	0,34*	0,30*
Дифенгидрамин	0,51 *	0,81	0,01	0,38	0,58	0,52	0,83
Фенобарбитал	0,56 *	0,44	0,71	0,25 *	0,60	0,54*	0,43 *

Примечание: Системы растворителей:

I. Бензол – диоксан – аммиака раствор концентрированный 25% (12:7:1);

II. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1);

III. Хлороформ – спирт 95% – аммиака раствор концентрированный 25% (30:30:1);

IV. Толуол – ацетон – аммиака раствор концентрированный 25% (50:50:1);

V. Этилацетат – ацетон – спирт 95% – аммиака раствор концентрированный 25% (50:45:4:1);

VI. Спирт 95% – аммиака раствор концентрированный 25% (49,25:0,75);

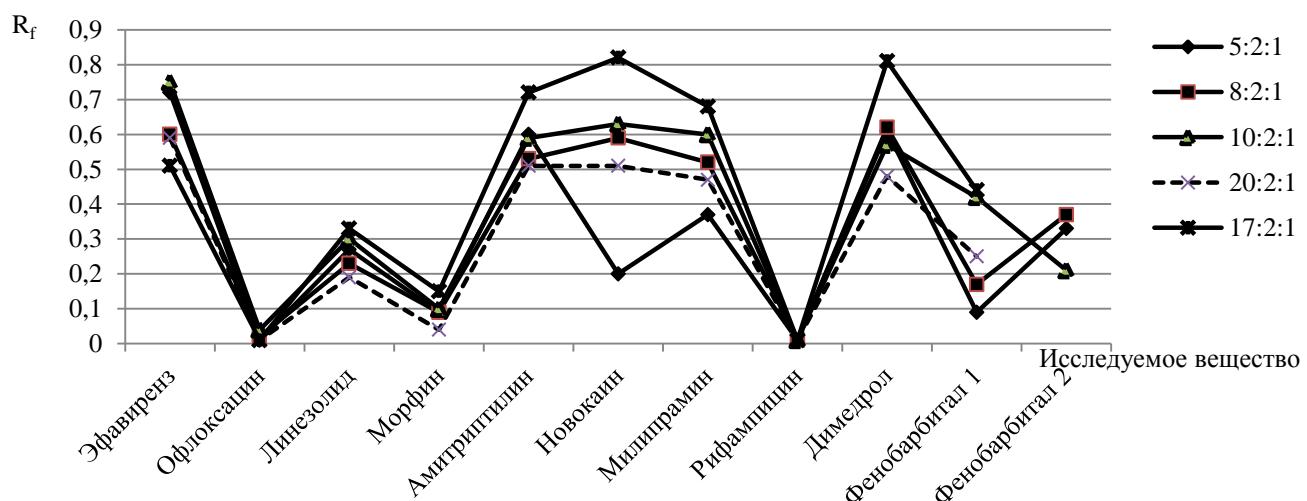
VII. Этилацетат – метанол – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1).

* - наличие «хвоста»

Из полученных данных следует, что при использовании системы хлороформ – спирт 95% – аммиака раствор концентрированный 25% (30:30:1) у большинства

исследуемых веществ зоны имеют высокие значения R_f , это означает, что вещества уходят с фронтом растворителя (система III). В системах I, IV, V, VI, VII разделение исследуемых веществ идёт недостаточно чётко, наблюдается наличие «хвостов» и размытие зон адсорбции. Из вышеперечисленных систем для разделения исследуемых лекарственных веществ система этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1), является наиболее подходящей, так как в данной системе детектируются все исследуемые лекарственные вещества. Следовательно, систему II можно рекомендовать для скрининга с целью проведения ненаправленного анализа.

Для увеличения величины ΔR_f между зонами исследуемых веществ проводилось варьирование количеством частей растворителей в подвижной фазе этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1). На рисунке 34 в виде диаграммы представлены результаты экспериментальных исследований варьирования количеством частей этилацетата в подвижной фазе.

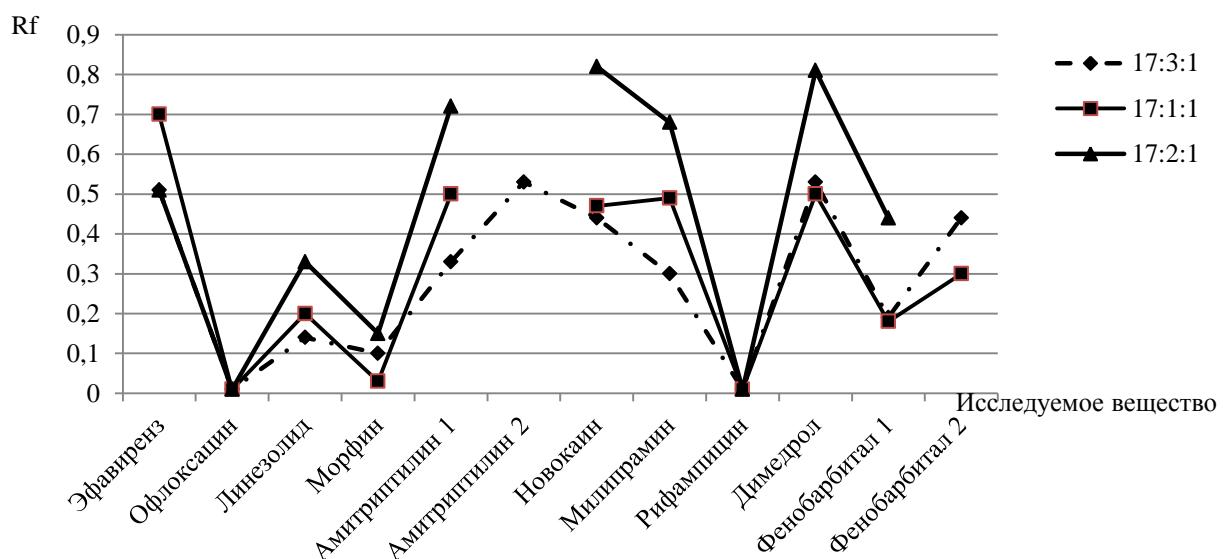


Примечание: системы растворителей: 1. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (5:2:1); 2. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (8:2:1); 3. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (10:2:1); 4. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (20:2:1); 5. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1)

Рисунок 34 – Хроматографическая подвижность исследуемых лекарственных веществ в системе этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% при варьировании количества частей этилацетата в подвижной фазе

Увеличение количества этилацетата в системе до двадцати частей привело к росту подвижности только эфавиренза, подвижность офлоксацина и рифампицина при этом не изменилась, а у других лекарственных веществ уменьшилась. Уменьшение количества этилацетата от семнадцати частей до десяти, восьми и пяти увеличило подвижность эфавиренза и офлоксацина (кроме уменьшения до пяти частей, в случае которого подвижность не изменилась). Подвижность рифампицина не изменилась, а у остальных лекарственных веществ уменьшилась.

Следующим этапом поиска оптимальной системы для разделения исследуемых веществ стало варьирование количеством частей хлороформа в подвижной фазе, сначала увеличив его количество до 3 частей, а затем уменьшив до 1 части (рис. 35).



Примечание: системы растворителей: 1. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:3:1); 2. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:1:1); 3. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1)

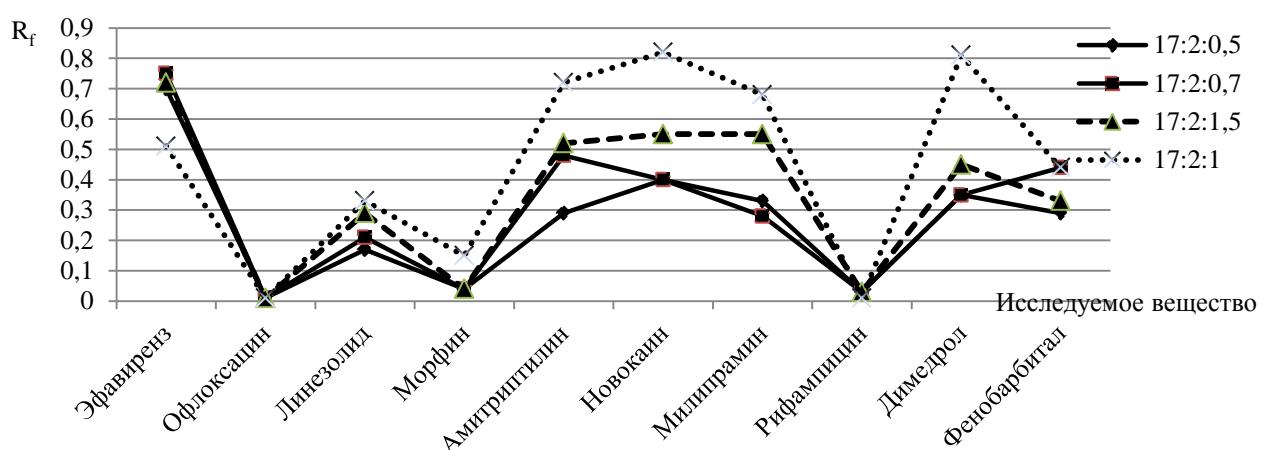
Рисунок 35 – Хроматографическая подвижность исследуемых лекарственных веществ в системе этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% при варьировании количества частей хлороформа в подвижной фазе

Изменение в системе количества хлороформа от двух до трех частей не приводит к увеличению подвижности всех исследуемых лекарственных веществ.

Подвижность эфавиренза, офлоксацина и рифампицина при этом не меняется, у остальных лекарственных веществ уменьшается. Уменьшение в системе количества хлороформа от двух частей до одной увеличивает подвижность эфавиренза. Подвижность офлоксацина и рифампицина остаётся на прежнем уровне, у всех остальных исследуемых веществ уменьшается.

Таким образом, варьирование количеством этилацетата и хлороформа в системе не привело к существенному увеличению ΔR_f между зонами, а в некоторых случаях даже уменьшило разделяющую способность исследуемых соединений.

В связи с тем, что исследуемые лекарственные вещества обладают основными свойствами, в ходе дальнейших исследований проводилось варьирование в системе количества аммиака раствора концентрированного 25% (рис. 36).



Примечание: системы растворителей: 1. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:0,5); 2. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:0,7); 3. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1,5); 4. Этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1)

Рисунок 36 – Хроматографическая подвижность исследуемых лекарственных веществ в системе этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% при варьировании количества частей аммиака концентрированного 25% в подвижной фазе

Изменение количества аммиака раствора концентрированного 25% в системе по-разному отражается на хроматографической подвижности исследуемых лекарственных веществ. Хроматографическая подвижность линезолида, морфина,

амитриптилина, прокайн, имипрамина, дифенгидрамина и фенобарбитала снижается при уменьшении количества аммиака до 0,7 и 0,5 частей в системе, а эфавиренза и рифампицина, наоборот, увеличивается. Подвижность офлоксацина не изменяется. Подвижность фенобарбитала при уменьшении до 0,7 частей не изменяется. Лучшей разделяющей способностью обладает система, в которой количество раствора аммиака концентрированного 25% составляет 1,5.

В результате проведенных экспериментов найдена оптимальная подвижная фаза: этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1,5), позволяющая разделить комбинированные сочетания офлоксацина, линезолида и эфавиренза с амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом, и получить зоны веществ правильной формы.

В таблице 58 представлены результаты хроматографирования комбинированных сочетаний офлоксацина, линезолида, эфавиренза и антидепрессантов, анальгетиков, седативных, антигистаминных, противотуберкулезных лекарственных средств, наиболее часто применяемых совместно, в системе этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1,5).

Таблица 58 – Результаты хроматографирования исследуемых фторсодержащих препаратов в комбинированных сочетаниях с антидепрессантами, анальгетиками, седативными, антигистаминными, противотуберкулезными лекарственными средствами методом ТСХ

Комбинированные сочетания лекарственных веществ	Значение R_f (n=6)	Комбинированные сочетания лекарственных веществ	Значение R_f (n=6)
Эфавиренз	0,72±0,01	Офлоксацин	0,01±0,02
Морфин	0,04±0,02	Прокайн	0,55±0,01
Амитриптилин	0,52±0,01	Фенобарбитал	0,33±0,01
Эфавиренз	0,72±0,01	Линезолид	0,29±0,01
Фенобарбитал	0,33±0,01	Рифампицин	0,03±0,02
Имипрамин	0,55±0,01	Дифенгидрамин	0,45±0,01
Офлоксацин	0,01±0,02	Линезолид	0,29±0,01
Дифенгидрамин	0,45±0,01	Прокайн	0,55±0,01
Имипрамин	0,55±0,01	Дифенгидрамин	0,45±0,01

Для проверки пригодности хроматографической системы проводилась апробация разработанных условий хроматографического анализа модельных смесей исследуемых лекарственных средств.

Разработанная методика использовалась для анализа комбинированных сочетаний после изолирования их из мочи.

Экстракция лекарственных веществ из мочи проводилась по методу А.А. Васильевой, экспериментально подбирая условия извлечения с учетом химических свойств исследуемых веществ.

Методика качественного определения комбинированных сочетаний офлоксацина, линезолида, эфавиренза и лекарственных средств других фармакологических групп методом ТСХ: в колбу вместимостью 100 мл вносится 25 мл мочи, содержащей водный раствор исследуемой смеси лекарственных веществ, настаивается в течение 24 часов при комнатной температуре и периодическом перемешивании на Шейкере S-3.08L.

Методика изолирования офлоксацина: 1 мл (для 0,2 г офлоксацина) модельного образца мочи помещается в пробирку, pH среды доводится до pH 6 амиака раствором 10%, добавляется аммония сульфата насыщенного раствор 1 мл и хлороформ/дихлорметан 3 мл. Содержимое пробирки помещается в делительную воронку и взбалтывается в течение 3 мин. Слой экстрагента отделяется после разделения фаз. Экстракция проводится повторно 3 мл хлороформа, и дважды 3 мл в случае экстрагирования дихлорметаном, извлечения объединяются. Растворители удаляются при комнатной температуре.

Методика изолирования линезолида: 1 мл (для 0,2 г линезолида) модельного образца мочи помещается в пробирку, pH среды доводится до pH 5 или pH 4 хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М соответственно, добавляется аммония сульфата насыщенного раствор 1 мл и этилацетат/дихлорметан 3 мл. Содержимое пробирки помещается в делительную воронку и взбалтывается в течение 7 мин/5 мин. Слой экстрагента отделяется после разделения фаз. Экстракция проводится повторно 3 мл этилацетатом/дихлорметаном, извлечения объединяются. Растворители удаляются при комнатной температуре.

Методика изолирования эфавиренза: 1 мл (для 0,2 г эфавиренза) модельного образца мочи помещается в пробирку, pH среды доводится до pH 3 или pH 2 хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М соответственно, натрия хлорида раствор 20%/натрия хлорида насыщенного раствор 1 мл и эфир диэтиловый/дихлорметан 3 мл. Содержимое пробирки помещается в делительную воронку и взбалтывается в течение 3 мин/7 мин. Экстракция проводится трижды по 3 мл эфиром диэтиловым/дихлорметаном. Слой экстрагента отделяется после разделения фаз, извлечения объединяются. Растворители удаляются при комнатной температуре.

Методика изолирования лекарственных веществ других фармакологических групп: 3 мл модельного образца мочи переносится в делительную воронку, добавляется натрия гидроксида раствор 0,1 М до pH 9,0-10,0; 3 мл хлороформа и экстрагируется двукратно в течение 7 мин. Хлороформные извлечения переносятся в пробирку к сухому остатку, полученному выше. Органический растворитель удаляется в токе воздуха.

К сухому остатку прибавляется 2 мл метанола, плотно закрывается, взбалтывается в течение 20 мин и обрабатывается в течение 10 мин на ультразвуковой бане. Аликвота суспензии объемом 1 мл переносится в пробирку и центрифугируется (13400 об/мин, 5 мин). Аликвота полученного раствора объемом 100 мкл переносится в чистую пробирку, добавляется 900 мкл метанола. Полученный раствор вводится в колонку в объеме 2 мкл [9].

С помощью микропипетки на линию старта пластиинки «Сорб菲尔» или «Армсорб» размером 7,5×15 см наносится по 0,4 мл раствора смеси. Рядом наносится по 0,4 мл содержащихся в смеси растворов СОВС. После удаления растворителя пластиинка помещается в камеру со смесью растворителей: этилацетат – хлороформ – амиака раствор концентрированный 25% (17:2:1,5) и хроматографируется восходящим методом. После прохождения фронта растворителя, она вынимается из камеры, сушится на воздухе в течение 15-20 мин и опрыскивается реактивом Драгендорфа [12]. Детекция проводится в УФ-свете при длине волны 254 нм.

Величины хроматографической подвижности офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с исследуемыми лекарственными веществами после извлечения их из мочи представлены в таблице 59.

Таблица 59 – Результаты хроматографической подвижности исследуемых фторсодержащих препаратов в комбинированных сочетаниях с антидепрессантами, анальгетиками, седативными, антигистаминными, противотуберкулезными лекарственными средствами после извлечения их из мочи методом ТСХ

Комбинированные сочетания лекарственных веществ	Значение R_f (п=6)	Комбинированные сочетания лекарственных веществ	Значение R_f (п=6)
Эфавиренз	0,72±0,01	Офлоксацин	0,01±0,02
Морфин	0,04±0,02	Прокайн	0,55±0,01
Амитриптилин	0,52±0,01	Фенобарбитал	0,33±0,01
Эфавиренз	0,72±0,01	Линезолид	0,29±0,01
Фенобарбитал	0,33±0,01	Рифампицин	0,03±0,02
Имипрамин	0,55±0,01	Дифенгидрамин	0,45±0,01
Офлоксацин	0,01±0,02	Линезолид	0,29±0,01
Дифенгидрамин	0,45±0,01	Прокайн	0,55±0,01
Имипрамин	0,55±0,01	Дифенгидрамин	0,45±0,01

В ходе проведённого исследования было определено, что разработанные методики позволяют обнаруживать офлоксацин, линезолид и эфавиренз на предварительном этапе исследования после извлечения их из мочи как отдельно, так и в комбинированных сочетаниях с лекарственными средствами других фармакологических групп, наиболее часто назначаемых совместно.

Таким образом, разработаны унифицированные методики разделения и обнаружения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в комбинированных сочетаниях с лекарственными средствами различных фармакологических групп методом ТСХ, которые внедрены в практику работы химического отделения ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ, судебно-химического отделения ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы».

5.2. Идентификация офлоксацина, линезолида и эфавиренза методом микроколоночной ВЭЖХ с многоволновой фотометрической детекцией

Благодаря более высокой чувствительности, хроматографические методы анализа позволяют идентифицировать родственные соединения и их продукты гидролиза или метаболиты. В последнее время для определения и разделения лекарственных веществ в фармацевтическом анализе всё чаще используется ВЭЖХ, однако отсутствие унифицированного подхода к разработке методик анализа ограничивает более широкое внедрение ВЭЖХ в практику фармацевтического анализа [25]. Следовательно, разработка унифицированных методик идентификации исследуемой группы веществ методом ВЭЖХ является актуальной задачей.

Так как предполагается одновременное определение нескольких веществ в различных сочетаниях (наиболее часто назначаемые совместно лекарственные вещества выделены в «тройки»), и они достаточно сильно различаются между собой по полярности, предлагается использование режима градиентного элюирования, условия которого подбирались экспериментально.

Для ВЭЖХ анализа модельных смесей офтлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с лекарственными средствами различных фармакологических групп был выбран обращенно-фазовый вариант. Выбор условий хроматографического анализа для идентификации исследуемых фторсодержащих лекарственных веществ описан в главе 3.4: неподвижная фаза ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (рН 2,8), элюент Б: ацетонитрил. Режим элюирования: линейный градиент – 3700 мкл 5% - 70% Б. Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°С.

На рисунке 37 приведена хроматограмма многокомпонентного раствора исследуемых лекарственных веществ с офтлоксацином, линезолидом и эфавирензом после экстракции их из мочи.

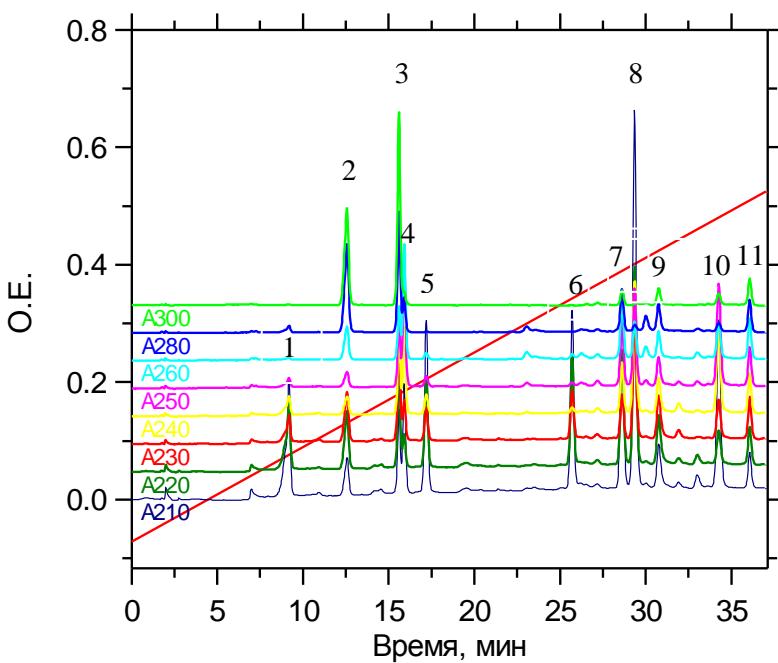


Рисунок 37 – Хроматограмма многокомпонентного раствора в метаноле. Пики: 1 – морфин; 2 – прокаин; 3 – офлоксацин; 4 – линезолид; 5 – фенобарбитал; 6 – дифенгидрамин; 7 – имипрамин; 8 – амитриптилин; 9 – рифампицин (1); 10 – эфавиренз; 11 – рифампицин (2)

Показано, что девять из десяти исследуемых соединений отделяются друг от друга до базовой линии. Пара офлоксацин – линезолид разделена не полностью. Полное разделение этих соединений может быть достигнуто при изменении формы градиента. Данное исследование описано в главе 3.4. Готовая лекарственная форма «Рифампицин» хроматографируется в виде двух пиков (рН 2,8). Таким образом, предложенная форма градиента позволяет определять все сочетания исследуемых лекарственных соединений.

На представленном рисунке изображено, что в предложенной системе элюентов пики исследуемых веществ хроматографируются в виде симметричных пиков. Полученные коэффициенты асимметрии, рассчитанные на уровне 10% высоты пиков, не превышают величину 1,5 и представлены в таблице 60.

Таблица 60 – Коэффициенты асимметрии исследуемых веществ
(Растворитель: ацетонитрил – лития перхлората раствор 0,2 М, pH 2,8)

Исследуемое вещество	$A_{10\%}$
Амитриптилин	1,47
Дифенгидрамин	1,39
Линезолид	0,95
Имипрамин	1,48
Морфин	0,60
Прокайн	0,89
Офлоксацин	1,04
Рифампицин (1)	1,50
Рифампицин (2)	1,24
Фенобарбитал	1,01
Эфавиренз	1,08

В связи с тем, что рифампицин хроматографируется в предложенных условиях в виде двух пиков, что может быть связано с его нестабильностью при pH 2,8, для него предложена система с pH 6,8. Данные для него и соединений, входящих в «тройку», приведены в таблице 61.

Таблица 61 – Коэффициенты асимметрии дифенгидрамина, линезолида и рифампицина (Растворитель: ацетонитрил – 0,02 М Трис, pH 6,8)

Исследуемое вещество	$A_{10\%}$
Дифенгидрамин	3,14
Линезолид	0,87
Рифампицин	1,38

Для проведения регистрации УФ-спектров готовились стандартные растворы определяемых веществ с концентрацией 0,5 мг/мл в метаноле. Базовой длиной волны для нормирования УФ-спектров была выбрана 210 нм.

В таблицах 62 и 63 показаны длины волн максимального поглощения и минимального поглощения исследуемых веществ.

Таблица 62 – Длины волн максимального и минимального поглощения исследуемых веществ (Растворитель: ацетонитрил – лития перхлората раствор 0,2 М, pH 2,8)

Исследуемое вещество	λ_{\max} , нм	λ_{\min} , нм
Амитриптилин	<u>206</u> , 240	230
Дифенгидрамин	<u>210</u> (склон), 220 (плечо), 258	246
Линезолид	196, <u>252</u>	224
Имипрамин	плато <u>210</u> , 252	232
Морфин	<u>210</u> , 284	198, 262
Прокайн	194, 224, <u>294</u>	210, 246
Офлоксацин	226, <u>296</u>	254, 318
Рифампицин	232, <u>264</u> , 342	212, 246, 302
Фенобарбитал	<u>210</u> (склон)	-
Эфавиренз	<u>204</u> , 248, 292	224, 270

Таблица 63 – Длины волн максимального и минимального поглощения дифенгидрамина, линезолида и рифампицина (Растворитель: ацетонитрил – 0,02 М Трис, pH 6,8)

Исследуемое вещество	λ_{\max} , нм	λ_{\min} , нм
Дифенгидрамин	<u>210</u> (склон), 220 (плечо), 258	246
Линезолид	196, <u>252</u>	224
Рифампицин	232, 334	210, 292

В таблицах 64 и 65 приведены спектральные отношения для офлоксацина, линезолида, эфавиренза и других исследуемых лекарственных веществ, рассчитанные как отношение площадей пиков, зарегистрированных при длинах волн λ_x и λ_{210} .

Таблица 64 – Спектральные отношения для исследуемых веществ
(Растворитель: ацетонитрил – лития перхлората раствор 0,2 М, pH 2,8)

№	Исследуемое вещество	Время удерживания, T_R , мкл	Спектральное отношение, $A(\lambda_x)/A(\lambda_{210})$						
			A_{220}/A_{210}	A_{230}/A_{210}	A_{240}/A_{210}	A_{250}/A_{210}	A_{260}/A_{210}	A_{280}/A_{210}	A_{300}/A_{210}
1	Амитриптилин	2949	0,494	0,302	0,323	0,243	0,098	0,025	0,004
2	Дифенгидрамин	2586	0,626	0,280	0,034	0,026	0,034	0,004	0,001
3	Линезолид	1612	0,299	0,356	0,771	1,183	1,052	0,312	0,096
4	Имипрамин	2877	0,602	0,230	0,260	0,340	0,308	0,223	0,080
5	Морфин	913	0,608	0,235	0,166	0,080	0,021	0,058	0,007
6	Прокайн	1277	1,508	1,256	0,448	0,400	0,909	2,403	2,676
7	Офлоксацин	1539	1,191	1,259	0,882	0,725	0,626	1,413	2,289
8	Рифампицин (1)	3088	1,158	1,108	0,963	0,809	0,754	0,759	0,503
	Рифампицин (2)	3620	1,060	1,118	1,133	1,099	1,137	0,900	0,752
9	Фенобарбитал	1736	0,509	0,199	0,116	0,063	0,039	0,003	0,000
10	Эфавиренз	3449	0,205	0,234	0,505	0,614	0,208	0,050	0,069

Таблица 65 – Спектральные отношения для дифенгидрамина, линезолида и рифампицина (Растворитель: ацетонитрил – 0,02 М Трис, pH 6,8)

№	Исследуемое вещество	Время удерживания, T_R , мкл	Спектральное отношение, $A(\lambda_x)/A(\lambda_{210})$						
			A_{220}/A_{210}	A_{230}/A_{210}	A_{240}/A_{210}	A_{250}/A_{210}	A_{260}/A_{210}	A_{280}/A_{210}	A_{300}/A_{210}
1	Дифенгидрамин	2201	0,623	0,275	0,027	0,018	0,025	0,001	0,000
2	Линезолид	1664	0,296	0,319	0,712	1,189	1,126	0,326	0,104
3	Рифампицин	2256	1,126	1,380	1,447	1,378	1,291	0,690	0,578

Разработанные условия хроматографического анализа модельных смесей офлоксамина, линезолида и эфавиренза в сочетании с лекарственными веществами других фармакологических групп были апробированы.

Времена удерживания соединений после изолирования их из мочи в предложенных условиях представлены в таблицах 66 и 67.

Таблица 66 – Времена удерживания исследуемых веществ после экстракции их из мочи (Растворитель: ацетонитрил – лития перхлората раствор 0,2 М, pH 2,8)

Исследуемое вещество	Время удерживания, мин	Исследуемое вещество	Время удерживания, мин
Амитриптилин	29,49	Прокайн	12,77
Дифенгидрамин	25,86	Офлоксацин	15,39
Линезолид	16,12	Рифампицин (1) Рифампицин (2)	30,88 36,20
Имипрамин	28,77	Фенобарбитал	17,36
Морфин	9,13	Эфавиренз	34,49

Таблица 67 – Времена удерживания исследуемых веществ после экстракции их из мочи (Растворитель: ацетонитрил – 0,02 М Трис, pH 6,8)

Исследуемое вещество	Время удерживания, мин
Дифенгидрамин	22,01
Линезолид	16,64
Рифампицин	22,56

Хроматограммы растворов модельных смесей, записанные при условиях: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (pH 2,8), элюент Б: ацетонитрил. Градиент: линейный; 3700 мкл от 5% Б до 70% Б, изображены на рисунках 38–43.

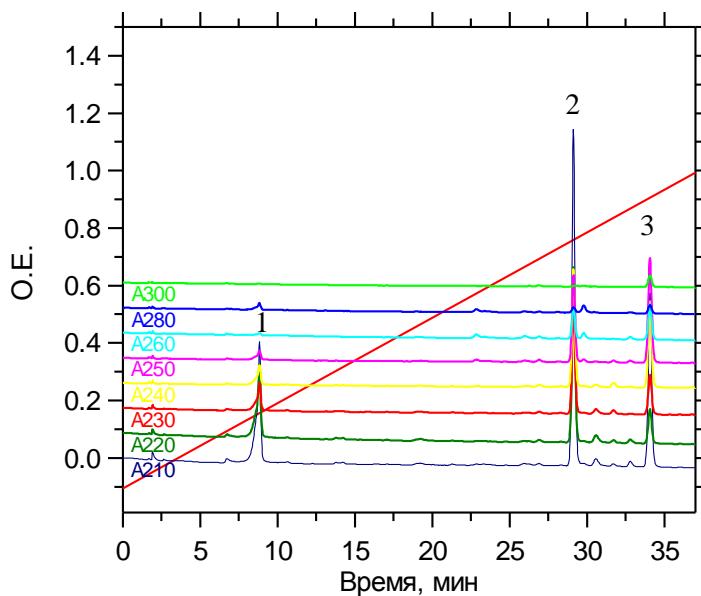


Рисунок 38 – Хроматограмма стандартного раствора «тройки» № 1 в метаноле. Пики: 1 – морфин; 2 – амитриптилин; 3 – эфавиренз

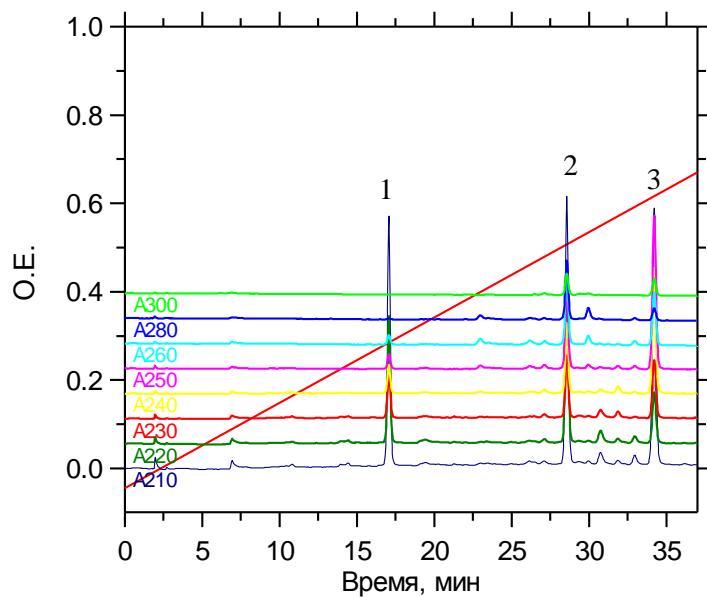


Рисунок 39 – Хроматограмма стандартного раствора «тройки» № 2 в метаноле. Пики: 1 – фенобарбитал; 2 – имипрамин; 3 – эфавиренз

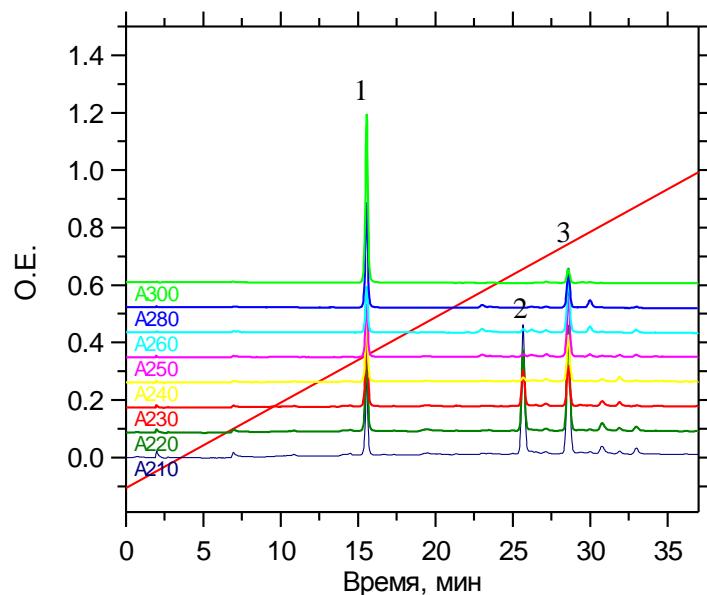


Рисунок 40 – Хроматограмма стандартного раствора «тройки» № 3 в метаноле. Пики: 1 – офлоксацин; 2 – дифенгидрамин; 3 – имипрамин

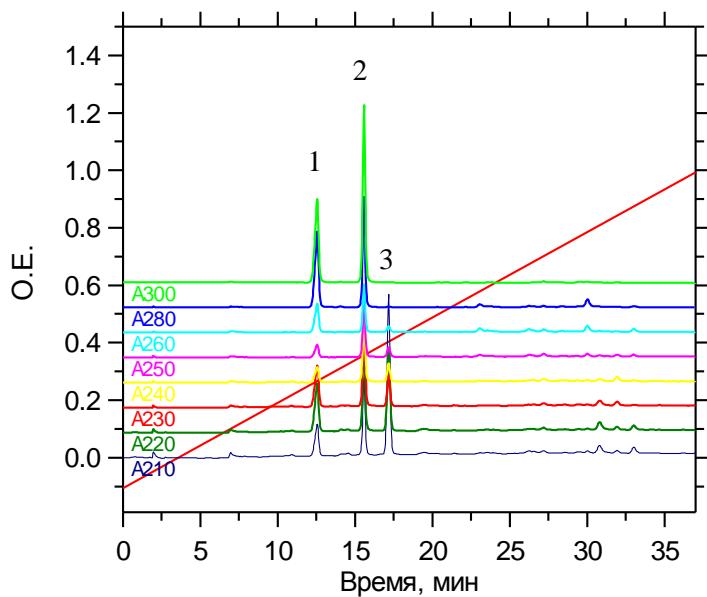


Рисунок 41 – Хроматограмма стандартного раствора «тройки» № 4 в метаноле. Пики: 1 – прокайн; 2 – офлоксацин; 3 – фенобарбитал

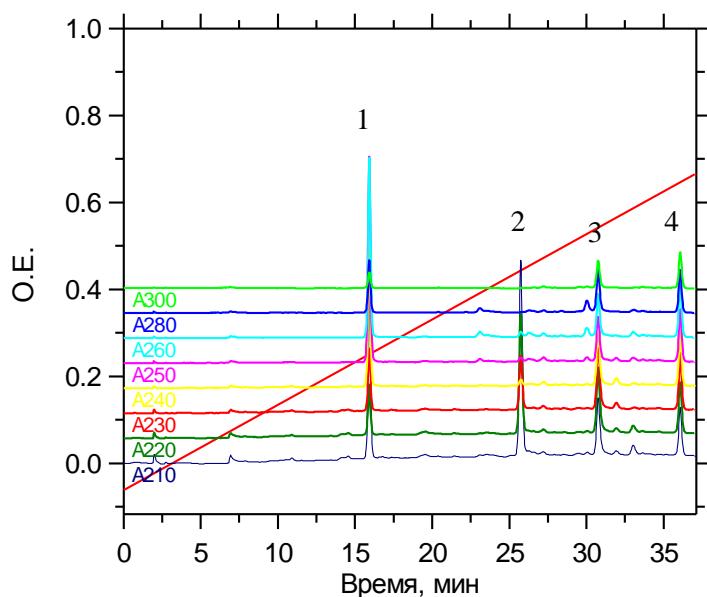


Рисунок 42 – Хроматограмма стандартного раствора «тройки» № 5 в метаноле. Пики: 1 – линезолид; 2 – дифенгидрамин; 3, 4 – рифампицин

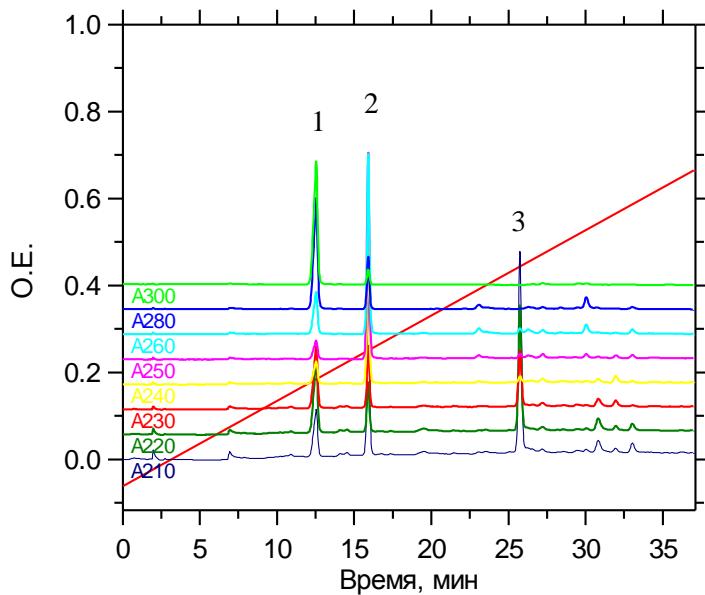


Рисунок 43 – Хроматограмма стандартного раствора «тройки» № 6 в метаноле. Пики: 1 – прокайн; 2 – линезолид; 3 – дифенгидрамин

Хроматограмма раствора модельной смеси «тройки» №5, записанная при условиях: Растворитель: ацетонитрил – 0,02 М Трис, pH 6,8. Градиент: линейный; 3700 мкл от 5% Б до 70% Б, представлена на рисунке 44.

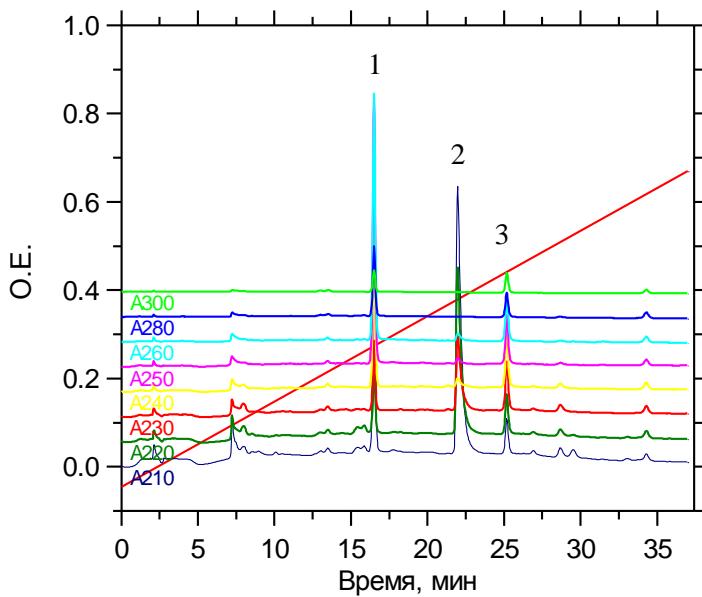


Рисунок 44 – Хроматограмма стандартного раствора «тройки» № 5 в метаноле. Пики: 1 – линезолид; 2 – дифенгидрамин; 3 – рифампицин

Методика качественного определения комбинированных сочетаний офлоксацина, линезолида, эфавиренза и лекарственных средств других фармакологических групп методом ВЭЖХ: в колбу вместимостью 100 мл

вносились 25 мл мочи, содержащей водный раствор исследуемой смеси лекарственных веществ, настаивалось в течение 24 часов при комнатной температуре и периодическом перемешивании на Шейкере S-3.08L.

Методика изолирования офлоксацина: 1 мл (для 0,2 г офлоксацина) модельного образца мочи помещается в пробирку, pH среды доводится до pH 6 аммиака раствором 10%, добавляется аммония сульфата насыщенного раствор 1 мл и хлороформ/дихлорметан 3 мл. Содержимое пробирки помещается в делительную воронку и взбалтывается в течение 3 мин. Слой экстрагента отделяется после разделения фаз. Экстракция проводится повторно 3 мл хлороформа, и дважды 3 мл в случае экстрагирования дихлорметаном, извлечения объединяются. Растворители удаляются при комнатной температуре.

Полученный после испарения экстрагента сухой остаток растворяется в 10 мл хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М и доводится до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл этим же растворителем. Аликовотная часть полученного раствора 1 мл переносится в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводится до объёма хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М.

Методика изолирования линезолида: 1 мл (для 0,2 г линезолида) модельного образца мочи помещается в пробирку, pH среды доводится до pH 5 или pH 4 хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М соответственно, добавляется аммония сульфата насыщенного раствор 1 мл и этилацетат/дихлорметан 3 мл. Содержимое пробирки помещается в делительную воронку и взбалтывается в течение 7 мин/5 мин. Слой экстрагента отделяется после разделения фаз. Экстракция проводится повторно 3 мл этилацетатом/дихлорметаном, извлечения объединяются. Растворители удаляются при комнатной температуре.

Полученный после испарения экстрагента сухой остаток растворяется в 10 мл спирта 95% и доводится до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл этим же растворителем. Аликовотная часть полученного раствора 2 мл переносится в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводится до объёма спиртом 95%.

Методика изолирования эфавиренза: 1 мл (для 0,2 г эфавиренза) модельного образца мочи помещается в пробирку, pH среды доводится до pH 3 или pH 2

хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М соответственно, натрия хлорида раствор 20%/натрия хлорида насыщенного раствор 1 мл и эфир диэтиловый/дихлорметан 3 мл. Содержимое пробирки помещается в делительную воронку и взбалтывается в течение 3 мин/7 мин. Экстракция проводится трижды по 3 мл эфиром диэтиловым/дихлорметаном. Слой экстрагента отделяется после разделения фаз, извлечения объединяются. Растворители удаляются при комнатной температуре.

Полученный после испарения экстрагента сухой остаток растворяется в 10 мл спирта 95% и доводится до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл этим же растворителем. Аликвотная часть полученного раствора 2 мл переносится в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводится до объёма натрия гидроксида раствором 0,1 М.

Методика изолирования других лекарственных веществ: 3 мл модельного образца мочи переносится в делительную воронку, добавляется натрия гидроксида раствор 0,1 М до pH 9,0-10,0; 3 мл хлороформа и экстрагируется двукратно в течение 7 мин. Хлороформные извлечения переносятся в пробирку к сухому остатку, полученному выше. Органический растворитель удаляется в токе воздуха.

К сухому остатку прибавляется 2 мл метанола, плотно закрывается, взбалтывается в течение 20 мин и обрабатывается в течение 10 мин на ультразвуковой бане. Аликвота суспензии объемом 1 мл переносится в пробирку и центрифугируется (13400 об/мин, 5 мин). Аликвота полученного раствора объемом 100 мкл переносится в чистую пробирку, добавляется 900 мкл метанола. Полученный раствор вводится в колонку в объеме 2 мкл [9].

Обнаружение исследуемых лекарственных веществ проводилось с использованием предложенных оптимальных условий хроматографического исследования анализируемых смесей: неподвижная фаза ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (рН 2,8), элюент Б: ацетонитрил. Режим элюирования: линейный градиент – 3700 мкл 5% - 70% Б. Скорость потока подвижной фазы – 100

мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°С.

Результаты хроматографического определения исследуемых веществ после экстракции их из мочи в разработанных условиях представлены в таблице 68.

Таблица 68 – Времена удерживания исследуемых веществ после экстракции их из мочи

Исследуемое вещество	Время удерживания, мин	Метрологические характеристики
Амитриптилин	29,49; 29,48; 29,5; 29,49; 29,49; 29,47	$\bar{X} = 29,49$; $S_{\bar{X}} = 0,0042$; $\Delta \bar{X} = 0,0108$; $E = 0,04\%$
Дифенгидрамин	25,86; 25,86; 25,88; 25,87; 25,85; 25,85	$\bar{X} = 25,86$; $S_{\bar{X}} = 0,0048$; $\Delta \bar{X} = 0,0123$; $E = 0,05\%$
Линезолид	16,12; 16,11; 16,12; 16,12; 16,12; 16,12	$\bar{X} = 16,12$; $S_{\bar{X}} = 0,0017$; $\Delta \bar{X} = 0,0043$; $E = 0,03\%$
Имипрамин	28,77; 28,78; 28,79; 28,77; 28,76; 28,75	$\bar{X} = 28,77$; $S_{\bar{X}} = 0,0058$; $\Delta \bar{X} = 0,0148$; $E = 0,05\%$
Морфин	9,13; 9,13; 9,14; 9,13; 9,13; 9,12	$\bar{X} = 9,13$; $S_{\bar{X}} = 0,0026$; $\Delta \bar{X} = 0,0066$; $E = 0,07\%$
Прокайн	12,77; 12,77; 12,77; 12,76; 12,77; 12,76	$\bar{X} = 12,77$; $S_{\bar{X}} = 0,0021$; $\Delta \bar{X} = 0,0054$; $E = 0,04\%$
Офлоксацин	15,39; 15,38; 15,40; 15,39; 15,38; 15,39	$\bar{X} = 15,39$; $S_{\bar{X}} = 0,0031$; $\Delta \bar{X} = 0,0079$; $E = 0,05\%$
Рифампицин (1)	30,88; 30,87; 30,88; 30,89; 30,89; 30,87	$\bar{X} = 30,88$; $S_{\bar{X}} = 0,0037$; $\Delta \bar{X} = 0,0094$; $E = 0,03\%$
Рифампицин (2)	36,20; 36,22; 36,21; 36,19; 36,21; 36,19	$\bar{X} = 36,20$; $S_{\bar{X}} = 0,0049$; $\Delta \bar{X} = 0,0127$; $E = 0,04\%$
Фенобарбитал	17,36; 17,38; 17,36; 17,36; 17,35; 17,36	$\bar{X} = 17,36$; $S_{\bar{X}} = 0,0040$; $\Delta \bar{X} = 0,0103$; $E = 0,06\%$
Эфавиренз	34,49; 34,5; 34,48; 34,49; 34,50; 34,50	$\bar{X} = 34,49$; $S_{\bar{X}} = 0,0033$; $\Delta \bar{X} = 0,0086$; $E = 0,02\%$

На основании представленных выше исследований, можно сделать вывод, что разработанная унифицированная методика позволяет идентифицировать офлоксацин, линезолид и эфавиренз методом ВЭЖХ после экстракции их из мочи как отдельно, так и при комбинированных отравлениях совместно с лекарственными средствами других фармакологических групп.

Выходы по главе

1. Оптимизированы условия идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза при совместном присутствии с амитриптилином, дифенгидрамином,

имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенобарбиталом в биологических объектах методом ТСХ. Предложена и обоснована система растворителей этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1,5).

2. Подобраны условия разделения и определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза с амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенобарбиталом в извлечениях из мочи методом ВЭЖХ: хроматографическая колонка (75×2 мм), неподвижная фаза: полимерный сорбент ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (рН 2,8), элюент Б – ацетонитрил. Градиентный режим элюирования: 3700 мкл 5% - 70% Б (0-35 мин). Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°С. Погрешность определения не более 0,07 %.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Определены оптимальные условия спектрофотометрического определения (растворитель и pH среды, оптический образец сравнения, аналитическая длина волны, оптимальная концентрация) и разработаны унифицированные методики количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в субстанциях и лекарственных формах с использованием в качестве оптических образцов сравнения калия феррицианид и калия хромат, отличающиеся точностью и высокой воспроизводимостью; разработаны и предложены проекты изменений ФСП.

2. Оптимизированы хроматографические условия количественного анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза методом ВЭЖХ: хроматографическая колонка (75×2 мм), неподвижная фаза: полимерный сорбент ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (pH 2,8), элюент Б – ацетонитрил. Градиентный режим элюирования: 550 мкл 27% Б; 550 мкл от 27% до 100% Б; 900 мкл 100% Б (0-14 мин). Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°С. Разработаны методики количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в лекарственных формах методом ВЭЖХ; разработаны и предложены проекты изменений ФСП.

3. Обоснованы условия экстракции методом ЖЖЭ (pH среды, природа органического растворителя, время и кратность экстракции, электролит) офлоксацина, линезолида и эфавиренза из растворов; разработаны условия изолирования фторсодержащих лекарственных средств из модельного образца мочи.

4. Впервые на основании изучения хроматографической подвижности офлоксацина, линезолида и эфавиренза в комбинированных сочетаниях с амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом определена система растворителей этилацетат – хлороформ – амиака раствор концентрированный 25% (17:2:1,5) и разработана методика их разделения и идентификации при совместном присутствии с

амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенобарбиталом методом ТСХ.

5. Предложены условия хроматографирования комбинаций офлоксацина, линезолида и эфавиренза с амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенобарбиталом методом ВЭЖХ; разработаны методики разделения и идентификации их в сочетаниях с амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенобарбиталом в извлечениях из модельного образца мочи методом ВЭЖХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власова, И.В. Спектрофотометрические методы в анализе лекарственных препаратов / И.В. Власова, А.В. Шилова, Ю.С. Фокина // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2011. – Том 77, № 1. – С. 21-28.
2. Дехнич, А.В. Новые и старые оксазолидиноны. Тедизолид и линезолид – в чем отличия? / А.В. Дехнич, Н.Н. Хачатрян // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 121-129.
3. Ефременкова, О.В. Линезолид – первый препарат нового класса антибактериальных средств оксазолидинонов / О.В. Ефременкова, Ю.Б. Белоусов // Качественная клиническая практика. – 2002. – № 2. – С. 2-11.
4. Илларионов, А. И. Оптические образцы сравнения в спектрофотометрическом анализе органических соединений: учебное пособие. / А. И. Илларионов, Е.А. Илларионова, И.П. Сыроватский. – Иркутск, 2008. – 151 с.
5. Илларионова, Е.А. Совершенствование спектрофотометрического и хроматографического методов анализа азотсодержащих лекарственных средств: дис. ...д-ра хим. наук: 21.01.2005. – М.: Российский университет дружбы народов, 2004. – 379 с.
6. Инфекционные болезни и проблемы биологической безопасности / Е.С. Белозеров [и др.] // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2016. – № 3. – С. 8-15.
7. Карташов, В.А. Сравнительная оценка экстрагирующей способности некоторых растворителей при выделении дипиридамола из биологического материала / В.А. Карташов, Л.В. Чернова // Новые технологии. – 2010. – № 1. – С. 139-143.
8. Кормишин, В.А. Денситометрическое определение некоторых наркотических средств и психотропных веществ в химико-

- токсикологических исследованиях: дис. ...канд. фарм. наук. – Самара, 2014. – 145 с.
9. Лазицкая, А.М. Совершенствование методов анализа производных бензодиазепина и фенилалкиламина: дис. ...канд. фарм. наук: 13.12.17. – Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН. – Улан-Удэ, 2017. – 144 с.
 10. Лазицкая А.М. Разработка и валидация методики количественного определения тофизопама и феназепама в лекарственных формах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А.М. Лазицкая, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Кубанский научный медицинский вестник. – 2017. – Т. 135, № 4. – С. 100-104.
 11. Лазицкая А.М. Спектрофотометрический анализ тофизопама / А.М. Лазицкая, Е.А. Илларионова, М.Г. Токарева // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2015. – № 2. – С. 25-27.
 12. Лазицкая А.М. Тонкослойная хроматография в анализе психотропных лекарственных средств при комбинированных отравлениях / А.М. Лазицкая, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Acta Biomedica Scientifica. – 2017. – Т. 2, № 4 (116). – С. 74-79.
 13. Линезолид, таблетки покрытые оболочкой 200 мг. Нормативный документ ФС 002276-111013. – М., 2013. – 2 с.
 14. Линезолид. Нормативный документ ФС 000704-120913. – М., 2013. – 17 с.
 15. Международная фармакопея // Изд. 9-е. – Женева. ВОЗ, 2019.
 16. Общие методы анализа. ОФС 42-0111-09 // Государственная фармакопея РФ XII изд. – Т. 2. – 440 с.
 17. Определение антибиотика фторхинолонового ряда левофлоксацина в моче методом поляризационного флуоресцентного иммуноанализа / И.А. Шанин, А.Р. Шаймарданов, Н.Т.Д Тхай, С.А.Еремин // Журнал аналитической химии. – 2015. – Т. 70, № 6. – С. 617-623.

18. Офлоксацин раствор для инфузий 0,2% М. Нормативный документ ФС 42-11886-01. – М., 2001. – 8 с.
19. Офлоксацин, таблетки покрытые оболочкой 200 мг. Нормативный документ ФС 42-12212-02. – М., 2002. – 19 с.
20. Офлоксацин. Нормативный документ ФС 42-14653-07. – М., 2007. – 13 с.
21. Падейская, Е.Н. Левофлоксацин (Таваник®) – препарат группы фторхинолонов для лечения инфекционных заболеваний с широкими показаниями к применению / Е.Н. Падейская // Качественная клиническая практика. – 2002. – № 2. – С. 80-95.
22. Прокофьева, М.М. Терапия ВИЧ-инфекции: методы и перспективы / М.М. Прокофьева, С.Н. Кочетков, В.С. Прасолов // Acta Naturae. – 2016. – Т. 8, № 4 (31). – С. 26-36.
23. Руководство по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала / С.С. Барсегян и др. – М., 2014. – 52 с.
24. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях. ОФС 1.2.1.1.0003.15. // Государственная фармакопея Российской Федерации. – Изд. 14-е. – М., 2018. – Том 1. – С. 749-758.
25. Титов И.В. Использование метода УФ-спектрофотометрии для установления подлинности лекарственных средств группы фторхинолонов / И.В. Титов, В.Л. Дорофеев, А.П. Арзамасцев // Вестник ВГУ. – 2004. – № 2. – С. 264-269.
26. Фармацевтический анализ лекарственных средств, влияющих на обменные процессы при использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии / С.Ю. Гармонов, И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова [и др.] // Вестник Казанского технологического университета. – 2010. – С. 30-36.
27. Федорова, Г.А. Оптимизация метода ВЭЖХ для терапевтического лекарственного мониторинга противосудорожных препаратов,

- метотрексата и циклоспорина А: дис. ...канд. хим. наук: 05.11.11. – Иркутск, 2003. – 137 с.
28. Хомов, Ю.А. Капиллярный электрофорез как высокоэффективный аналитический метод (обзор литературы) / Ю.А. Хомов, А.Н. Фомин // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 5; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=6775> (дата обращения: 03.10.2019)
29. Эфавиренз, таблетки покрытые оболочкой 600 мг. Нормативный документ ФС 002554-310714. – М., 2014. – 12 с.
30. Эфавиренз. Нормативный документ ФС 000520-260313. – М., 2013. – 15 с.
31. A new and rapid method for monitoring the new oxazolidinone antibiotic linezolid in serum and urine by high performance liquid chromatography-integrated sample preparation / M. Ehrlich, R. Trittler, F.D. Daschner, K. Kümmeler // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications – 2001. – Vol. 755, No. 1-2. – P. 373-377.
32. A novel sensor based on electropolymerization of betacyclodextrin and l-arginine on carbon paste electrode for determination of fluoroquinolones / Zhang F. [et al.] // Analytica Chimica Acta – 2013. – Vol. 770. – P. 53-61.
33. A Sensitive and Selective Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Method for Quantitative Analysis of Efavirenz in Human Plasma / P. Srivastava, G.S. Moorthy, R. Gross, J.S. Barrett // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, No. 6. – e63305.
34. A simple HPLC method for simultaneous determination of lopinavir, ritonavir and efavirenz / Y. Usami [et al.] // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2003. – Vol. 51. No. 6. – P. 715-718.
35. A validated Chiral HPLC method for the enantiomeric separation of Linezolid on amylase based stationary phase / C.N. Lakshmi [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis . – 2003. – Vol. 32, No. 1. – P. 21-28.

36. Agrawal H.; Mahadik K.R.; Paradkar A.R.; Kaul Neeraj // Journal of Medical Economics. – 2003. – No. 29. – P. 1119.
37. An isocratic liquid chromatography method for determining HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor and protease inhibitor concentrations in human plasma / D.R. Weller, R.C. Brundage, H.H. Jr. Balfour, H.E. Vezina // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2007. – Vol. 848, No. 2. – P. 369-373.
38. Analytical Determination and Electrochemical Characterization of the Oxazolidinone Antibiotic Linezolid / Daniele Merli [et al.] // Electroanalysis. – 2011. – Vol. 23, No. 10. – P. 2364-2372.
39. Application of single drop liquid – liquid – liquid microextraction for the determination of fluoroquinolones in human urine by capillary electrophoresis / W. Gao [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2011. – Vol. 879, No. 3-4. – P. 291-295.
40. Bebawy, L.I. Stability-indicating methods for the determination of linezolid in the presence of its alkaline-induced degradation products / L.I. Bebawy // Talanta. – 2003. – Vol. 60, No. 5. – P. 945-953.
41. Bhusari, K.P. Simultaneous spectrophotometric estimation of ofloxacin and ornidazole in tablet dosage form / K.P. Bhusari, D.R. Chaple // Asian Journal of Research in Chemistry. – 2009. – Vol. 2. – P. 60-62.
42. Bio Analytical Method Development Of an Anti-HIV-1 Drug Efavirenz Using High Performance Liquid Chromatography In Human Plasma / H.N. Deepakumari, S.M. Mallegowda, M.K. Prashanth, H.D. Revanasiddappa. // Materials today: proceedings. – 2017. – Vol. 4, Issue 11, Part 3. – P. 11939-11946
43. Borner, K. Determination of linezolid in human serum and urine by high-performance liquid chromatography / K. Borner, E. Borner, H. Lode // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2001. – Vol. 18, No. 3. – P. 253-258.

44. Borrull, F. Determination of quinolones in plasma samples by capillary electrophoresis using solid-phase extraction / F. Borrull, M. Calull, M. Hernandez // Journal of Chromatography B. – 2000. – Vol. 742. – P. 255-265.
45. Bouza, E. Linezolid: pharmacokinetic characteristics and clinical studies / E. Bouza, P. Munoz // Clinical Microbiology and Infection. – 2001. – Vol. 7, Suppl. 4. – P. 75-82.
46. Brief Report: Late Efavirenz-Induced Ataxia and Encephalopathy: A Case Series / E. Variava [et al.] // Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. – 2017. – Vol. 75, No. 5. – P. 577-579.
47. British Pharmacopeia, Her Majesty's, Stationery Office, London, UK, 2003. – Vol. 3.
48. Carlucci, G. Determination of ofloxacin in pharmaceutical forms by high-performance liquid chromatography and derivative UV-spectrophotometry / G. Carlucci, P. Mazzeo, T. Fantozzi // Analytical Letters. – 1993. – Vol. 26, No. 10. – P. 2193-2201.
49. Cheng, G. Automated on-line microdialysis sampling coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of malondialdehyde and ofloxacin in whole blood / G. Cheng, H. Wu, Y. Huang // Talanta. – 2009. – Vol. 79. – P. 1071-1075.
50. Choi, S.O. High-performance liquid chromatography assay for the determination of the HIV-protease inhibitor tipranavir in human plasma in combination with nine other antiretroviral medications / S.O. Choi, N.L. Rezk, A.D. Kashuba // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis . – 2007. – Vol. 43, No. 4. – P. 1562-1567.
51. Cios, A. Determination of linezolid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet and diode array detection. / A. Cios, K. Kuś, J. Szymura-Oleksiak // Acta Poloniae Pharmaceutica. – 2013. – Vol. 70, No. 4. – P. 631-641.

52. De Clercq E. Non- Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs): Past, Present, and Future / De Clercq E. // Chemistry Biodiversity. – 2004. – Vol. 1, No. 1. – P. 44-64.
53. Decloedt, E.H. Neuronal toxicity of efavirenz: a systematic review / E.H. Decloedt, G. Maartens // Expert Opinion on Drug Safety. – 2013. – Vol. 12, No. 6. – P. 841-846.
54. Deekonda, P. Method development and validation for the quantitative estimation of cefixime and ofloxacin in Pharmaceutical preparation by RP-HPLC / P. Deekonda, M.S. Reddy // Der Pharma Chemica. – 2014. – Vol. 6, No. 2. – P. 31-37.
55. Determination of efavirenz in diluted alkaline electrolyte by cathodic adsorptive stripping voltammetry at the mercury film electrode / Arnaldo A. Castro; Marcus V.N. de Souza; Nicolás A. Rey; Percio A. M. Farias.// Journal of the Brazilian Chemical Society. – 2011. – Vol. 22, No. 9. P. 1662-1668.
56. Determination of efavirenz in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection / M. Saras-Nacenta [et al.] // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications – 2001. – Vol. 763. No. 1–2. – P. 53-59.
57. Determination of efavirenz, a selective non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in human plasma using HPLC with post-column photochemical derivatization and fluorescence detection / C.Z. Matthews [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis . – 2002. – Vol. 28, No. 5. – P. 925-934.
58. Determination of linezolid in human breast milk by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection / O. Sagirli, A. Onal, S. Toker , A. Oztunç // Journal of AOAC International. – 2009. – Vol. 92, No. 6. – P. 1658-1662.
59. Determination of linezolid in pharmaceutical dosage forms by liquid chromatography and ultraviolet spectroscopy. / S.A. Patel [et al.] // Journal of AOAC International. – 2007. – Vol. 90, No. 5. – P.1272-1277.

60. Determination of ofloxacin enantiomers in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis / A.A. Elbashir, B. Saad, A.S.M. Ali, M.I. Saleh, H.Y. Aboul Enein // Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. – 2008. – Vol. 31, No. 3. – P. 348-360.
61. Determination of Ofloxacin in Pharmaceuticals, Human Urine and Serum Using a Potentiometric Sensor / A. M. Pimenta [et al.] // Electroanalysis. – 2011. – Vol. 23, No. 4. – P. 1013-1022.
62. Determination of salivary efavirenz by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry / A. Theron, D. Cromarty, M. Rheeders, M. Viljoen // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2010. – Vol. 878, No. 28. – P. 2886-2890.
63. Determination of twelve antiretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid chromatography / G. Aymard, M. Legrand, N. Trichereau, B. Diquet // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 2000. – Vol. 744, No. 2. – P. 227-240.
64. Development and Validation of a Liquid Chromatographic Method for Determination of Efavirenz in Human Plasma / A. Sailaja Lakshmi [et al.] // Chromatographia. – 2007. – Vol. 65. – P. 359-361.
65. Development and validation of reversed-phase HPLC gradient method for the estimation of efavirenz in plasma / S. Gupta, R. Kesarla, N. Chotai, A. Omri // PLoS ONE. – 2017. – Vol. 12, No. 5. – e0174777.
66. Development and validation of UV spectrophotometric method for the Estimation of Linezolid in bulk and pharmaceutical formulation / P. Prashanthi [et al.] // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research. – 2012. – Vol. 2, No. 3. – P. 57-60.
67. Diekema, D.J. Oxazolidinone antibiotics / D.J. Diekema, R.N. Jones // The Lancet. – 2001. – Vol. 358, No. 9297. – P. 1975-1982.
68. Dogan-Topal, B. Simultaneous Determination of Abacavir, Efavirenz and Valganciclovir in Human Serum Samples by Isocratic HPLC-DAD Detection /

- B. Dogan-Topal, S.A. Ozkan, B. Uslu. // Chromatographia. – 2007. – Vol. 66, Suppl. 1. – P. 25-30.
69. Eboka, C.J. Colorimetric determination of the fluoroquinolones / C.J. Eboka, S.O. Aigbavboa, J.O. Akerele // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1997. – Vol. 39, No. 5. – P. 639-641.
70. Efavirenz as a cause of ataxia in children / M.P.K. Hauptfleisch, D.P. Moore, J.L. Rodda // South African Medical Journal. – 2015. – Vol. 105, No. 11. – P. 897-898.
71. El-brashy, A.M. Spectrophotometric determination of some fluoroquinolone antibacterials by binary complex formation with xanthene dyes / A.M. El-brashy, M.E. Metwally, F.A. El-sepai // Il Farmaco. – 2004. – Vol. 59. – P. 809–817.
72. European Pharmacopoeia. 9.0 / 2017. – 41 p.
73. Fan, B. Determination of lamivudine/stavudine/efavirenz in human serum using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry with ionization polarity switch / B. Fan, M.G. Bartlett, J.T Stewart // Biomedical Chromatography. – 2002. – Vol. 16, No. 6. – P. 383-389.
74. Feng, Yu-Lin. Simultaneous Determination of Trace Ofloxacin, Ciprofloxacin, and Sparfloxacin by Micelle TLC-Fluorimetry / Yu-Lin Feng, Chuan Dong. // Journal of Chromatographic Science. – 2004. – Vol. 42, No. 9. – P. 474-477.
75. Francis, P.S. Chemiluminescence methods for the determination of ofloxacin / P.S. Francis, J.L. Adcock // Analytica Chimica Acta. – 2005. – Vol. 541, No. 1-2. – P. 3-12.
76. Hemoglobinurea due to ofloxacin in a 9 year old child - a case report / N. Nepali [et al.] // Pharmacology Online. – 2007. – No. 1. – P. 1-5.
77. High-performance liquid chromatographic method for the determination of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz in plasma of patients during highly active antiretroviral therapy / P. Langmann [et al.] //

- Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications – 2001. – Vol. 755. – P. 151-156.
78. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the six HIV-protease inhibitors and two non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma / K. Titier [et al.] // Therapeutic Drug Monitoring. – 2002. Vol. 24, No. 3. – P. 417-424.
79. High-Performance Liquid Chromatography Method for Analyzing the Antiretroviral Agent Efavirenz in Human Plasma. / P. Villani [et al.] // Therapeutic Drug Monitoring. – 1999. – Vol. 21, No. 3. – P. 346-350.
80. HPLC-MS method for the simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitor darunavir, and 11 other antiretroviral agents in plasma of HIV-infected patients / A. D'Avolio [et al.] // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2007. – Vol. 859, No. 2. – P. 234-240.
81. Immanuel, C. Simple and rapid high-performance liquid chromatography method for the determination of ofloxacin concentrations in plasma and urine / Immanuel C., Hemanth Kumar A.K. // Journal of Chromatography B. – 2001. – Vol. 760. – P. 91-95.
82. Incidence and risk factors of linezolid-induced lactic acidosis / J.H. Im, J.H. Baek, H.Y. Kwon, J.S. Lee // International Journal of Infectious Diseases. – 2015. – No. 31. – P. 47-52.
83. Kalta, R. Simultaneous RPHPLC determination of nitazoxanide and ofloxacin in combined tablet dosage form / R. Kalta, R. Sharma, S. Chaturvedi // Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2008. – Vol. 70, No. 4. – P. 491-494.
84. Kitahashi, T. Further method development for measurement of linezolid in human serum by MEKC / T. Kitahashi, I. Furuta // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2004. – Vol. 35, No. 3. – P. 615-620.
85. Kitahashi, T. Method development for determining the antibacterial linezolid in human serum by micellar electrokinetic capillary chromatography / T.

- Kitahashi, I. Furuta // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis . – 2002. – Vol. 30, No. 4. – P. 1411-1416.
86. Kudige, N. Prashanthi. Simple and Selective Spectrophotometric Determination of Ofloxacin in Pharmaceutical Formulations Using Two Sulphonphthalein Acid Dyes / Kudige N. Prashanth, Kanakapura Basavaiah, Madihalli S. Raghu // Spectroscopy. – Vol. 2013. – P. 1-9.
87. L. da Silveira, Ev. Microbiological assay for determination of ofloxacin injection / L. da Silveira Ev, E.E.S. Schapoval // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2002. – Vol. 27, No. 1-2. – P. 91-96.
88. Lactic Acidosis and Thrombocytopenia Associated with Linezolid Therapy: A Case Report / B. Xiao [et al.] // American Journal of Case Reports. – 2018. – No. 19. – P. 1117-1120.
89. Landers J.P. Handbook of capillary electrophoresis / J.P. Landers. – New York: CRC Press, 1997.
90. Liang, H. Separation of levofloxacin, ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin, trovafloxacin and cinoxacin by highperformance liquid chromatography: application to levofloxacin determination in human plasma / H. Liang, M.B. Kays, K.M. Sowinski // Journal of Chromatography B. – 2002. – Vol. 772. – P. 53-63.
91. Linezolid toxicity and mitochondrial susceptibility: a novel neurological complication in a Lebanese patient / O.K. Hassan [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2016. No. 7. P. 325.
92. Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent / K.L. Leach, S.J. Brickner, M.C. Noe, P.F. Miller // Annals of the New York Academy of Sciences. –2011. – Vol. 1222, No. 1. – P. 49-54.
93. Mali, Rink R. Development and validation of Spectrophotometry methods for estimation of linezolid in bulk and in pharmaceutical Dosage formulation / Rink R. Mali, Dr. A.P. Gorle R.C. // Journal of Drug Delivery and Therapeutics. – 2019. – Vol. 9, No. 3. – P. 60-65.

94. Mannemala, S.S. Multiple response optimization of a liquid chromatographic method for determination of fluoroquinolone and nitroimidazole antimicrobials in serum and urine / S.S. Mannemala, V. Kannappan // Clinical Biochemistry. – 2016. – Vol.49. – P. 587-595.
95. Marchese, A. The oxazolidinones as a new family of antimicrobial agent / A. Marchese, G.C. Schito // Clinical Microbiology and Infection. – 2001. – Vol. 7, Suppl. 4. – P. 66-74.
96. Michalska, K. Determination of linezolid and its achiral impurities using sweeping preconcentration by micellar capillary electrophoresis / K. Michalska, G. Pajchel, S. Tyski // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2008. – Vol. 48, No. 2. – P. 321-330.
97. Moellering, Robert C. Jr. Linezolid: The First Oxazolidinone Antimicrobial / Robert C. Jr. Moellering // Annals of Internal Medicine. – 2003. – Vol. 138, No. 2. – P. 135-142.
98. Mogatle, S. Rapid method for the quantitative determination of efavirenz in human plasma / S. Mogatle, I. Kanfer // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2009. – Vol. 49, No. 5. – P. 1308-1312.
99. Mohammed, S.A. Simple protein precipitation extraction technique followed by validated chromatographic method for linezolid analysis in real human plasma samples to study its pharmacokinetics / S.A. Mohammed, Eissa M.S., H.M. Ahmed // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2017. – Vol. 1043. – P. 235-240.
100. Naik, A.D. Spectrophotometric Method for Estimation of Linezolid in Tablet Formulation / A.D. Naik, S.P.N. Pai // Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences. – 2013. – Vol. 3, No. 21. – P. 4-6.
101. Nikalje Anna Pratima. HPTLC method Development, Validation for Simultaneous Determination of Efavirenz, Emtricitabine and Tenofovir in combined tablet formulation and Forced Degradation Studies / Nikalje Anna Pratima, Maniyar Ajhar, Obaid Shaikh // American Journal of Pharmtech Research. – 2013. Vol. 3, No. 1. – P. 650-660.

102. Norrby, R. Linezolid - a review of the first oxazolidinone / R. Norrby // Expert Opinion on Pharmacotherapy. – 2001. – Vol. 2, No. 2. – P. 293-302.
103. Panzade, P.D. Simultaneous estimation of ofloxacin and tinidazole in tablet dosage form / P.D. Panzade, K.R. Mahadik // Indian Drugs. – 2001. – Vol. 38, No. 7. – P. 368-370.
104. Pereira, E.A. Determination of antiretroviral agents in human serum by capillary electrophoresis / E.A. Pereira, G.A. Micke, M.F. Tavares // Journal of Chromatography A. – 2005. – Vol. 1091, No. 1–2. – P. 169-176.
105. Phillips, O.A. Determination of linezolid in human plasma by LC-MS-MS / O.A. Phillips, M.E. Abdel-Hamid, N.A Al-Hassawi // The Analyst. – 2001. – Vol. 126, No. 5. – P. 609-614.
106. Quantitative determination of efavirenz (DMP 266), a novel non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in human plasma using isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection / A.I. Veldkamp [et al.] // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications – 1999. – Vol. 734, No. 1. – P. 55-61.
107. Quantitative determination of lomefloxacin, ofloxacin, pefloxacin and enrofloxacin in pharmaceutical dosages, bulk drugs and process monitoring of enrofloxacin by HPLC-RP / A.P. Argekar, S.U. Kapadia, S.V. Raj, S.S. Kunjir // Indian Drugs. – 1996. – Vol. 33, No. 6. – P. 261-266.
108. Ragab, G.H. Atomic absorption spectroscopic, conductometric and colorimetric methods for determination of fluoroquinolone antibiotics using ammonium reinekeate ion-pair complex formation / G.H. Ragab, A.S. Amin // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2004. – Vol. 60, No. 4. – P. 973-978.
109. Rapid titrimetric and spectrophotometric determination of ofloxacin in pharmaceuticals using N-bromosuccinimide / Kanakapura Basavaiah Vinay; Hosakere Doddarevanna Revanasiddappa; Okram Zenita Devi; Pavagada Jagannathamurthy Ramesh // Brazilian Journal of Pharmaceutical Science. – 2011. – Vol. 47, No. 2. – P. 251-260. DOI: 10.1590/S1984-82502011000200006

110. Reddy, M.B.R.C. UV-spectrophotometric method for estimation of efavirenz in bulk and tablet dosage form / M.B.R.C. Reddy, G.V.S. Gilrella. // International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2012. – Vol. 3, No. 12. – P. 5033-5037.
111. Reddy, T.M. Voltammetric Behavior of Some Fluorinated Quinolone Antibacterial Agents and Their Differential Pulse Voltammetric Determination in Drug Formulations and Urine Samples Using a β -Cyclodextrin-Modified Carbon-Paste Electrode / T.M. Reddy, K. Balaji, S.J. Reddy // Journal of Analytical Chemistry. – 2007. – Vol. 62, No. 2. – P. 168-175.
112. Resolution of ofloxacin-ciprofloxacin and ofloxacin-norfloxacin binary mixtures by flow-injection chemiluminescence in combination with partial least squares multivariate calibration / J. Murillo [et al.] // Journal of Fluorescence. – 2007. – Vol. 17, No. 5. – P. 481-491.
113. Rezk, N.L. High-performance liquid chromatography assay for the quantification of HIV protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human plasma / N.L. Rezk, R.R. Tidwell, A.D. Kashuba // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2004. – Vol. 805, No. 2. – P. 241-247.
114. Salem, H. Spectrofluorimetric, atomic absorption spectrometric and spectrophotometric determination of some fluoroquinolones / H. Salem // American Journal of Applied Sciences. – 2005. – Vol. 2. – P. 719-729.
115. Sastry, C.S.P. Extractive spectrophotometric determination of some fluoroquinolone derivatives in pure and dosage forms / C.S.P. Sastry, K. Rama Rao, D. Siva Prasad // Talanta. – 1995. – Vol. 42, No. 3. – P. 311-316.
116. Sastry, C.S.P. Spectrophotometric determination of enrofloxacin and ofloxacin in pharmaceutical formulations / C.S.P. Sastry, K. Rama Rao, D. Siva Prasad // Indian Drugs. – 1995. – Vol. 32, No. 4. – P. 172-175.
117. Satyanarayana, K.V.V. Spectrophotometric Determination of Linezolid in Pharmaceuticals on the Basis of Coupled Redox-Complexation Reactions /

- K.V.V. Satyanarayana, P. Nageswara Rao // Journal of Analytical Chemistry. – 2013. – Vol. 68, No. 1. – P. 33-38.
118. Shah, Purvi. Development and Validation of HPLC method for simultaneous estimation of Rifampicin and Ofloxacin using experimental design / Purvi Shah, Vaishali Thakkar, Mukesh Gohel // Journal of Taibah University for Science. – 2019. – Vol. 13, Issue 1. – P. 146-154.
119. Shinde, V.M. Selective determination of fluoroquinolone derivatives from tablets by reverse phase HPLC / V.M. Shinde, B.S. Desai, N.M. Tendolkar // Indian Drugs. – 1998. – Vol. 35, No. 11. – P. 715-717.
120. Simon, V.A., Thiam M.D., Lipford L.C. Determination of serum levels of thirteen human immunodeficiency virus-suppressing drugs by high-performance liquid chromatography / V.A. Simon, M.D. Thiam, L.C. Lipford // Journal of Chromatography A. – 2001. – Vol. 913, No. 1–2. – P. 447-453.
121. Simple and rapid liquid chromatography method for determination of efavirenz in plasma / G. Ramachandran [et al.] // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2006. – Vol. 835, No. 1–2. – P. 131-135.
122. Simple and rapid method for the simultaneous determination of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors efavirenz and nevirapine in human plasma using liquid chromatography / B.S. Kappelhoff, H. Rosing, A.D. Huitema, J.H. Beijnen // Journal of Chromatography B. – 2003. – Vol. 792, No. 2. – P. 353-362.
123. Simultaneous determination and validation of antimicrobials in plasma and tissue of actinomycetoma by high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detection / N. Cavazos-Rocha [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2007. – Vol. 43, No. 5. – P. 1775-1781.
124. Simultaneous determination of 16 anti-HIV drugs in human plasma by high-performance liquid chromatography / S. Notari [et al.] // Journal of

- Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2006. – Vol. 831, No. 1–2. – P. 258-266.
125. Simultaneous determination of moxifloxacin and ofloxacin in physiological fluids using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection / F.U. Khan [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2016. – Vol. 1017-1018. – P. 120-128.
126. Simultaneous determination of nine antiretroviral compounds in human plasma using liquid chromatography / M.L. Turner, K. Reed-Walker, J.R. King, E.P. Acosta // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2003. – Vol. 784, No. 2. – P. 331-341.
127. Simultaneous determination of ofloxacin and gatifloxacin on cysteic acid modified electrode in the presence of sodium dodecyl benzene sulfonate / Zhang F. [et al.] // Bioelectrochemistry. – 2013. – Vol. 89. – P. 42-49.
128. Simultaneous determination of the antiretroviral agents: amprenavir, lopinavir, ritonavir, saquinavir and efavirenz in human peripheral blood mononuclear cells by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry / A. Rouzes [et al.] // Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. – 2004. – Vol. 813, No. 1–2. – P. 209-216.
129. Simultaneous determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz by high-performance liquid chromatography after solid-phase extraction / C. Marzolini [et al.] // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications – 2000. – Vol. 740, No. 1. – P. 43-58.
130. Simultaneous isolation of six fluoroquinolones in serum samples by selective molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion / Sun H. [et al.] // Analytica Chimica Acta – 2008. – Vol. 625. – P. 154-159.
131. Simultaneous quantification of a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz, a nucleoside reverse transcriptase inhibitor emtricitabine and a nucleotide reverse transcriptase inhibitor tenofovir in plasma by liquid

- chromatography positive ion electrospray tandem mass spectrometry / R. Nirogi [et al.] // Biomedical Chromatography. – 2009. – Vol. 23, No. 4. – P. 371-381.
132. Simultanious spectrophotometric estimation of ofloxacin and ketorolac tromethamine in ophthalmic dosage form / J.D. Fegade, H.P. Mehta, R.Y. Chaudhari, V.R. Patil // International Journal of ChemTech Research. – 2009. – Vol. 1, No. 2. – P. 189-194.
133. Spectrofluorimetric determination of terbinafine hydrochloride and linezolid in their dosage forms and human plasma / F. Belal, M.K. El-Din, M.I. Eid, R.M. El-Gamal //Journal of Fluorescence. – 2013. – Vol. 23, No. 5. – P. 1077-1087.
134. Spectrophotometric determination of ofloxacin and lomefloxacin hydrochloride with some sulphonphthalein dyes / Y.M. Issa, F.M. Abdel-Gawad, M.A. Abou Table, H.M. Hussein // Analytical Letters. – 1997. – Vol. 30, No. 11. – P. 2071-2084.
135. Spectrophotometric determination of ofloxacin in pharmaceutical formulations / S.C. Mathur, Y. Kumar, N. Murugesan, Y.K.S. Rathore, P.D. Sethi // Indian Drugs. – 1992. – Vol. 29, No. 8. – P. 376-377.
136. Spectrophotometric determination of ofloxacin with citric acid-acetic anhydride / P.U. Patel, B.N. Suhagia, M.M. Patel, G.C. Patel, G.N. Patel // The Indian Pharmacist. – 2007. – Vol. 6. – P. 59-61.
137. Srilatha, P. Quantitative determination of Efavirenz in bulk drug and formulation by colorimetry / P. Srilatha, N.K. Sathish, Kumar B. Prakash // Advances in Applied Science Research. – 2014. Vol. 5, No. 4. – P. 176-180.
138. Srividya, B. Stability indicating HPTLC method of analysis of ofloxacin / B. Srividya, R.M. Cardoza, P.D. Amin // Indian Drugs. – 2003. – Vol. 40, No. 1. – P. 41-43.
139. Stability Indicating HPTLC Determination of Linezolid as Bulk Drug and in Pharmaceutical Dosage Form. / Himani Agrawal, R.K. Mahadik, Paradkar A.R., Kaul Neeraj // Drug Development and Industrial Pharmacy 2003. – Vol. 29, No. 10. – P. 1119-1126.

140. Suhas, B. Gurav Spectrophotometric Estimation of Efavirenz in Formulation and Biological Fluid (urine) / Suhas B. Gurav, Anant N. Deshpande, Jadge Dhanraj & Sandeep D. Walsangikar. // Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research. – 2011. – Vol. 1, Issue 4. – P. 322-329.
141. Sun, H. Flow-injection chemiluminescence determination of ofloxacin and levofloxacin in pharmaceutical preparations and biological fluids / H. Sun, L. Li, X. Chen // Analytical Sciences. – 2006. – Vol. 22, No. 8. – P. 1145-1149.
142. Sun, S.W. Determination of fluoroquinolone antibacterials in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis / S.W. Sun, A.C. Wu // Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. – 1999. – Vol. 22, No. 2. – P. 281-296.
143. Tamer, A. Adsorptive stripping voltammetric determination of ofloxacin / A. Tamer // Analytica Chimica Acta. – 1990. – Vol. 231, No. 1. – P. 129-131.
144. Thin-layer chromatographic enantioseparation of ofloxacin and zopiclone using hydroxy-propyl-beta-cyclodextrin as chiral selector and thermodynamic studies of complexation / Nahla N. Salama [et al.] // Journal of Planar Chromatography-Modern TLC. – 2014. – Vol. 27, No. 3. – P. 166-173.
145. Tripathy, Swagata Ofloxacin induced leucopenia in complicated falciparum malaria: a case report / Swagata Tripathy, Amit Adhya. // Cases Journal. – 2009. – No. 2. – P. 7097.
146. Tuncel, M. The determination of ofloxacin in tablets by potentiometry and conductometry / M. Tuncel, Z. Atkosar // Pharmazie. – 1992. – Vol. 47, No. 8. – P. 642-643.
147. United States Pharmacopoeia, National Formulary XVII. – Vol. 22, Convention, Rockville, Md, USA, 1990.
148. Zhou, G. Polarographic and voltammetric behavior of ofloxacin and its analytical application / G. Zhou, J. Pan // Analytica Chimica Acta. – 1995. – Vol. 307, No. 1. – P.49-53.

ПРИЛОЖЕНИЕ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
 ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
 НД № 42-14653-07
 Россия
 Офлоксацин

ПРОЕКТ ИЗМЕНЕНИЯ

Старая редакция	Новая редакция
<p>Количественное определение. Определение проводят методом титрования в неводных растворителях (ГФ XI, вып. 1, с. 124)</p> <p>Приготовление растворов: <i>Испытуемый раствор:</i> около 0,3 г (точная навеска) препарата растворяют в 150 мл уксусного ангидрида и титруют 0,1 М раствором хлорной кислоты, определяя конец титрования потенциометрически. 1 мл 0,1 М раствора хлорной кислоты соответствует 36,14 мг офлоксацина.</p>	<p>Количественное определение. Точную навеску препарата (около 0,0500 г офлоксацина) количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, доводят объем раствора до метки этим же растворителем и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М, перемешивают. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм, при длине волны 293 нм. Хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М используют в качестве раствора сравнения. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора калия феррицианида – оптического образца сравнения.</p> <p><u>Приготовление раствора оптического образца сравнения калия феррицианида:</u> точную навеску препарата (около 0,1200 г калия феррицианида) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М, доводят объем раствора этим же растворителем до метки, перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора</p>

хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М до метки, перемешивают.

Расчет количественного определения офлоксацина проводят по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{ooc} \cdot K_{nep} \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100}{A_{ooc} \cdot a_x \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

где A_{ooc} и A_x - оптические плотности оптического образца сравнения и определяемого вещества соответственно, a_x и a_{ooc} - точные навески определяемого вещества и оптического образца сравнения соответственно, W - потеря в массе при высыпывании, %, 100 - коэффициент для пересчета в проценты, K_{nep} - коэффициент пересчета по калия феррицианиду равен 0,0455.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

ФСП № 42-12212-02

Нью-Фарм Инк. Канада

Офлоксацин, таблетки покрытые оболочкой, 200 мг

ПРОЕКТ ИЗМЕНЕНИЯ

Старая редакция	Новая редакция
<p>Количественное определение: определяют точную массу 20 таблеток, рассчитывают среднюю массу одной таблетки, растирают их до получения тонкого порошка. Точную навеску порошка таблеток, эквивалентную 200 мг офлоксацина, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл. Прибавляют около 80 мл растворителя образца, обрабатывают ультразвуком в течение 30 мин, поддерживая комнатную температуру водяной бани. Добавляют до объема растворителем образца, хорошо перемешивают. Фильтруют через фильтрующее устройство образца во флакон автоматического забора пробы хроматографа.</p> <p>Приготовление растворителя: Добавляют 10 мл орто-фосфорной кислоты в 500 мл ацетонитрила, перемешивают.</p> <p>Условия хроматографирования: хроматографическая колонка Zorbax SB-Phenyl, 150×4,6 мм с размером частиц 5 мкм. Подвижная фаза: А: Растворяют 6,8 г одноосновного калия фосфата и 0,77 г ацетата аммония в 880 мл воды, перемешивают. Подводят pH к 2,0±0,05 орто-фосфорной кислотой. В: ацетонитрил. Перемешивают 880 мл раствора А с 120 мл раствора В. Фильтруют и дегазируют. Температура колонки – комнатная, скорость потока подвижной фазы – 1,5 мл/мин. Детектирование при длине волны – 295 нм. Объем пробы – 10 мкл.</p>	<p>Количественное определение методом спектрофотометрии: точную навеску порошка растертых таблеток (около 0,0780 г) количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, доводят объем раствора этим же растворителем до метки и перемешивают, фильтруют, первые порции фильтрата отбрасывают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М и перемешивают. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 293 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют хлористоводородной кислоты раствор 0,1 М. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора оптического образца сравнения калия феррицианида.</p> <p>Приготовление раствора оптического образца сравнения калия феррицианида: точную навеску препарата (около 0,1200 г калия феррицианида) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, доводят объем раствора этим же растворителем до метки, перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора хлористоводородной кислоты раствором 0,1 М до метки, перемешивают. Расчет результатов количественного определения по калия феррицианиду проводят</p>

Ориентировочное время удерживания для пика офлоксацина около 13,5 мин.

Приготовление раствора РСО офлоксацина: Взвешивают около 200 мг (точная навеска) офлоксацина стандарта фирмы, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл. Добавляют 80 мл растворителя образца, взбалтывают 30 мин, поддерживают комнатную температуру водяной бани. Растворяют и доводят до объема растворителем образца, перемешивают. Отбирают пипеткой 10 мл стандартного раствора и 5 мл раствора внутреннего стандарта, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл. Доводят до объема растворителем образца, перемешивают. Фильтруют через мембранный фильтр во флакон автоинжектора.

Рассчитывают процентное содержание офлоксацина (X%) по следующей формуле:

$$\% = \frac{ASpl * F}{AStd} * \frac{mgStd * f}{100} * \frac{7}{100} * \frac{100}{mgSpl} * Av.Wt(mg) * \frac{100}{T}$$

где: A Sa – отношение площадей пика образец/внутренний стандарт; A Std – среднее отношение площадей стандарта/внутренний стандарт; T – требование на этикетке; f – фактор коррекции содержания, выраженный в % офлоксацина в офлоксацине стандарте фирмы $\times 10^{-2}$; mg Std – навеска стандартного образца в мг; mg Spl – навеска испытуемого образца в мг; Avr.Wt – средняя масса таблеток в мг.

по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{ooc} \cdot K_{nep} \cdot P_{cp} \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100}{A_{ooc} \cdot a_x \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - W)} \cdot 100$$

где A_x и A_{ooc} – оптические плотности определяемого вещества и оптического образца сравнения соответственно; a_x и a_{ooc} – точные навески определяемого вещества и оптического образца сравнения соответственно; W – потеря в массе при высушивании, %, 100 – коэффициент для пересчета в проценты, K_{nep} – коэффициент пересчета, по калию феррицианиду равен 0,0455; P_{cp} – средний вес таблетки.

Количественное определение методом ВЭЖХ: точную навеску таблеточной массы офлоксацина (около 0,7500 г) помещают в пробирку вместимостью 20 мл, прибавляется 10 мл метанола, плотно закрывают, взбалтывают в течение 20 мин и обрабатывают на ультразвуковой бане в течение 10 мин. Аликвоту суспензии объемом 1 мл переносят в пробирку и центрифугируют (5 мин 13400 об/мин). Аликвоту полученного раствора объемом 100 мкл переносят в чистую пробирку, добавляют 900 мкл метанола. Полученный раствор вводят в хроматографическую колонку в объеме 2 мкл

Методика приготовления раствора сравнения офлоксацина: точную массу субстанции офлоксацина (около 0,0500 г) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл метанола, объем раствора доводят до метки этим же растворителем, перемешивают. Полученный раствор вводят в хроматографическую колонку в объеме 2 мкл.

Последовательно хроматографируют испытуемый раствор и раствор сравнения офлоксацина. Условия хроматографирования: неподвижная фаза – ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (рН 2,8), элюент Б: ацетонитрил. Режим элюирования:

градиентный – 550 мкл 27% Б, 550 мкл от 27% - 100% Б, 900 мкл 100% Б. Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°C.

Ориентировочное время удерживания для пика офлоксацина около 3,9 мин.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
 ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
 НД № 000704-120913

Россия

Линезолид

ПРОЕКТ ИЗМЕНЕНИЯ

Старая редакция	Новая редакция
<p>Количественное определение.</p> <p>Приготовление растворов:</p> <p><i>Испытуемый раствор:</i> около 50 мг (точная навеска) субстанции линезолида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 25 мл метанола и диспергируют ультразвуком до полного растворения, охлаждают, доводят объем раствора 0,002 М раствором аммония дигидрофосфата до метки, перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки, фильтруют и перемешивают.</p> <p><i>Условия хроматографирования:</i></p> <p>хроматографическая колонка Inertsil ODS-3V, размером 150×4,6 мм, 5 мкм, или аналогичная. Подвижная фаза: 0,002 М раствор аммония дигидрофосфата:метанол (75:25). Температура колонки – 50°C, скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин. Детектирование при длине волны – 251 нм. Время хроматографирования – 30 мин. Ориентировочное время удерживания для пика линезолида около 30 мин.</p> <p><i>Приготовление исходного стандартного раствора линезолида:</i> около 25 мг (точная навеска) стандартного образца линезолида (USPRS) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, добавляют 12,5 мл метанола и диспергируют ультразвуком до полного растворения, охлаждают, доводят объем раствора 0,002 М раствором</p>	<p>Количественное определение. Точную навеску препарата (около 0,0500 г линезолида) количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл спирта 95%, доводят водой очищенной объем раствора до метки, перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят спиртом 95% объем раствора до метки, перемешивают. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм при длине волны 258 нм. Спирт 95% используют в качестве раствора сравнения.</p> <p><u>Приготовление раствора оптического образца сравнения калия феррицианида:</u> точную навеску (0,2000 г калия феррицианида) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, доводят этим же растворителем объем раствора до метки, перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, спиртом 95% доводят объем раствора до метки, перемешивают.</p> <p>Расчет количественного определения линезолида проводят по формуле:</p> $X = \frac{A_x \cdot a_{ooc} \cdot K_{nep} \cdot 5 \cdot 100 \cdot 50}{A_{ooc} \cdot a_x \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - W)} \cdot 100,$ <p>где A_{ooc} и A_x – оптические плотности оптического образца сравнения и</p>

аммония дигидрофосфата до метки, перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивают.

Хроматографируют равные объемы испытуемого и стандартного растворов.

Содержание линезолида в процентах (X), в пересчете на сухое и свободное от остаточных органических растворителей вещество, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_o \cdot 5 \cdot P \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100}{S_o \cdot a \cdot 50 \cdot 50 \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \\ = \frac{S \cdot a_o \cdot P \cdot 200}{S_o \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где S – площадь основного пика на хроматограмме испытуемого раствора;

S_o – площадь основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца линезолида;

a – навеска субстанции линезолида, в г;

a_o – навеска стандартного образца линезолида, в г;

P – содержание линезолида в стандартном образце, в %;

W – процентное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %.

определяемого вещества соответственно, α_x и α_{ooc} – точные навески определяемого вещества и оптического образца сравнения соответственно, W – потеря в массе при высушивании, %, 100 – коэффициент для пересчета в проценты, $K_{\text{пер}}$ – коэффициент пересчета по калия феррицианиду равен 0,0524.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
 ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
 ФСП № 42-11291-00

Фирма «Фармация и Апджон Кампани», США

Зивокс таблетки, покрытые оболочкой, по 600 мг

ПРОЕКТ ИЗМЕНЕНИЯ

Старая редакция	Новая редакция
Количественное определение: Помещают 5 таблеток в мерную колбу на 250 мл. Доводят до метки 20% растворителем и обрабатывают ультразвуком около 10 мин. Интенсивно встряхивают на механическом шейкере в течение примерно 20 мин. Не должно оставаться крупных частиц. Обрабатывают ультразвуком повторно в течение примерно 10 мин, затем часть центрифугируют в течение 10 мин при 3500 об/мин. для получения прозрачного супернатанта. Доводят образец до комнатной температуры и делают второе разведение: переносят 2 мл прозрачного супернатанта в мерную колбу на 250 мл, доводят до метки растворителем образца и перемешивают. Отбирают часть испытуемого раствора и помещают во флакон автодозатора.	Количественное определение методом спектрофотометрии: точную навеску порошка растертых таблеток (около 0,0232 г) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл спирта 95%, доводят объем раствора до метки водой очищенной, перемешивают, фильтруют, первые порции фильтрата отбрасывают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки спиртом 95% и перемешивают. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм при длине волны 258 нм. В качестве раствора сравнения используют спирт 95%. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора оптического образца сравнения калия феррицианида.
<u>Приготовление 20% растворителя:</u> 20% раствор ацетонитрила в воде (например, 100 мл ацетонитрила добавляют к 400 мл воды).	<u>Приготовление раствора оптического образца сравнения калия феррицианида:</u> точную навеску препарата (около 0,2000 г калия феррицианида) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл хлористоводородной кислоты раствора 0,1 М, доводят объем раствора этим же растворителем до метки, перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора спиртом 95% до метки, перемешивают.
<u>Приготовление растворителя образца:</u> 10% раствор ацетонитрила в воде (например, 50 мл ацетонитрила добавляют к 450 мл воды).	Расчет результатов количественного определения по калия феррицианиду проводят по формуле:
<u>Условия хроматографирования:</u> Колонка YMC ODS-AM размером 150×4,6 мм, сорбент с порами 5 мкм. Подвижная фаза: А: 10 мл 10% трифтормукусной кислоты добавляют к 1 л воды, дегазируют в вакууме и обрабатывают ультразвуком. Б: 10 мл 10% трифтормукусной кислоты	

добавляют к 1 л ацетонитрила, дегазируют в вакууме и обрабатывают ультразвуком. Температура колонки – комнатная, скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин. Детектирование при длине волны – 254 нм. Объем пробы – 10 мкл. Ориентировочное время удерживания для пика линезолида около 21 мин.

Приготовление раствора РСО линезолида: Взвешивают около 10 мг (точная навеска) референс-стандарта линезолида, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл. Доводят до объема 100 мл растворителем образца. Встряхивают и обрабатывают ультразвуком для растворения лекарственного вещества. Содержание линезолида в таблетке вычисляют по формуле:

$$X = (R_{\text{sam}}/R_{\text{std}}) \times (W_{\text{std}}/W_{\text{sam}}) \times (N1/D1) \times (N2/D2) \times P,$$

где: R_{sam} – величина пика линезолида на хроматограмме испытуемого раствора; R_{std} – величина пика линезолида на хроматограмме стандартного раствора; W_{std} – навеска референс-стандарта линезолида, мг; W_{sam} – 5 (количество таблеток); N1 – объем 20% растворителя, использованный для экстракции таблетки, мл; D1 – объем растворителя образца, использованный для растворения стандарта, мл; N2 – конечный объем второго разведения, мл; D2 – аликвота образца, взятая для второго разведения, мл; P – чистота референс-стандарта линезолида, в виде десятичной дроби.

$$X = \frac{A_x \cdot a_{\text{ooc}} \cdot K_{\text{nep}} \cdot P_{\text{cp}} \cdot 5 \cdot 50 \cdot 100}{A_{\text{ooc}} \cdot a_x \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - W)} \cdot 100$$

где A_x и A_{ooc} – оптические плотности определяемого вещества и оптического образца сравнения соответственно; a_x и a_{ooc} – точные навески определяемого вещества и оптического образца сравнения соответственно, W – потеря в массе при высушивании, %, 100 – коэффициент для пересчета в проценты, K_{nep} – коэффициент пересчета по калия феррицианиду равен 0,0524; P_{cp} – средний вес таблетки.

Количественное определение

методом ВЭЖХ: точную навеску таблеточной массы линезолида (около 0,2500 г) помещают в пробирку вместимостью 20 мл, прибавляют 10 мл метанола, плотно закрывают, взбалтывают в течение 20 мин и обрабатывают на ультразвуковой бане в течение 10 мин. Аликвоту суспензии объемом 1 мл переносят в пробирку и центрифугируют (5 мин 13400 об/мин). Аликвоту полученного раствора объемом 100 мкл переносят в чистую пробирку, добавляют 900 мкл метанола. Полученный раствор вводят в хроматографическую колонку в объеме 2 мкл.

Приготовление стандартного раствора линезолида: точную массу субстанции линезолида (около 0,0500 г) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 80 мл метанола, объем раствора доводят до метки этим же растворителем, перемешивают. Полученный раствор вводят в хроматографическую колонку в объеме 2 мкл.

Последовательно хроматографируют испытуемый раствор и раствор сравнения линезолида. Условия хроматографирования: неподвижная фаза ProntoSIL-120-5-C18 AQ, подвижная фаза: элюент А: лития перхлората раствор 0,2 М – хлорной кислоты раствор 0,005 М (рН 2,8), элюент Б: ацетонитрил. Режим элюирования: градиентный – 550 мкл 27% Б, 550 мкл от 27%

	<p>- 100% Б, 900 мкл 100% Б. Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°C.</p> <p>Ориентировочное время удерживания для пика линезолида около 5,7 мин.</p>
--	--

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

НД № 000520-260313

Россия

Эфавиренз

ПРОЕКТ ИЗМЕНЕНИЯ

Старая редакция	Новая редакция
<p>Количественное определение. Приготовление растворов: <i>Испытуемый раствор:</i> около 25 мг (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в подвижной фазе и доводят объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивают. <i>Условия хроматографирования:</i> хроматографическая колонка L1, Shodex, C18-M 4E, 250×4,6 мм с размером частиц 5 мкм, или аналогичная. Подвижная фаза: ацетонитрил:буферный раствор (1:1). Температура колонки – 25°C, скорость потока подвижной фазы – 1,5 мл/мин. Детектирование при длине волны – 252 нм. Время хроматографирования – 25 мин. Ориентировочное время удерживания для пика эфавиренза около 20 мин. <i>Стандартный раствор:</i> около 25 мг (точная навеска) стандартного образца эфавиренза (USP RS) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в подвижной фазе и доводят объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивают. 5 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора подвижной фазой до метки, перемешивают.</p>	<p>Количественное определение. Точную навеску препарата (около 0,0500 г эфавиренза) количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 40 мл спирта 95%, доводят объем раствора водой очищенной до метки и перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора натрия гидроксида раствором 0,1 М до метки, перемешивают. Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 267 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют натрия гидроксида раствор 0,1 М. Параллельно измеряют оптическую плотность растворов оптических образцов сравнения калия феррицианида и калия хромата. <u>Приготовление раствора оптического образца сравнения калия феррицианида:</u> точную навеску калия феррицианида (около 0,2000 г), количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М, доводят объем раствора этим же растворителем до метки, перемешивают. 5 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора натрия гидроксида раствором 0,1 М до метки и</p>

Хроматографируют равные объемы испытуемого и стандартного растворов. Содержание эфавиренза в процентах (X), в пересчете на безводное, свободное от остаточных органических растворителей вещество, вычисляют по формуле:

$$\begin{aligned} X &= \frac{S \cdot a_0 \cdot 5 \cdot 25 \cdot 50 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 25 \cdot 50 \cdot 5 \cdot (100 - W)} = \\ &= \frac{S \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)} \end{aligned}$$

где S – площадь основного пика на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь основного пика на хроматограмме стандартного раствора; a – навеска субстанции эфавиренза, в г; a_0 – навеска стандартного образца эфавиренза, в г; P – содержание эфавиренза в стандартном образце, в %; W – содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %.

перемешивают.

Приготовление раствора оптического образца сравнения калия хромата: точную навеску калия хромата (около 0,1700 г), количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 20 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М, доводят объем раствора этим же растворителем до метки, перемешивают. 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора натрия гидроксида раствором 0,1 М до метки и перемешивают.

Расчет результатов количественного содержания эфавиренза по калия феррицианиду проводится по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{ooc} \cdot K_{nep} \cdot 5 \cdot 100 \cdot 50}{A_{ooc} \cdot a_x \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - W)} \cdot 100$$

Расчет результатов количественного содержания эфавиренза по калия хромату проводится по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot a_{ooc} \cdot K_{nep} \cdot 1 \cdot 100 \cdot 50}{A_{ooc} \cdot a_x \cdot 100 \cdot 50 \cdot (100 - W)} \cdot 100$$

где A_{ooc} и A_x – оптические плотности оптического образца сравнения и определяемого вещества соответственно, a_{ooc} и a_x – точные навески оптического образца сравнения и определяемого вещества соответственно, W – потеря в массе при высушивании, %, 100 – коэффициент для пересчета в проценты, K_{nep} – коэффициент пересчета по калия феррицианиду равен 0,0526, по калия хромату равен 0,3008.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2710259

Способ определения и обнаружения в моче фторсодержащих лекарственных средств в комбинированных сочетаниях

Патентообладатель: **Илларионова Елена Анатольевна (RU)**

Авторы: **Тютрина Вера Александровна (RU), Илларионова Елена Анатольевна (RU), Чмелевская Наталья Владимировна (RU)**

Заявка № 2019120127

Приоритет изобретения **26 июня 2019 г.**

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **25 декабря 2019 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **26 июня 2039 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

G.P. Ivliev



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО - МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13)**

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «ИРКУТСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО СУДЕБНО-
МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ
(664022, г. Иркутск, бульвар Гагарина, 4)**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ «ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(664003, г. Иркутск, Красного Восстания, 1)**

«Утверждаю»
Директор ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России,
Главный внештатный специалист по судебно-медицинской экспертизе Минздрава
России доктор медицинских наук
А.В. Ковалев



" 18 " июня 2019 г.

**МЕТОДИКА СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА
ОФЛОКСАЦИНА, ЛИНЕЗОЛИДА И ЭФАВИРЕНЗА
В МОЧЕ**

Методические рекомендации

Москва 2019

УДК: 615.214.2.099.074:54.056:543

ББК: 58

Авторы:

Н.В. ЧМЕЛЕВСКАЯ – заведующая судебно-химическим отделением ГБУЗ МЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», кандидат фармацевтических наук;

В.А. ТЮТРИНА – аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России;

Е.А. ИЛЛАРИОНОВА – заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, профессор, доктор химических наук

МЕТОДИКА СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОФЛОКСАЦИНА, ЛИНЕЗОЛИДА И ЭФАВИРЕНЗА В МОЧЕ

Информационное письмо разработано для врачей судебно-медицинских экспертов судебно-химических отделений, врачей клинической лабораторной диагностики химико-токсикологических лабораторий, студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов и других специалистов, работающих в области анализа лекарственных средств.

Рецензенты:

Ю.В. Солодун – профессор кафедры анатомии человека, оперативной хирургии и судебной медицины ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, д.м.н.;

Д.В. Перфильев – начальник ГБУЗ МЗ ИОБСМЭ, врач судебно-медицинский эксперт;

А.М. Орлова – кандидат фарм. наук, ведущий научный сотрудник отдела специальных лабораторных исследований ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России.

Рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России (протокол № 2 от 18 июня 2019 г.).

ISBN: 978-5-6043508-2-9

© Н.В. Чмелевская, В.А. Тютрина, Е.А. Илларионова, 2019

© ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России

© ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО - МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13)**

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «ИРКУТСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО СУДЕБНО-
МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ
(664022, г. Иркутск, бульвар Гагарина, 4)**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ «ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(664003, г. Иркутск, Красного Восстания, 1)**

«Утверждаю»
Директор ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России,
Главный внештатный специалист по судебно-медицинской экспертизе Минздрава
России доктор медицинских наук
А.В. Ковалев



" 18 " июня 2019 г.

**МЕТОДИКА ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО И СУДЕБНО -
ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОФЛОКСАЦИНА, ЛИНЕЗОЛИДА И
ЭФАВИРЕНЗА В ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ
НЕБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

(Методические рекомендации)

Москва 2019

УДК 615.214.2.099.074:54.056:543

ББК: 58

Авторы:

Н.В. ЧМЕЛЕВСКАЯ – заведующая судебно-химическим отделением ГБУЗ МЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», кандидат фармацевтических наук;

В.А. ТЮТРИНА – аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России;

Е.А. ИЛЛАРИОНОВА – заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, профессор, доктор химических наук

МЕТОДИКА ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО И СУДЕБНО -ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОФЛОКСАЦИНА, ЛИНЕЗОЛИДА И ЭФАВИРЕНЗА В ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ НЕБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Информационное письмо разработано для врачей судебно-медицинских экспертов судебно-химических отделений, врачей клинической лабораторной диагностики химико-токсикологических лабораторий, студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов и других специалистов, работающих в области анализа лекарственных средств.

Рецензенты:

Ю.В. Солодун – профессор кафедры анатомии человека, оперативной хирургии и судебной медицины ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, д.м.н.;

Д.В. Перфильев – начальник ГБУЗ МЗ ИОБСМЭ, врач судебно-медицинский эксперт;

А.М. Орлова – кандидат фарм. наук, ведущий научный сотрудник отдела специальных лабораторных исследований ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России.

Рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России (протокол № 2 от 18 июня 2019 г.).

ISBN: 978-5-6043508-2-9

© Н.В. Чмелевская, В.А. Тютрина, Е.А. Илларионова, 2019

© ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России

© ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БУРЯТИЯ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РЕСПУБЛИКАНСКОЕ БЮРО СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»

670047, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Пирогова, 3
Тел. (факс.): 8 (301-2) 43-56-85, E-mail: buryatia@sudmed.info

Акт аprobации и внедрения

В судебно-химическом отделении ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ аprobирована методика изолирования офлоксацина из мочи методом жидкость-жидкостной экстракции.

Методика разработана на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета аспирантом Тютриной В.А., к.ф.н. Чмелевской Н.В., д.х.н., профессором Илларионовой Е. А.

Оптимальными растворителями для изолирования офлоксацина являются хлороформ и дихлорметан, которые максимально экстрагируют его при pH 6. В качестве высылающего компонента применялся аммония сульфат насыщенный. Использовался двукратный вариант экстрагирования в течение 3 минут в случае экстракции хлороформом и трёхкратный вариант экстрагирования в течение 3 минут при экстракции дихлорметаном.

Проведенная аprobация показала, что методика проста в выполнении, характеризуется хорошей воспроизводимостью, не требует дорогостоящих реагентов, позволяет наиболее полно изолировать офлоксацин из мочи.

Методика внедрена в практику работы судебно - химического отделения ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ.

Начальник ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ



К.М. Югов
06.02.2019



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БУРЯТИЯ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РЕСПУБЛИКАНСКОЕ БЮРО СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»

670047, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Пирогова, 3
Тел. (факс.): 8 (301-2) 43-56-85, E-mail: buryatia@sudmed.info

Акт апробации и внедрения

В судебно-химическом отделении ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ апробирована методика изолирования линезолида из мочи методом жидкость-жидкостной экстракции.

Методика разработана на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета аспирантом Тютриной В.А., к.ф.н. Чмелевской Н.В., д.х.н., профессором Илларионовой Е. А.

Оптимальными растворителями для изолирования линезолида являются этилацетат и дихлорметан, которые максимально экстрагируют его при pH 5 и 4, соответственно. В качестве высылающего компонента применялся аммония сульфат насыщенный. Использовался двукратный вариант экстрагирования в течение 7 минут в случае экстракции этилацетатом и двукратный вариант экстрагирования в течение 5 мин при экстракции дихлорметаном.

Проведенная апробация показала, что методика проста в выполнении, характеризуется хорошей воспроизводимостью, не требует дорогостоящих реагентов, позволяет наиболее полно изолировать линезолид из мочи.

Методика внедрена в практику работы судебно - химического отделения ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ.

Начальник ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ



Югов

К.М. Югов
06.02.2019



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БУРЯТИЯ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РЕСПУБЛИКАНСКОЕ БЮРО СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»

670047, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Пирогова, 3
Тел. (факс.): 8 (301-2) 43-56-85, E-mail: buryatia@sudmed.info

Акт аprobации и внедрения

В судебно-химическом отделении ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ аprobирована методика идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с другими лекарственными веществами (амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенобарбиталом) в извлечениях из мочи методом хроматографии в тонком слое сорбента.

Методика разработана на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета аспирантом Тютриной В.А., к.ф.н. Чмелевской Н.В., д.х.н., профессором Илларионовой Е. А.

Для идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в извлечениях из мочи при комбинированном отравлении с другими лекарственными веществами используется метод хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ). Исследования проводили на отечественных пластинах «Армсорб» или «Сорб菲尔» с использованием системы растворителей этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1,5).

Проведенная аprobация показала, что методика характеризуется хорошей воспроизводимостью, позволяет надежно идентифицировать офлоксацин, линезолид и эфавиренз в присутствии амитриптилина, дифенгидрамина, имипрамина, морфина, прокаина, рифампицина и фенобарбитала.

Методика внедрена в практику работы судебно – химического отделения ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ.

Начальник ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ



К.М. Югов
06.02.2019



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БУРЯТИЯ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РЕСПУБЛИКАНСКОЕ БЮРО СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»

670047, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Пирогова, 3
Тел. (факс.): 8 (301-2) 43-56-85, E-mail: buryatia@sudmed.info

Акт аprobации и внедрения

В судебно-химическом отделении ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ аprobирована методика идентификации и количественного определения оффлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с другими лекарственными веществами (амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом) в извлечениях из мочи методом высокоеффективной жидкостной хроматографии.

Методика разработана на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета аспирантом Тютриной В.А., к.ф.н. Чмелевской Н.В., д.х.н., профессором Илларионовой Е. А.

Для идентификации и количественного определения оффлоксацина, линезолида и эфавиренза в извлечениях из мочи при комбинированном отравлении с другими используется метод высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Метод ВЭЖХ позволяет определять оффлоксацин, линезолид и эфавиренз в присутствии амитриптилина, дифенгидрамина, имипрамина, морфина, прокайна, рифампицина и фенобарбитала. Исследования проводили на отечественном микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», Новосибирск) с колонкой (75x2 мм), заполненной обращенно - фазовым сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ.

Проведенная аprobация показала, что методика унифицирована, оптимизирована и экономична; характеризуется хорошей воспроизводимостью, позволяет надежно идентифицировать и определять количественное содержание оффлоксацина, линезолида и эфавиренза в присутствии амитриптилина, дифенгидрамина, имипрамина, морфина, прокайна, рифампицина и фенобарбитала. Метрологические характеристики разработанной методики анализа удовлетворяют требованиям, принятым для бионалитических методов.

Методика внедрена в практику работы судебно-химического отделения ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ.

Начальник ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ
ГБУЗ
«РБ СМЭ»



С

К.М. Югов
06.02.2019



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БУРЯТИЯ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РЕСПУБЛИКАНСКОЕ БЮРО СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»

670047, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Пирогова, 3
Тел. (факс.): 8 (301-2) 43-56-85, E-mail: buryatia@sudmed.info

Акт аprobации и внедрения

В судебно-химическом отделении ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ аprobирована методика идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в таблетках методом высокоеффективной жидкостной хроматографии.

Методика разработана на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета аспирантом Тютриной В.А., к.ф.н. Чмелевской Н.В., д.х.н., профессором Илларионовой Е. А.

Для количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в таблетках используется метод высокоеффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Метод ВЭЖХ позволяет определять содержание основного действующего вещества в присутствии специфических примесей и продуктов деструкции. Исследования проводили на отечественном микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», Новосибирск) с колонкой (75x2 мм), заполненной обращенно - фазовым сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ.

Проведенная аprobация показала, что методика характеризуется хорошей воспроизводимостью, позволяет обнаруживать исследуемые препараты в лекарственных формах с использованием отечественного оборудования.

Методика внедрена в практику работы судебно-химического отделения ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ

Начальник ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ



Ch

К.М. Югов
06.02.2019



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БУРЯТИЯ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«РЕСПУБЛИКАНСКОЕ БЮРО СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»

670047, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, ул. Пирогова, 3
Тел. (факс.): 8 (301-2) 43-56-85, E-mail: buryatia@sudmed.info

Акт апробации и внедрения

В судебно-химическом отделении ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ апробирована методика изолирования эфавиренза из мочи методом жидкость-жидкостной экстракции.

Методика разработана на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета аспирантом Тютриной В.А., к.ф.н. Чмелевской Н.В., д.х.н., профессором Илларионовой Е. А.

Оптимальными растворителями для изолирования эфавиренза являются эфир диэтиловый и дихлорметан, которые максимально экстрагируют его при рН 3 и 2, соответственно. В качестве высылающего компонента применялся натрия хлорид 20% для экстракции эфиром диэтиловым и натрия хлорид насыщенный для экстракции дихлорметаном. Использовался трёхкратный вариант экстрагирования в течение 3 минут в случае экстракции эфиром диэтиловым и трёхкратный вариант экстрагирования в течение 7 мин при экстракции дихлорметаном.

Проведенная апробация показала, что методика проста в выполнении, характеризуется хорошей воспроизводимостью, не требует дорогостоящих реактивов, позволяет наиболее полно изолировать эфавиренз из мочи.

Методика внедрена в практику работы судебно - химического отделения ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ.

Начальник ГБУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Улан-Удэ
ГБУЗ
«РБ СМЭ»



Югов

К.М. Югов
06.02.2019



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

ИРКУТСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО СУДЕБНО-
МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

Гагарина бульвар, д.4, Иркутск, 664022
Тел./факс (3952) 28-09-48

E-mail: iobsme@front.ru

18.03.2019 № 535

На № _____ от _____

Акт апробации и внедрения

В судебно-химическом отделении ГБУЗ «Иркутское Областное Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Иркутска апробирована методика изолирования эфавиренза из мочи методом жидкость-жидкостной экстракции.

Методика разработана на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета аспирантом Тютриной В.А., к.ф.н. Чмелевской Н.В., д.х.н., профессором Илларионовой Е. А.

Оптимальными растворителями для изолирования эфавиренза являются эфир диэтиловый и дихлорметан, которые максимально экстрагируют его при pH 3 и 2, соответственно. В качестве высаливающего компонента применялся натрия хлорид 20% для экстракции эфиром диэтиловым и натрия хлорид насыщенный для экстракции дихлорметаном. Использовался трёхкратный вариант экстрагирования в течение 3 минут в случае экстракции эфиром диэтиловым и трёхкратный вариант экстрагирования в течение 7 мин при экстракции дихлорметаном.

Проведенная апробация показала, что методика проста в выполнении, характеризуется хорошей воспроизводимостью, не требует дорогостоящих реагентов, позволяет наиболее полно изолировать эфавиренз из мочи.

Методика внедрена в практику работы судебно - химического отделения ГБУЗ «Иркутское Областное Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Иркутска.

Начальник ГБУЗ «Иркутское
Областное Бюро судебно - медицинской
экспертизы» г. Иркутска



Д.В. Перфильев



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

ИРКУТСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО СУДЕБНО-
МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

Гагарина бульвар, д.4, Иркутск, 664022

Тел./факс (3952) 28-09-48

E-mail: iobsme@front.ru

18.03.2019 № 535

На № _____ от _____

Акт апробации и внедрения

В судебно-химическом отделении ГБУЗ «Иркутское Областное Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Иркутска апробирована методика идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с другими лекарственными веществами (амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом) в извлечениях из мочи методом хроматографии в тонком слое сорбента.

Методика разработана на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета аспирантом Тютриной В.А., к.ф.н. Чмелевской Н.В., д.х.н., профессором Илларионовой Е. А.

Для идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в извлечениях из мочи при комбинированном отравлении с другими лекарственными веществами используется метод хроматографии в тонком слое сорбента (TCX). Исследования проводили на отечественных пластинках «Армсорб» или «Сорб菲尔» с использованием системы растворителей этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1,5).

Проведенная апробация показала, что методика характеризуется хорошей воспроизводимостью, позволяет надежно идентифицировать офлоксацин, линезолид и эфавиренз в присутствии амитриптилина, дифенгидрамина, имипрамина, морфина, прокайна, рифампицина и фенобарбитала.

Методика внедрена в практику работы судебно - химического отделения ГБУЗ «Иркутское Областное Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Иркутска.

Начальник ГБУЗ «Иркутское
Областное Бюро судебно - медицинской
экспертизы» г. Иркутска



Д.В. Перфильев



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

ИРКУТСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО СУДЕБНО-
МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

Гагарина бульвар, д.4, Иркутск, 664022

Тел./ факс (3952) 28-09-48

E-mail: iobsme@front.ru

18.03.2019 № 535

На № _____ от _____

Акт апробации и внедрения

В судебно-химическом отделении ГБУЗ «Иркутское Областное Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Иркутска апробирована методика идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в таблетках методом высокозэффективной жидкостной хроматографии.

Методика разработана на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета аспирантом Тютриной В.А., к.ф.н. Чмелевской Н.В., д.х.н., профессором Илларионовой Е. А.

Для количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в таблетках используется метод высокозэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Метод ВЭЖХ позволяет определять содержание основного действующего вещества в присутствии специфических примесей и продуктов деструкции. Исследования проводили на отечественном микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», Новосибирск) с колонкой (75x2 мм), заполненной обращенно - фазовым сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ.

Проведенная апробация показала, что методика характеризуется хорошей воспроизводимостью, позволяет надежно контролировать качество с использованием отечественного оборудования.

Методика может быть рекомендована для включения в фармакопейную статью на таблетки офлоксацина, линезолида и эфавиренза как альтернативная. Методика внедрена в практику работы судебно - химического отделения ГБУЗ «Иркутское Областное Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Иркутска.

Начальник ГБУЗ «Иркутское
Областное Бюро судебно - медицинской
экспертизы» г. Иркутска



Д.В. Перфильев



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

ИРКУТСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО СУДЕБНО-
МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

Гагарина бульвар, д.4, Иркутск, 664022
Тел./ факс (3952) 28-09-48

E-mail: iobsme@front.ru

18.03.2019 № 535

На № _____ от _____

Акт апробации и внедрения

В судебно-химическом отделении ГБУЗ «Иркутское Областное Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Иркутска апробирована методика изолирования офлоксацина из мочи методом жидкость-жидкостной экстракции.

Методика разработана на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета аспирантом Тютриной В.А., к.ф.н. Чмелевской Н.В., д.х.н., профессором Илларионовой Е. А.

Оптимальными растворителями для изолирования офлоксацина являются хлороформ и дихлорметан, которые максимально экстрагируют его при pH 6. В качестве высаливающего компонента применялся аммония сульфат насыщенный. Использовался двукратный вариант экстрагирования в течение 3 минут в случае экстракции хлороформом и трёхкратный вариант экстрагирования в течение 3 минут при экстракции дихлорметаном.

Проведенная апробация показала, что методика проста в выполнении, характеризуется хорошей воспроизводимостью, не требует дорогостоящих реагентов, позволяет наиболее полно изолировать офлоксацин из мочи.

Методика внедрена в практику работы судебно - химического отделения ГБУЗ «Иркутское Областное Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Иркутска.

Начальник ГБУЗ «Иркутское
Областное Бюро судебно - медицинской
экспертизы» г. Иркутска



Д.В. Перфильев



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

ИРКУТСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО СУДЕБНО-
МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

Гагарина бульвар, д.4, Иркутск, 664022
Тел./ факс (3952) 28-09-48

E-mail: iobsme@front.ru

18.03.2019 № 535

На № _____ от _____

Акт апробации и внедрения

В судебно-химическом отделении ГБУЗ «Иркутское Областное Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Иркутска апробирована методика изолирования линезолида из мочи методом жидкость-жидкостной экстракции.

Методика разработана на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета аспирантом Тютриной В.А., к.ф.н. Чмелевской Н.В., д.х.н., профессором Илларионовой Е. А.

Оптимальными растворителями для изолирования линезолида являются этилацетат и дихлорметан, которые максимально экстрагируют его при pH 5 и 4, соответственно. В качестве высылающего компонента применялся аммония сульфат насыщенный. Использовался двукратный вариант экстрагирования в течение 7 минут в случае экстракции этилацетатом и двукратный вариант экстрагирования в течение 5 мин при экстракции дихлорметаном.

Проведенная апробация показала, что методика проста в выполнении, характеризуется хорошей воспроизводимостью, не требует дорогостоящих реагентов, позволяет наиболее полно изолировать линезолид из мочи.

Методика внедрена в практику работы судебно - химического отделения ГБУЗ «Иркутское Областное Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Иркутска.

Начальник ГБУЗ «Иркутское
Областное Бюро судебно - медицинской
экспертизы» г. Иркутска



Д.В. Перфильев



РОССИЯ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
**«ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России)
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1
тел. (3952) 24-38-25, факс 24-38-25, 24-35-97
e-mail: administrator@ismu.baikal.ru
Internet: www.ismu.irkutsk.ru
ОКПО 01963054 ОГРН 1023801539673
ИНН/КПП 3811022096/381101001
08.11.2019 № 1687/18

на №

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по НИР

Иркутского государственного
медицинского университета

проф. И. Ж. Семинский

«2 » сентября 2019 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Название предложения: Унифицированная методика идентификации и количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с другими лекарственными веществами (амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом) в извлечениях из мочи методом высокоеффективной жидкостной хроматографии

Авторы: аспирант Тютрина В.А., Чмелевская Н.В., проф. Илларионова Е. А.

Для идентификации и количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с другими лекарственными веществами (амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом) в извлечениях из мочи авторами разработана унифицированная методика количественного определения методом высокоеффективной жидкостной хроматографии.

Проведенная апробация показала, что разработанная методика унифицирована, оптимизирована и экономична; характеризуется хорошей воспроизводимостью, позволяет надежно идентифицировать и определять количественное содержание офлоксацина, линезолида и эфавиренза в присутствии других лекарственных веществ (амитриптилина, дифенгидрамина, имипрамина, морфина, прокайна, рифампицина и фенобарбитала). Метрологические характеристики разработанной методики анализа удовлетворяют требованиям, принятым для биоаналитических методов.

Предложение использовано с 4 февраля 2019 г в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета. К акту прилагается методика идентификации и количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с другими лекарственными веществами (амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом) в извлечениях из мочи методом высокоеффективной жидкостной хроматографии.

Доцент кафедры фармацевтической и
токсикологической химии
ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, к.ф.н.

Сыроватский И.П.



Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
**«ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России)
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1
тел. (3952) 24-38-25, факс 24-38-25, 24-35-97
e-mail: administrator@ismu.baikal.ru
Internet: www.ismu.irkutsk.ru
ОКПО 01963054 ОГРН 1023801539673
ИНН/КПП 3811022096/381101001
08.11.2019 № 1686/18

на №

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по НИР
Иркутского государственного
медицинского университета

проф. И. Ж. Семинский
«2 » сентября 2019 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Название предложения: Унифицированная методика количественного определения эфавирина в таблетках по 0,60 г методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Авторы: аспирант Тютрина В.А., Чмелевская Н.В., проф. Илларионова Е. А.
Для количественного определения эфавирина в таблетках по 0,60 г авторами разработана унифицированная методика количественного определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Разработанная унифицированная методика определения эфавирина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии характеризуется хорошей воспроизводимостью, позволяет надежно выполнять количественное определение действующего вещества в таблетках, контролировать качество анализа, повысить воспроизводимость результатов определения, уменьшить погрешность анализа.

Предложение использовано с 4 февраля 2019 г в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета.

К акту прилагается методика количественного определения эфавирина в таблетках по 0,60 г методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Доцент кафедры фармацевтической и
токсикологической химии
ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, к.ф.н.

Сыроватский И.П.



Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
**«ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России)
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1
тел. (3952) 24-38-25, факс 24-38-25, 24-35-97
e-mail: administrator@ismu.baikal.ru
Internet: www.ismu.irkutsk.ru
ОКПО 01963054 ОГРН 1023801539673
ИНН/КПП 3811022096/381101001

08.11.2019 № 1685/18

на №

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по НИР
Иркутского государственного
медицинского университета
проф. И. Ж. Семинский
«2 » сентября 2019 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Название предложения: Унифицированные методики количественного определения линезолида в субстанции и в таблетках по 0,60 г спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду

Авторы: аспирант Тютрина В.А., Чмелевская Н.В., проф. Илларионова Е. А.

Для количественного определения линезолида в субстанции и в таблетках по 0,60 г авторами разработаны унифицированные спектрофотометрические методики с использованием в качестве оптического образца сравнения калия феррицианида.

Предлагаемые методики просты в выполнении, характеризуются хорошей воспроизводимостью, не требуют токсичных и дорогостоящих реагентов. Разработанные унифицированные методики определения линезолида спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду позволяют выполнять количественное определение в субстанции и таблетках одним и тем же методом в одинаковых условиях и надежно контролировать качество, повысить воспроизводимость результатов определения, уменьшить трудоемкость, стоимость и погрешность анализа.

Предложение использовано с 4 февраля 2019 г в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета.

К акту прилагаются методики количественного определения линезолида в субстанции и в таблетках по 0,60 г спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду.

Доцент кафедры фармацевтической и
токсикологической химии
ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, к.ф.н.

Сыроватский И.П.



РОССИЯ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
**«ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России)
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1
тел. (3952) 24-38-25, факс 24-38-25, 24-35-97
e-mail: administrator@ismu.baikal.ru
Internet: www.ismu.irkutsk.ru
ОКПО 01963054 ОГРН 1023801539673
ИНН/КПП 3811022096/381101001
08.11.2019 № 1684/18

на №

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по НИР
Иркутского государственного
медицинского университета

проф. И. Ж. Семинский
«4 » сентября 2019 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Название предложения: Унифицированная методика количественного определения офлоксацина в субстанции и в таблетках по 0,20 г спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду

Авторы: аспирант Тютрина В.А., Чмелевская Н.В., проф. Илларионова Е. А.

Для количественного определения офлоксацина в субстанции и в таблетках по 0,20 г авторами разработана унифицированная спектрофотометрическая методика с использованием в качестве оптического образца сравнения калия феррицианиду.

Предлагаемая методика проста в выполнении, характеризуется хорошей воспроизводимостью, не требует токсичных и дорогостоящих реагентов. Разработанная унифицированная методика определения офлоксацина спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду позволяет выполнять количественное определение в субстанции и таблетках одним и тем же методом в одинаковых условиях и надежно контролировать качество, повысить воспроизводимость результатов определения, уменьшить трудоемкость, стоимость и погрешность анализа.

Предложение использовано с 4 февраля 2019 г в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета.

К акту прилагается методика количественного определения офлоксацина в субстанции и в таблетках по 0,20 г спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду.

Доцент кафедры фармацевтической и
токсикологической химии
ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, к.ф.н.

Сыроватский И.П.





Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
**«ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России)
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1
тел. (3952) 24-38-25, факс 24-38-25, 24-35-97
e-mail: administrator@ismu.baikal.ru
Internet: www.ismu.irkutsk.ru
ОКПО 01963054 ОГРН 1023801539673
ИНН/КПП 3811022096/381101001
08.11.2019 № 1683/18

на №

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по НИР

Иркутского государственного
медицинского университета

проф. И. Ж. Семинский

«2 » сентября 2019 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Название предложения: Унифицированные методики количественного определения эфавиренза в субстанции и в таблетках по 0,6 г спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду

Авторы: аспирант Тютрин В.А., Чмелевская Н.В., проф. Илларионова Е. А.

Для количественного определения эфавиренза в субстанции и таблетках по 0,6 г авторами разработана унифицированная спектрофотометрическая методика с использованием в качестве оптических образцов сравнения калия феррицианида и калия хромата.

Предлагаемая методика проста в выполнении, характеризуется хорошей воспроизводимостью, не требует токсичных и дорогостоящих реагентов. Разработанная унифицированная методика определения эфавиренза спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду и калия хромату позволяет выполнять количественное определение в субстанции и таблетках одним и тем же методом в одинаковых условиях и надежно контролировать качество, повысить воспроизводимость результатов определения, уменьшить трудоемкость, стоимость и погрешность анализа.

Предложение использовано с 4 февраля 2019 г в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета.

К акту прилагается методика количественного определения эфавиренза в субстанции и в таблетках по 0,6 г спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду и калия хромату.

Доцент кафедры фармацевтической и
токсикологической химии
ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, к.ф.н.

C

Сыроватский И.П.



Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
**«ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России)
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1
тел. (3952) 24-38-25, факс 24-38-25, 24-35-97
e-mail: administrator@ismu.baikal.ru
Internet: www.ismu.irkutsk.ru
ОКПО 01963054 ОГРН 1023801539673
ИНН/КПП 3811022096/381101001
08.11.2019 № 1682/18

на №

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по НИР
Иркутского государственного
медицинского университета
проф. И. Ж. Семинский
«2 » сентября 2019 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Название предложения: Унифицированная методика количественного определения линезолида в таблетках по 0,60 г методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Авторы: аспирант Тютрина В.А., Чмелевская Н.В., проф. Илларионова Е. А.
Для количественного определения линезолида в таблетках по 0,60 г авторами разработана унифицированная методика количественного определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Разработанная унифицированная методика определения линезолида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии характеризуется хорошей воспроизводимостью, позволяет надежно выполнять количественное определение действующего вещества в таблетках, контролировать качество анализа, повысить воспроизводимость результатов определения, уменьшить погрешность анализа.

Предложение использовано с 4 февраля 2019 г в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета.

К акту прилагается методика количественного определения линезолида в таблетках по 0,60 г методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Доцент кафедры фармацевтической и
токсикологической химии
ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, к.ф.н.

Сыроватский И.П.



Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
**«ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России)
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1
тел. (3952) 24-38-25, факс 24-38-25, 24-35-97
e-mail: administrator@ismu.baikal.ru
Internet: www.ismu.irkutsk.ru
ОКПО 01963054 ОГРН 1023801539673
ИНН/КПП 3811022096/381101001
08.11.2019 № 1681/18

«УТВЕРЖДАЮ»
Проректор по НИР
Иркутского государственного
медицинского университета

prof. И. Ж. Семинский
«2 » сентября 2019 г.



на № _____

АКТ ВНЕДРЕНИЯ ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Название предложения: Унифицированная методика идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с другими лекарственными веществами (амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом) в извлечениях из мочи методом хроматографии в тонком слое сорбента.

Авторы: аспирант Тютрин В.А., Чмелевская Н.В., проф. Илларионова Е. А.

Для идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с другими лекарственными веществами (амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом).

Метод ТСХ позволяет определять офлоксацин, линезолид и эфавиренз в присутствии с другими лекарственными веществами (амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом). Исследования проводили на отечественных пластинках «Армсорб» или «Сорб菲尔» с использованием системы растворителей этилацетат – хлороформ – амиака раствор концентрированный 25% (17:2:1,5).

Проведенная апробация показала, что методика характеризуется хорошей воспроизводимостью, позволяет надежно идентифицировать офлоксацин, линезолид и эфавиренз в присутствии амитриптилина, дифенгидрамина, имипрамина, морфина, прокайна, рифампицина и фенобарбитала.

Предложение использовано с 4 февраля 2019 г в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета. К акту прилагается методика идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с другими лекарственными веществами (амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом) в извлечениях из мочи методом хроматографии в тонком слое сорбента.

Доцент кафедры фармацевтической и
токсикологической химии
ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, к.ф.н.

Сыроватский И.П.



Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение
высшего образования
**«ИРКУТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России)
664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1
тел. (3952) 24-38-25, факс 24-38-25, 24-35-97
e-mail: administrator@ismu.baikal.ru
Internet: www.ismu.irkutsk.ru
ОКПО 01963054 ОГРН 1023801539673
ИНН/КПП 3811022096/381101001
08.11.2019 № 1688/18

на №

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по НИР

Иркутского государственного
медицинского университета

проф. И. Ж. Семинский

«2 » сентября 2019 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Название предложения: Унифицированная методика количественного определения оффлоксацина в таблетках по 0,20 г методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Авторы: аспирант Тютрина В.А., Чмелевская Н.В., проф. Илларионова Е. А.
Для количественного определения оффлоксацина в таблетках по 0,20 г авторами разработана унифицированная методика количественного определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Разработанная унифицированная методика определения оффлоксацина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии характеризуется хорошей воспроизводимостью, позволяет надежно выполнять количественное определение действующего вещества в таблетках, контролировать качество анализа, повысить воспроизводимость результатов определения, уменьшить погрешность анализа.

Предложение использовано с 4 февраля 2019 г в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета.

К акту прилагается методика количественного определения оффлоксацина в таблетках по 0,20 г методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Доцент кафедры фармацевтической и
токсикологической химии
ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, к.ф.н.

Сыроватский И.П.



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ

ИРКУТСКОЕ ОБЛАСТНОЕ БЮРО СУДЕБНО-
МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ

Гагарина бульвар, д.4, Иркутск, 664022

Тел./ факс (3952) 28-09-48

E-mail: iobsme@front.ru

18.03.2019 № 535

На № _____ от _____

Акт аprobации и внедрения

В судебно-химическом отделении ГБУЗ «Иркутское Областное Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Иркутска аprobирована методика идентификации и количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с другими лекарственными веществами (амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокайном, рифампицином и фенобарбиталом) в извлечениях из мочи методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Методика разработана на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Иркутского государственного медицинского университета аспирантом Тютриной В.А., к.ф.н. Чмелевской Н.В., д.х.н., профессором Илларионовой Е. А.

Для идентификации и количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в извлечениях из мочи при комбинированном отравлении с другими лекарственными веществами используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Метод ВЭЖХ позволяет определять офлоксацин, линезолид и эфавиренз в присутствии амитриптилина, дифенгидрамина, имипрамина, морфина, прокайна, рифампицина и фенобарбитала. Исследования проводили на отечественном микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», Новосибирск) с колонкой (75x2 мм), заполненной обращенно - фазовым сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ.

Проведенная аprobация показала, что методика унифицирована, оптимизирована и экономична; характеризуется хорошей воспроизводимостью, позволяет надежно идентифицировать и определять количественное содержание офлоксацина, линезолида и эфавиренза в присутствии амитриптилина, дифенгидрамина, имипрамина, морфина, прокайна, рифампицина и фенобарбитала. Метрологические характеристики разработанной методики анализа удовлетворяют требованиям, принятым для биоаналитических методов.

Методика внедрена в практику работы судебно-химического отделения ГБУЗ «Иркутское Областное Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Иркутска.

Начальник ГБУЗ «Иркутское
Областное Бюро судебно - медицинской
экспертизы» г. Иркутска

Д.В. Перфильев

