

На правах рукописи



Тютрина Вера Александровна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ АНАЛИЗА
ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Улан-Удэ – 2020

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

Научный руководитель:

Илларионова Елена Анатольевна - доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

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

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

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «03» июня 2020 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 999.140.03 при ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН по адресу: 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6.

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

Автореферат разослан «27» марта 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.б.н, доцент

Хобракова Валентина Бимбаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Несмотря на определенные успехи в профилактике и лечении инфекционных болезней, они остаются важнейшей проблемой медицинской науки и практического здравоохранения (Белозеров Е.С. и др., 2016). 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 (Шанин И.А., Шаймарданов А.Р., Тхай Н.Т.Д, Еремин С.А., 2015). Линезолид – синтетический антибиотик группы оксазолидинонов (Leach K.L, Brickner S.J., Noe M.C., Miller P.F., 2011; Robert C. Moellering Jr, 2003). Эфавиренз – антиретровирусный препарат группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (Прокофьева М.М., Кочетков С.Н., Прасолов В.С., 2016; De Clercq E., 2004). 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 несовершенны и не позволяют объективно оценить их качество. Для количественного определения офлоксацина в субстанции предложен метод ацидиметрии в среде уксусного ангидрида (НД № 42-14653-07, 2007). 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 (НД № 000704-120913, 2013; НД № 000520-260313, 2013; НД № 42-12212-02, 2002; НД № 002276-111013, 2013; НД № 002554-310714, 2014). 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 реактивов 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, рН 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, дифенгидраминам, имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенobarбиталом 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, дифенгидраминам, имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенobarбиталом 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 волны, рН 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 (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.

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 рН 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 рН 5, а дихлорметан при рН 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 рН 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 amitriptилином, дифенгидрамин, имипрамин, морфин, прокаин, рифампицин 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 «Республиканское 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 апробации 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 рН 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, дифенгидрамин, имипрамин, морфин, прокаин, рифампицин 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 «Инновационные 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Для разработки методик идентификации, разделения и количественного определения были использованы субстанции офлоксацина, линезолида, эфавиренза, дифенгидрамина, прокаина, морфина; лекарственные формы: таблетки офлоксацина, покрытые оболочкой, по 0,2 г, таблетки линезолида, покрытые оболочкой, по 0,2 г, таблетки эфавиренза, покрытые оболочкой, по 0,6 г, таблетки амитриптилина по 0,025 г, таблетки фенобарбитала по 0,1 г, капсулы рифампицина по 0,15 г, таблетки имипрамина, покрытые плёночной оболочкой, по 0,025 г, отвечающие требованиям НД.

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.

Методы, использованные в работе: 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).

Исследования методом ТСХ выполняли, используя готовые пластинки «Армсорб», «Сорбфил». Детекцию веществ на хроматограммах проводили, используя УФ-осветитель (длина волны 254 нм), реактив Драгендорфа, пары йода. Хроматографические (ВЭЖХ) исследования проводили с использованием микроколоночного жидкостного хроматографа «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова», г. Новосибирск) с ультрафиолетовым спектрофотометрическим детектором. Были разработаны следующие хроматографические условия: 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. Во время пробоподготовки использовали: рН-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).

Оптимизация условий спектрофотометрического анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в субстанции и лекарственной форме

Для разработки методик анализа были изучены спектры поглощения растворов офлоксацина, линезолида и эфавиренза в интервале рН 1,0-13,0 в области от 200 до 400 нм и стабильность растворов при хранении. Выбор оптических образцов сравнения осуществляли исходя из аналитической длины волны лекарственного вещества, оптимального растворителя и оптимальной области поглощения образца сравнения (табл. 1).

Таблица 1 – Условия спектрофотометрического определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза

Лекарственное вещество	рН	λ макс, нм	Образец сравнения	λ макс, нм	Растворитель	Область поглощения, нм
Офлоксацин	1,1	293±1	Калия феррицианид	261±1 303±1 421±1	0,1М HCL	255-267 290-316 402-440
Линезолид	5,5	258±1	Калия феррицианид	261±1 303±1 421±1	0,1М HCL	255-267 290-316 402-440
Эфавиренз	12,5	267±1	Калия хромат	275±1 373±1	0,1М NaOH	264-286 357-389
			Калия феррицианид	261±1 303±1 421±1	0,1М NaOH	255-267 290-316 402-440

В качестве образцов сравнения нами использованы вещества неорганической природы: калия хромат (ГОСТ 4459-75), калия феррицианид (ГОСТ 4206-75). Данные вещества широко применяются в аналитической практике в качестве реактивов, выпускаются химической промышленностью квалификации «х.ч.» и «ч.д.а.», доступны, дешевы, на них имеются ГОСТы, регламентирующие их качество, содержание в них основного вещества определяется химическими методами и составляет не менее 99,9%.

Аналитическая длина волны офлоксацина (293 нм) в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М входит в интервал оптимальный для калия феррицианида (290-316 нм). Калия феррицианид выбран в качестве оптического образца сравнения для количественного определения офлоксацина. Аналитическая длина волны линезолида (258 нм) при рН 5,5 входит в интервал оптимальный для калия феррицианида (255-267 нм). Калия феррицианид предложен в качестве оптического образца сравнения для спектрофотометрического определения линезолида. Аналитическая длина волны эфавиренза при рН 12,5 (267 нм) входит в интервал, оптимальный для калия хромата (264-286 нм) и калия феррицианида (255-267 нм). Эти соединения использовали для спектрофотометрического анализа эфавиренза в субстанции и лекарственной форме.

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

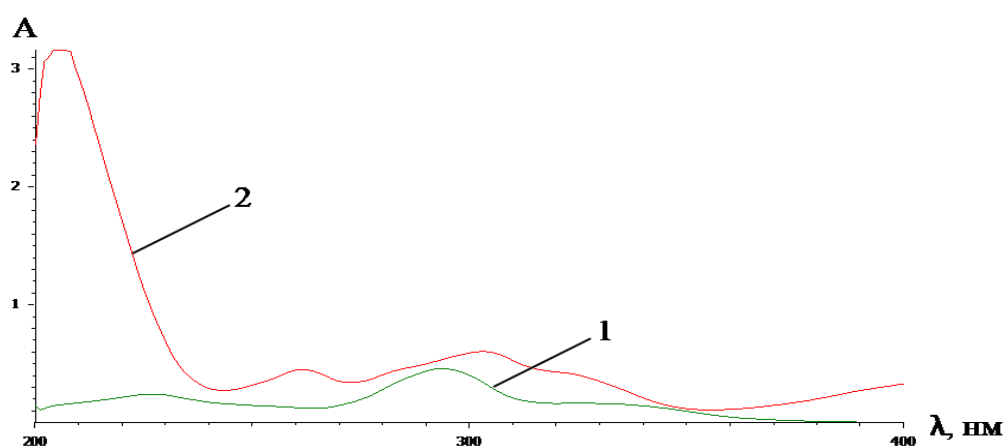


Рисунок 1 – УФ-спектры поглощения 0,0005% раствора офлоксацина и 0,012% раствора калия феррицианида в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М. 1 – офлоксацин; 2 – калия феррицианид

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

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

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

Таблица 2 – Результаты спектрофотометрического определения исследуемых веществ в субстанциях

Лекарственное вещество, № серии	Образцы сравнения	Метрологические характеристики (n=10, P=0,95%)							
		$K_{пер}$	\bar{X} , %	S^2	S	S_x	$\Delta\bar{X}$	\bar{E} %	S_r
Офлоксацин 98,5–101,5% ДС-0301Н- 1411001	Калия феррицианид	0,0455	100,12	1,5327	1,2380	0,3915	0,88	0,88	0,012
Линезолид 98,0 – 102% 06147065	Калия феррицианид	0,0524	99,75	1,0398	1,0197	0,3225	0,73	0,73	0,010
Эфавиренз 98–102% EFVB16024	Калия хромат	0,3008	100,16	0,8126	0,9015	0,2851	0,64	0,64	0,009
	Калия феррицианид	0,0526	100,18	0,6981	0,8355	0,2642	0,60	0,60	0,008

Таблица 3 – Результаты спектрофотометрического определения исследуемых веществ в лекарственных формах

Лекарственная форма № серии	Образцы сравнения	Метрологические характеристики (n=10, P=0,95%)						
		\bar{X}	S^2	S	S_x	$\Delta\bar{X}$	$\bar{E} \%$	S_f
Офлоксацин таб. по 0,20 г 90-110% 030516	Калия феррицианид	99,27	2,3897	1,5459	0,4888	1,10	1,11	0,016
Линезолид таб. по 0,20 г 95-105% 150916	Калия феррицианид	100,38	3,2104	1,7918	0,5666	1,28	1,28	0,018
Эфавиренз таб. по 0,60 г 92,5-107,5% 371116	Калия хромат	99,90	0,5315	0,7290	0,2305	0,52	0,52	0,007
	Калия феррицианид	99,44	1,0813	1,0399	0,3288	0,74	0,75	0,010

Относительная погрешность определений не превышает для субстанций 0,88% и для готовых лекарственных форм 1,28%.

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

Таблица 4 – Результаты валидационной оценки методики спектрофотометрического определения линезолида по калия феррицианиду

Параметры	Критерии валидности	Результаты испытания линезолида	
		в субстанции	в таблетках
Специфичность		Специфична	Специфична
Прецизионность:			
1. Сходимость	$RSD < 2\%$ $t_{табл} \geq t_{выч}$	$RSD=0,60,$ $t_{выч} = 0,19$ ($t_{табл} = 2,26$), $n=10$	$RSD=0,78,$ $t_{выч} = 1,01$ ($t_{табл} = 2,26$), $n = 10$
2. Воспроизводимость	$RSD < 3\%$ $t_{табл} \geq t_{выч}$	$RSD=0,73,$ $t_{выч} = 0,77$ ($t_{табл} = 2,26$), $n = 10$	$RSD=1,17,$ $t_{выч} = 1,84$ ($t_{табл} = 2,26$), $n = 10$
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

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

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

Разработаны методики количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в лекарственных формах методом ВЭЖХ. Для анализа выбран обращенно-фазовый вариант хроматографии. Исследования проводили на отечественном микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02».

Оптимальные условия хроматографирования: хроматографическая колонка (75×2 мм), неподвижная фаза: полимерный сорбент ProntoSIL-120-5-S18 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. Время анализа около 14 мин.

Времена удерживания офлоксацина, линезолида и эфавиренза составляют 3,9 мин, 5,7 мин и 13,9 мин соответственно.

Результаты количественного определения на примере таблеток эфавиренза методом ВЭЖХ приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты количественного определения таблеток эфавиренза, 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%	S _r
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

Оценка правильности предложенных методик проведена на примере модельных смесей лекарственных форм офлоксацина, линезолида и эфавиренза с тремя уровнями концентраций (от 80 до 120%) от заявленного количества в лекарственной форме. В таблице 6 приведена валидационная оценка разработанных методик количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза по показателям: пригодность хроматографической системы (эффективность колонки, коэффициент асимметрии пика), прецизионность (сходимость, воспроизводимость), линейность результатов, стабильность раствора. Данные, представленные в таблице 6, свидетельствуют о пригодности предложенных методик.

Разработанные методики количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза в лекарственных формах методом ВЭЖХ с УФ-детекцией на хроматографе отечественного производства «Милихром А-02» характеризуются селективностью, экспрессностью и правильностью. Кроме того, такие вспомогательные вещества как целлюлоза, карбоксиметилкрахмал

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

Таблица 6 – Результаты проведения валидационной оценки 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	RSD ≤ 2,0%	1,00	1,05	1,11
Воспроизводимость	RSD ≤ 3,0%	1,18	1,08	1,15
Линейность результатов	$R^2 \geq 0,990$	$R^2 = 1$ $y = 58,40x$	$R^2 = 0,998$ $y = 90,34x$	$R^2 = 1$ $y = 85,87x$
Стабильность раствора	индивидуально	В течение суток	В течение суток	В течение суток

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

Разработка условий изолирования офлоксацина, линезолида и эфавиренза из биологических объектов

Изучено влияние факторов (природа органического растворителя, рН среды, электролит, время и кратность экстракции) на извлечение офлоксацина, линезолида и эфавиренза из растворов (табл. 7).

Из таблицы 7 видно, что дихлорметан является оптимальным органическим растворителем для экстракции всех исследуемых веществ, извлекающий в максимальном количестве офлоксацин при рН 6, линезолид – при рН 4, эфавиренз – при рН 2. Кроме того, для изолирования офлоксацина также предложен хлороформ при рН 6, для линезолида – этилацетат при рН 5, для эфавиренза – эфир диэтиловый при рН 3. Аммония сульфата насыщенный раствор увеличивает экстракцию офлоксацина и линезолида, натрия хлорида раствор 20% и натрия хлорида раствор насыщенный – эфавиренза при

извлечения эфиром диэтиловым и дихлорметаном соответственно. 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.

Таблица 7 – Оптимальные условия изолирования исследуемых лекарственных средств

Исследуемое вещество	Растворитель	pH среды	Электролит	Время экстракции (мин)	Кратность экстракции
Офлоксацин	Хлороформ	6	(NH ₄) ₂ SO ₄ (насыщ)	3	2
	Дихлорметан	6	(NH ₄) ₂ SO ₄ (насыщ)	3	3
Линезолид	Этилацетат	5	(NH ₄) ₂ SO ₄ (насыщ)	7	2
	Дихлорметан	4	(NH ₄) ₂ SO ₄ (насыщ)	5	2
Эфавиренз	Эфир диэтиловый	3	NaCl 20%	3	3
	Дихлорметан	2	NaCl (насыщ)	7	3

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.

Результаты изолирования из модельного образца мочи на примере офлоксацина представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Определение степени извлечения офлоксацина дихлорметаном из модельного образца мочи спектрофотометрическим методом по калия феррицианиду

Внесено, мг	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики (n=6)
200	79,50; 79,95; 80,87; 79,29; 80,85; 79,42;	$\bar{X} = 79,98\%$; $S_{\bar{X}} = 0,29$; $\Delta\bar{X} = 0,75$; $E = 0,94\%$
1000	76,00; 76,41; 76,19; 75,83; 75,04; 76,15;	$\bar{X} = 75,94\%$; $S_{\bar{X}} = 0,20$; $\Delta\bar{X} = 0,50$; $E = 0,66\%$;
2000	75,11; 74,74; 74,00; 74,52; 74,81; 74,96;	$\bar{X} = 74,69\%$; $S_{\bar{X}} = 0,16$; $\Delta\bar{X} = 0,41$; $E = 0,55\%$;

В извлечении из модельного образца мочи обнаруживается от 74,00% до 80,87% офлоксацина.

Разделение и идентификация офлоксацина, линезолида и эфавиренза в комбинированных сочетаниях с лекарственными средствами различных фармакологических групп методами ТСХ и ВЭЖХ

Так как лечение бактериальных и вирусных инфекций зачастую проводится длительное время в комбинации с препаратами других фармакологических групп, возрастает опасность возникновения острых отравлений. Известно, что одним из главных побочных эффектов эфавиренза является его тяжелое действие на центральную нервную систему (Decloedt E.H. et al, 2013), что может привести к ошибочному приёму дозировки, превышающей требуемую, а также к намеренному приему более высокой дозы с суицидальной целью. Кроме того, появление острых отравлений может быть связано с повышенной чувствительностью к ним отдельных лиц.

Согласно проведенному анализу литературных данных, встречаются случаи отравления офлоксацином, линезолидом и эфавирензом (Tripathy S. et al, 2009; Variava E. et al, 2017; Hauptfleisch M.P.K. et al, 2015; Im J.H. et al, 2015; Xiao B. et al, 2018; Hassan O.K. et al, 2016; Nepali N., 2007). Наиболее часто назначаемыми совместно препаратами являются: амитриптилин, дифенгидрамин, имипрамин, морфин, прокаин, рифампицин и фенobarбитал.

Офлоксацин, в соответствии с приказом Минздрава России № 460 от 29 декабря 2000 г «Об утверждении учетной документации токсикологического мониторинга», включен в «Перечень наименований токсичных веществ, наиболее часто встречающихся при острых отравлениях».

Разработаны унифицированные методики разделения, идентификации и количественного определения офлоксацина, линезолида и эфавиренза при комбинированных сочетаниях с вышеперечисленными препаратами методами ТСХ и ВЭЖХ.

Для выбора условий разделения методом ТСХ была определена хроматографическая подвижность исследуемых веществ в общих системах растворителей, наиболее часто применяемых для веществ основного характера в ХТА на этапе скрининга. Полученные результаты показали, что разделение офлоксацина, линезолида, эфавиренза и лекарственных веществ других фармакологических групп идет недостаточно четко, поэтому возникла необходимость разработки частных систем хроматографирования, позволяющих отделить офлоксацин, линезолид и эфавиренз от амитриптилина, дифенгидрамина, имипрамина, морфина, прокаина, рифампицина и фенobarбитала. Было изучено влияние органических растворителей различной полярности, основности и кислотности на хроматографическую подвижность исследуемых соединений. Анализ значений ΔR_f между зонами показал, что наибольшее значение ΔR_f между зонами наблюдается для системы растворителей этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1,5). Разработанную методику в дальнейшем использовали для

анализа комбинированных сочетаний после извлечения их из модельного образца мочи.

В таблице 9 представлены результаты хроматографирования офлоксацина, линезолида и эфавиренза при комбинированных отравлениях с лекарственными веществами других фармакологических групп после извлечения их из модельного образца мочи.

Таблица 9 – Результаты хроматографирования офлоксацина, линезолида, эфавиренза и лекарственных веществ других фармакологических групп при комбинированных отравлениях в модельном образце мочи с использованием метода 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	Прокаин	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	Прокаин	0,55±0,01
Имипрамин	0,55±0,01	Дифенгидрамин	0,45±0,01

В настоящее время ВЭЖХ занимает одно из лидирующих мест среди инструментальных методов. Важнейшим преимуществом ВЭЖХ является возможность исследования практически любых объектов без каких-либо ограничений по их физико-химическим свойствам.

Для ВЭЖХ анализа смесей офлоксацина, линезолида и эфавиренза в сочетании с амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенобарбиталом был выбран обращенно-фазовый вариант. Разработаны оптимальные условия: 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: 3700мкл 5% - 70% Б (0-35 мин). Скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин. Температура термостата хроматографической колонки – 40°C.

Результаты хроматографического определения офлоксацина, линезолида, эфавиренза и лекарственных веществ других фармакологических групп после извлечения их из модельного образца мочи представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты хроматографического анализа исследуемых соединений в предложенных условиях

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	$\bar{X} = 9,13$; $S_{\bar{X}} = 0,0026$; $\Delta\bar{X} = 0,0066$; $E = 0,07\%$
Прокаин	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; 15,4; 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; 34,5; 34,5	$\bar{X} = 34,49$; $S_{\bar{X}} = 0,0033$; $\Delta\bar{X} = 0,0086$; $E = 0,02\%$

Таким образом, разработанная унифицированная методика позволяет использовать метод ВЭЖХ для идентификации офлоксацина, линезолида и эфавиренза в комбинированных сочетаниях с амитриптилином, дифенгидрамином, имипрамином, морфином, прокаином, рифампицином и фенобарбиталом.

ВЫВОДЫ

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% и предложены проекты изменений ФСП.

3. 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.

4. 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. Разработаны проекты изменений ФСП.

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

6. Впервые на основании изучения хроматографической подвижности офлоксацина, линезолида и эфавиренза в комбинированных сочетаниях с амитриптилином, дифенгидрамин, имипрамин, морфин, прокаин, рифампицин и фенобарбиталом определена система растворителей этилацетат – хлороформ – аммиака раствор концентрированный 25% (17:2:1,5) и разработана методика их разделения и идентификации при совместном присутствии с амитриптилином, дифенгидрамин, имипрамин, морфин, прокаин, рифампицин и фенобарбиталом методом ТСХ.

7. Предложены условия хроматографирования комбинаций офлоксацина, линезолида и эфавиренза с амитриптилином, дифенгидрамин, имипрамин, морфин, прокаин, рифампицин и фенобарбиталом методом ВЭЖХ; разработаны методики разделения и идентификации их в сочетаниях с амитриптилином, дифенгидрамин, имипрамин, морфин, прокаин, рифампицин и фенобарбиталом в извлечениях из модельного образца мочи методом ВЭЖХ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Тютрина В.А. Оптимизация условий спектрофотометрического определения офлоксацина / В.А. Тютрина, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Журнал МедиАль. – 2017. – № 1 (19). – С. 327.
2. Тютрина В.А. Изучение условий изолирования офлоксацина из раствора / В.А. Тютрина, Н.В. Чмелевская // Беликовские чтения: материалы V Всероссийской научно-практической конференции. – Пятигорск, 2017. – С. 86-88.
3. Тютрина В.А. Разработка методики изолирования офлоксацина / В.А. Тютрина // 84-я Всероссийская Байкальская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием посвященная 95-летию научного общества молодых ученых и студентов им. И.И. Мечникова: сб. науч. трудов. – Иркутск, 2017. – С. 78.
4. Тютрина В.А. Изучение хроматографической подвижности фторсодержащих лекарственных средств в комбинированных сочетаниях / В.А. Тютрина, А.А. Зубрицкая // 84-я Всероссийская Байкальская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием посвященная 95-летию научного общества молодых ученых и студентов им. И.И. Мечникова: сб. науч. трудов. – Иркутск, 2017. – С. 306-307.
5. Тютрина В.А. Разработка новой методики количественного определения офлоксацина / В.А. Тютрина, А.Г. Уразбахт // 84-я Всероссийская Байкальская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием посвященная 95-летию научного общества молодых ученых и студентов им. И.И. Мечникова: сб. науч. трудов. – Иркутск, 2017. – С. 322-323.
6. Тютрина В.А. Разработка методики изолирования офлоксацина в модельной смеси мочи / В.А. Тютрина, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Дальневосточный медицинский журнал. – 2017. – №4. – С. 65-68.
7. Тютрина В.А. Химико-фармацевтический анализ офлоксацина / В.А. Тютрина // 85-я Всероссийская Байкальская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием, посвященная 95-летию научного общества молодых ученых и студентов им. И.И. Мечникова: сб. науч. трудов. – Иркутск, 2018. – С. 469-470.
8. Тютрина В.А. Разработка новой методики количественного определения линезолида / В.А. Тютрина, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-

- практ. конф. с междунар. участием, посвящённая памяти доцента Пешковой В.А. – Иркутск, 2018. – С. 141-144.
9. Тютрина В.А. Разработка методики изолирования линезолида / В.А. Тютрина, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвящённая памяти доцента Пешковой В.А. – Иркутск, 2018. – С. 144-146 .
 10. Тютрина В.А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе комбинированных сочетаний офлоксацина, линезолида и эфавиренза с другими лекарственными средствами / В.А. Тютрина // 86-я Всероссийская Байкальская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины», посвященная 100-летию ИГМУ: сб. науч. трудов. – Иркутск, 2019. – С. 621-622.
 11. Тютрина В.А. Разработка методики обнаружения и количественного определения офлоксацина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / В.А. Тютрина // 86-я Всероссийская Байкальская научно-практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины», посвященная 100-летию ИГМУ: сб. науч. трудов. – Иркутск, 2019. – С. 627.
 12. Тютрина В.А. Оптимизация условий спектрофотометрического определения эфавиренза / В.А. Тютрина, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования: сб. ст. по материалам XXII Международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования». – М., Изд. «Интернаука», 2019. – № 4 (20). – С. 115-118.
 13. Тютрина В.А. Спектрофотометрический анализ линезолида / В.А. Тютрина, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // **Вестник Смоленской государственной медицинской академии.** – 2019. – Т. 18, №3. – С. 148-152.
 14. Тютрина В.А. Разработка методики изолирования эфавиренза из мочи / В.А. Тютрина, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // **Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье».** – 2019. – №2. – С. 95-101.
 15. Тютрина В.А., Разработка методики обнаружения и количественного определения линезолида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / В.А. Тютрина, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова //

Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященной 100-летию со дня образования Иркутского государственного медицинского университета. – Иркутск, 2019. – С. 207-210.

16. Тютрина В.А., Оптимизация условий изолирования эфавиренза из водных растворов / В.А. Тютрина, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // Инновационные технологии в фармации: мат-лы всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, посвященной 100-летию со дня образования Иркутского государственного медицинского университета. – Иркутск, 2019. – С. 211-213.
17. Тютрина В.А., Разработка и валидация методики количественного определения фторсодержащих лекарственных препаратов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / В.А. Тютрина, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2019. – №12. – С. 29-33.
18. Методика судебно-химического анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в моче (методические рекомендации) / В.А. Тютрина [и др.]// М.: РЦСМЭ, 2019. – 21 с.
19. Методика химико-токсикологического и судебно-химического анализа офлоксацина, линезолида и эфавиренза в вещественных доказательствах небиологического происхождения (методические рекомендации) / В.А. Тютрина [и др.] // М.: РЦСМЭ, 2019. – 23 с.
20. Пат. № 2710259, Российская Федерация МПК G01N 30/90. Способ определения и обнаружения в моче фторсодержащих лекарственных средств в комбинированных сочетаниях / В.А. Тютрина, Н.В. Чмелевская, Е.А. Илларионова; Заявитель и патентообладатель Илларионова Е.А. – № 2019120127; заявл. 26.06.2019, опубл. 25.12.2019, Бюл. №36. – 8 с.

Список условных сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГСО – государственный стандартный образец; ЖЖЭ – жидкость-жидкостная экстракция; НД – нормативная документация; ТСХ – тонкослойная хроматография; ФСП – фармакопейная статья предприятия; ХТА – химико - токсикологический анализ