



Оригинальная статья / Research article

Определение примесей в перспективных антиоксидантах бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфиде и додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфиде

Т. Г. Шинко^{1*}, С. В. Терентьева¹, С. Е. Ягунов², Н. В. Кандалинцева², О. И. Просенко²,
Е. А. Ивановская¹, П. И. Пинко²

¹ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России), 630091, Россия, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный педагогический университет» (ФГБОУ ВО «НГПУ»), 630126, Россия, г. Новосибирск, ул. Вилуйская, д. 28

*Контактное лицо: Шинко Татьяна Геннадьевна. E-mail: shinko.tatiana@yandex.ru

ORCID: Т. Г. Шинко – <https://orcid.org/0000-0001-7597-078X>; С. В. Терентьева – <https://orcid.org/0000-0003-3566-2760>; С. Е. Ягунов – <https://orcid.org/0000-0003-1274-0906>;

Н. В. Кандалинцева – <https://orcid.org/0000-0001-6022-934X>; О. И. Просенко – <https://orcid.org/0000-0001-8835-1945>; Е. А. Ивановская – <https://orcid.org/0000-0002-9338-5792>;

П. И. Пинко – <https://orcid.org/0000-0002-6045-9468>.

Статья поступила: 10.08.2021

Статья принята в печать: 24.01.2022

Статья опубликована: 25.02.2022

Резюме

Введение. Додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфид (Т1) и бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфид (Т2) – совместная разработка кафедры химии Новосибирского государственного педагогического университета и Новосибирского института антиоксидантов. В исследованиях и экспериментах была показана антиоксидантная, противовоспалительная, гепатопротекторная, цитопротекторная, гемореологическая активность данных веществ, что позволяет считать их перспективными лекарственными антиоксидантами. Для контроля качества при последующем производстве субстанций указанных соединений необходимо разработать параметры стандартизации и составить Проект Нормативной документации.

Цель. Разработка и валидация методик определения примесей новых перспективных биологически активных веществ Т1 и Т2.

Материалы и методы. Определение примесей проводили методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 278 нм на колонке ZORBAX SB-C18 (5 мкм, 150 × 4,6 мм) в изократическом режиме с использованием в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил – вода 95:5 при анализе Т1 и ацетонитрила при анализе Т2.

Результаты и обсуждение. В ходе разработки методик было установлено присутствие в исследуемых образцах Т1 двух неидентифицированных примесей, содержание которых в течение срока годности не превышает 0,1 %. На хроматограмме Т2 обнаружены побочный продукт синтеза – бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]дисульфид (Т2-ДС) с установленной биологической безопасностью и пределом содержания 2,5 %, а также неидентифицированная примесь с содержанием не более 0,1 %. Проведена валидация разработанных методик ВЭЖХ по характеристикам «Специфичность», «Предел количественного определения», «Линейность», «Прецизионность», «Правильность», «Аналитическая область».

Заключение. Методики определения примесей Т1 и Т2 валидированы по указанным выше параметрам. Полученные результаты удовлетворяют критериям приемлемости: вещества и примеси четко разделяются на хроматограммах между собой; коэффициент корреляции (*r*) при определении линейности для примесей превышает 0,980; свободный член уравнений линейной зависимости статистически значимо не отличается от нуля; величина относительного стандартного отклонения (RSD%) не более 5 %; рассчитанные значения критериев Стьюдента и Фишера не превышают табличные. Разработанные методики могут применяться для контроля качества опытных образцов и в будущем при производстве субстанций исследуемых веществ.

Ключевые слова: родственные примеси, додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфид, бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфид, ВЭЖХ, валидация, стандартизация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Т. Г. Шинко, С. Е. Ягунов, Н. В. Кандалинцева, О. И. Просенко, П. И. Пинко разработали эксперимент. Т. Г. Шинко, С. В. Терентьева, Е. А. Ивановская провели валидацию методик. Все авторы участвовали в обсуждении статьи, внесли вклад в окончательную рукопись.

Для цитирования: Шинко Т. Г., Терентьева С. В., Ягунов С. Е., Кандалинцева Н. В., Просенко О. И., Ивановская Е. А., Пинко П. И. Определение примесей в перспективных антиоксидантах бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфиде и додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфиде. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):106–112. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-106-112>

Determination of Impurities in New Promising Antioxidants Bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]sulfide and Dodecyl(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl)sulfide

Tatiana G. Shinko^{1*}, Svetlana V. Terentyeva¹, Semen Ye. Yagunov², Natalya V. Kandalintseva²,
Olga I. Prosenko², Yelena A. Ivanovskaya¹, Pavel I. Pinko²

¹ Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny av., Novosibirsk, 630091, Russia

² Novosibirsk State Pedagogical University, 28, Vilyuyskaya str., Novosibirsk, 630126, Russia

*Corresponding author: Tatiana G. Shinko. E-mail: shinko.tatiana@yandex.ru

© Шинко Т. Г., Терентьева С. В., Ягунов С. Е., Кандалинцева Н. В., Просенко О. И., Ивановская Е. А., Пинко П. И., 2022

© Shinko T. G., Terentyeva S. V., Yagunov S. Ye., Kandalintseva N. V., Prosenko O. I., Ivanovskaya Ye. A., Pinko P. I., 2022

ORCID: Tatiana G. Shinko – <https://orcid.org/0000-0001-7597-078X>; Svetlana V. Terentyeva – <https://orcid.org/0000-0003-3566-2760>;
Semen Ye. Yagunov – <https://orcid.org/0000-0003-1274-0906>; Natalya V. Kandalintseva – <https://orcid.org/0000-0001-6022-934X>;
Olga I. Prosenko – <https://orcid.org/0000-0001-8835-1945>; Yelena A. Ivanovskaya – <https://orcid.org/0000-0002-9338-5792>; Pavel I. Pinko – <https://orcid.org/0000-0002-6045-9468>.

Received: 10.08.2021 Revised: 24.01.2022 Published: 25.02.2022

Abstract

Introduction. Dodecyl(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl)sulfide (T1) and bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]sulfide (T2) are the collaborative development of Novosibirsk State Pedagogical University and Novosibirsk Research Institute of Antioxidants. It was revealed in several experiments and research works that these substances have antioxidant, anti-inflammatory, hepatoprotective, cytoprotective, haemorheological activities. These facts make the objects of study promising medicinal antioxidant drugs. Consequently it's necessary for the future production quality control to have standards and analytical methods for substances analysis.

Aim. Impurities methods development and validation for the new biologically active substances T1 and T2.

Materials and methods. HPLC method with UV-detection on 278 nm was carried out for the determination of impurities in objects of study. HPLC analysis were performed on ZORBAX SB-C18 (5 µm, 150 × 4,6 mm) column with isocratic regimen and with use of the acetonitrile:water mixture (T1) or acetonitrile (T2) as a mobile phase.

Results and discussion. It was found out, that T1 has two unidentified impurities with concentration not more than 0,1 % during the shelf life. The chromatogram of T2 has a peak of by-product of synthesis T2 – bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]disulfide (T2-DS). Biologically safety of T2-DS was demonstrated in the previous works and the concentration of T2-DS was established to be not more, than 2,5 %. Furthermore, there was the one more unidentified impurity with concentration less, than 0,1 % on the chromatogram of T2. The developed HPLC methods were validated on characteristics «specificity», «linearity», «precision», «limit of quantification», «accuracy», «range».

Conclusion. Methods for the determination of impurities in T1 and T2 were validated on the listed parameters. All the results meet the acceptance criteria: peaks on the chromatograms are clearly separated; the correlation coefficients (*r*) are not more, than 0,980; accuracy was proved by linearity parameters; the value of the relative standard deviation is less, than 5 %; the intermediate precision for the both methods was proved by Fisher's criterion and Student's t-test.

Keywords: impurities, dodecyl(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl)sulfide, bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]sulfide, HPLC, validation, standardization

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Tatiana G. Shinko, Semen Ye. Yagunov, Natalya V. Kandalintseva, Olga I. Prosenko and Pavel I. Pinko designed the experiment. Tatiana G. Shinko, Svetlana V. Terentyeva and Yelena A. Ivanovskaya – performed methods validation. All authors participated in the discussion of the article and contributed to the final text of the article.

For citation: Shinko T. G., Terentyeva S. V., Yagunov S. Ye., Kandalintseva N. V., Prosenko O. I., Ivanovskaya Ye. A., Pinko P. I. Determination of impurities in new promising antioxidants bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]sulfide and dodecyl(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl)sulfide. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2022;11(1):106–112. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-1-106-112>

ВВЕДЕНИЕ

Додецил(3,5-диметил-4-гидроксibenзил)сульфид (далее по тексту – T1) и бис-[3-(3,5-ди-tert-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфид (далее по тексту – T2) (рисунок 1) – полифункциональные фенольные серо-содержащие антиоксиданты, являющиеся совместной разработкой кафедры химии Новосибирского государственного педагогического университета и Новосибирского института антиоксидантов.

В результате исследований по установлению биологической активности указанных соединений, была выявлена антиоксидантная, противовоспалительная, гепатопротекторная, цитопротективная активность данных соединений [1–4]. Также было отмечено, что оба вещества способны усиливать противоопухолевый эффект цитостатических препаратов [5, 6]. Наряду с этим у T1 были определены гемореологический, антитромбоцитарный, антиагрегационный эффекты, что в совокупности обеспечивает протекторный эффект при ишемии головного мозга [3, 7]. Параллельно с биологической активностью, были исследованы

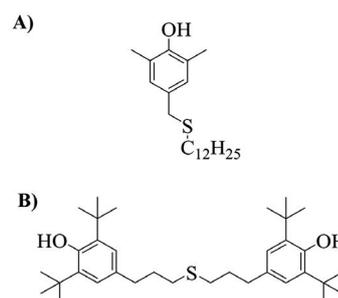


Рисунок 1. Структурные формулы додецил(3,5-диметил-4-гидроксibenзил)сульфида-T1 (A) и бис-[3-(3,5-ди-tert-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфида -T2 (B)

Figure 1. Chemical structure of dodecyl(3,5-dimethyl-4-hydroxybenzyl)sulfide-T1 (A) and bis-[3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propyl]sulfide-T2 (B)

эффективность и безопасность T1 и T2. Установлено, что описываемые вещества не оказывают токсического действия, не проявляют мутагенного и генотоксического свойств [8, 9]. Таким образом, данные соеди-

нения могут рассматриваться в качестве перспективных лекарственных препаратов-антиоксидантов с возможностью применения в комплексной терапии таких заболеваний, как гепатиты, злокачественные новообразования, атеросклероз, ишемическая болезнь.

Для регистрации и производства T1 и T2 в качестве субстанций лекарственных средств необходима, в том числе, разработка параметров стандартизации и составление Проектов Нормативных документов. Одним из показателей качества лекарственных средств является содержание родственных примесей. Поэтому целью настоящего исследования является разработка и валидация методик определения родственных примесей T1 и T2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Разработку и валидацию методик проводили на опытных образцах додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфида (серия 2020-11-28) и бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензил)пропил]сульфида (серия В-501), предоставленных «Новосибирским институтом антиоксидантов».

Реактивы. В ходе работы использовались ацетонитрил для ВЭЖХ (Sigma-Aldrich, США), for HPLC >99,9 %; спирт этиловый ГОСТ Р 51652-200.

Оборудование. Определение примесей проводили на ВЭЖХ Agilent 1220 Infinity LC с УФ-детектором.

Испытуемый раствор и раствор сравнения T1. Испытуемый раствор: Около 0,500 г (точная навеска) T1 растворяют в 20 мл этанола и доводят объём этим же растворителем до 100,0 мл (5 мг/мл). Раствор сравнения: 1,0 мл испытуемого раствора доводят этанолом до 10,0 мл. 1,0 мл полученного раствора доводят тем же растворителем до 100,0 мл (5 мкг/мл).

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы (T1): 0,050 г гидрохинона помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 1 мл испытуемого раствора и 100 мл этанола, доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Испытуемый раствор и растворы сравнения А, В T2. Испытуемый раствор: Около 0,500 г (точная навеска) T2 растворяют в 5мл ацетонитрила и доводят объём тем же растворителем до 25,0 мл. К 400,0 мкл полученного раствора прибавляют 600,0 мкл ацетонитрила (8 мг/мл). Раствор сравнения А: 1,0 мл испытуемого раствора доводят ацетонитрилом до 10,0 мл. 1,0 мл полученного раствора доводят тем же растворителем до 100,0 мл (8 мкг/мл). Раствор сравнения В: 50 мг первичного стандартного образца бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензил)пропил]дисульфида (далее по тексту – ПТ2) растворяют в 5 мл ацетонитрила и доводят объём тем же растворителем до 25,0 мл. К 100,0 мкл полученного раствора прибавляют 900,0 мкл ацетонитрила (0,2 мг/мл).

Условия хроматографирования объектов исследования методом ВЭЖХ представлены в таблице 1.

Таблица 1. Условия определения примесей T1 и T2 методом ВЭЖХ

Table 1. HPLC Conditions for determination of relative substances in T1 and T2

Параметр Parameter	Значение Value	
	T1	T2
Подвижная фаза Mobile phase	Ацетонитрил:вода 95:5 Acetonitrile:water 95:5	Ацетонитрил Acetonitrile
Колонка Column	ZORBAX SB-C18 (5 µm, 150 × 4,6 mm)	ZORBAX SB-C18 (5 µm, 150 × 4,6 mm)
Температура колонки Column temperature	40 °C	40 °C
Скорость потока Flow rate	2 мл/мин 2 ml/min	2 мл/мин 2 ml/min
Детектор Detector	УФ, 278 нм UV, 278 nm	УФ, 278 нм UV, 278 nm
Объем пробы Probe	10 мкл 10 µl	5 мкл 5 µl

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методик. Условия ВЭЖХ определения примесей в объектах исследования была подобрана в процессе разработки технологии получения T1 и T2 для контроля чистоты получаемых опытных образцов. Для детектирования выбран максимум УФ-поглощения испытуемых соединений (278 нм), являющийся также максимумом или близким к нему значением для некоторых исходных веществ и побочных продуктов синтеза. Поскольку технологическая схема получения T2 не позволяет сократить содержание основного побочного продукта – бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензил)пропил]дисульфида (далее по тексту – T2-ДС) значительно ниже 2 %, были проведены исследования его безопасности и токсичности. В результате установления безопасности указанной примеси определен верхний предел ее содержания в T2 – не более 2,5 %. Остальные примеси T1 и T2, выявляемые при хроматографировании объектов исследования, составляют не более 0,1 % и определяются согласно методикам как неидентифицированные (допустимый предел содержания неидентифицированных примесей в соответствии с ОФС.1.1.0006.15 «Фармацевтические субстанции» – не более 0,1 %, порог игнорирования – 0,05 %).

Валидация ВЭЖХ-методик определения примесей T1 и T2. Валидацию методик проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» (Государственная Фармакопея Российской Федерации XIVизд.). Методики валидированы по параметрам «специфичность», «линейность», «предел количественного определения», «прецизионность», «правильность», «аналитическая область» [10–14] относительной правильности и прецизионности методик «Родственные примеси» (Relates substances).

«Специфичность» методики определяли по отсутствию пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания объектов исследова-

ния и основных примесей на хроматограммах растворителей, а также по величине разрешения ($R_s \geq 2$) между пиками на хроматограммах испытуемых растворов.

По результатам испытания на бланк-хроматограммах отсутствуют пики, соответствующие временам удерживания T1 и T2 и их основных примесей (рисунки 2, 3). Разрешение между пиками на хроматограмме T1 составило $R_{s1} = 6,35$ и $R_{s2} = 10,17$, а разрешение между пиками на хроматограмме T2 составило $R_{s1} = 2,74$ и $R_{s2} = 4,20$, что соответствует указанному критерию приемлемости.

Хроматографическая система для T1 считается пригодной при выполнении следующих условий при хроматографировании раствора для проверки пригодности хроматографической системы: величина разрешения (R_s) между пиками гидрохинона и T1 ≥ 10 ; эффективность хроматографической колонки (N), рассчитанная по пику T1 не менее 5000 теоретических тарелок; фактор симметрии пика (A_s) T1 не менее 0,9 и не более 1,5; относительное стандартное отклонение (RSD%) площади пика T1 не более 2 %.

Хроматографическая система для T2 считается пригодной при выполнении следующих условий: величина разрешения (R_s) между пиками на хроматограмме ≥ 2 ; эффективность хроматографической колонки (N) не менее 1500 теоретических тарелок; фактор симметрии пика (A_s) не менее 0,8 и не более 1,5; относительное стандартное отклонение (RSD, %) площадей пиков не более 2 %. Результаты проверки пригодности хроматографических систем для T1 и T2 представлены в таблице 2.

«Линейность» методик оценивали по графику линейной зависимости (коэффициент корреляции $r \geq 0,980$) между концентрацией и площадью пиков

примесей на хроматограммах калибровочных растворов T1 и T2. Для проведения испытания были приготовлены серии калибровочных растворов с концентрацией примесей в диапазоне от порога обнаружения до 120–150 % от допустимого содержания.

Результаты валидации представлены на рисунок 4 и в таблица 2. Полученные данные удовлетворяют критерию приемлемости ($r \geq 0,980$), методики линейны в области измеряемых концентраций.

Пределы количественного определения неидентифицированных примесей, рассчитанные по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика (таблица 2) не превышают наименьших калибровочных концентраций (порог игнорирования). Фактическое отношение сигнал/шум (S/N) при хроматографировании растворов T1 и T2 в концентрациях, соответствующих 0,05 % от концентрации испытуемого раствора (порог игнорирования) составило 29,0752 и 34,829 соответственно, что соответствует критерию приемлемости ($S/N \geq 10$).

«Правильность» методик устанавливали по результатам изучения линейности. Принималось, что систематическая ошибка методики отсутствует, если свободный член (a) уравнения линейной зависимости статистически достоверно не отличается от нуля. Полученные данные удовлетворяют критерию приемлемости (таблица 2).

Прецизионность методик оценивали по параметрам «повторяемость» и «промежуточная прецизионность». Оценку повторяемости проводили на 6 образцах испытуемых растворов каждого из объектов исследования путем расчета относительного стандартного отклонения ($RSD \leq 5\%$) результатов опре-

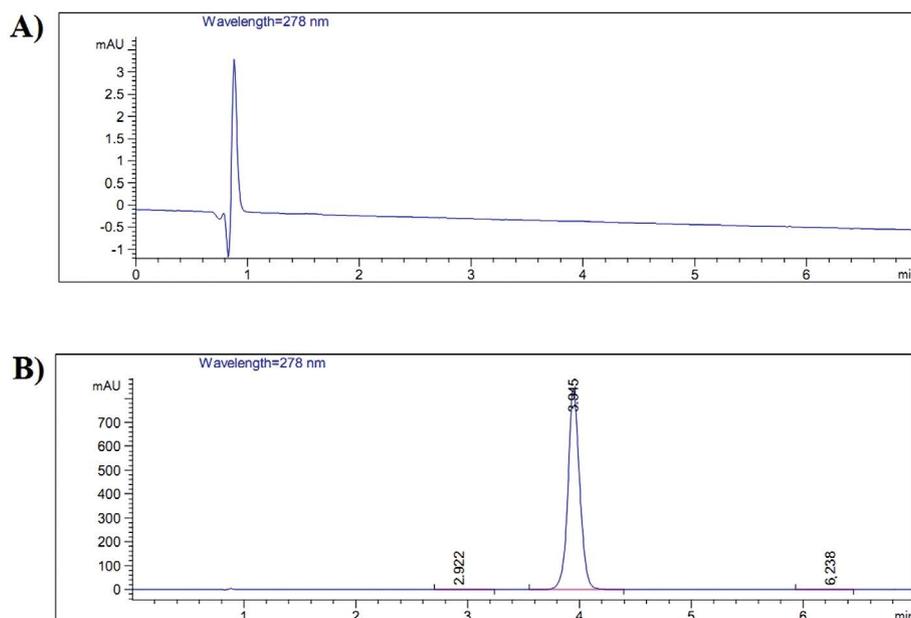


Рисунок 2. Хроматограммы растворителя (А) и испытуемого раствора (В) T1

Figure 2. Chromatograms of a solvent (A) and test solution (B) of T1

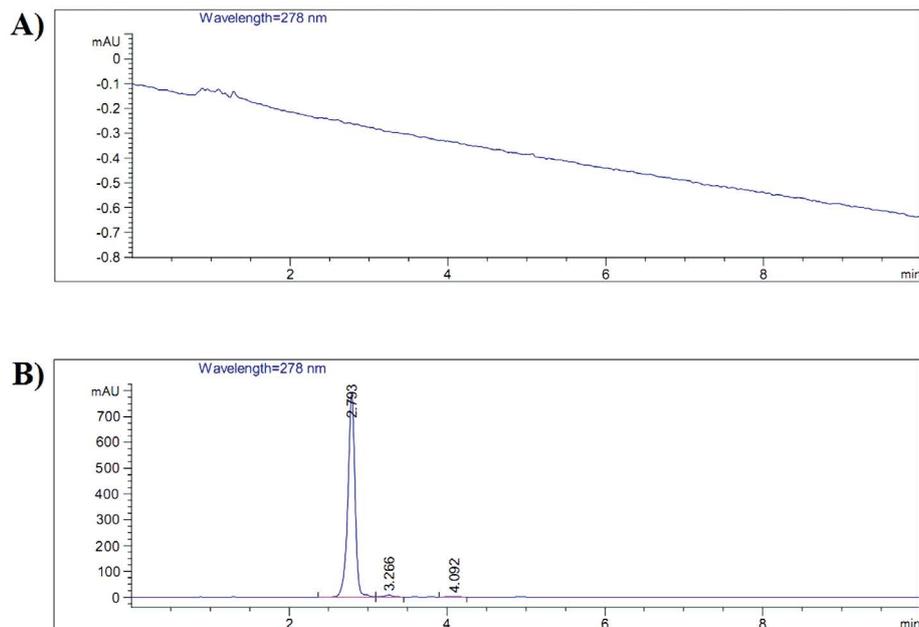


Рисунок 3. Хроматограммы растворителя (А) и испытуемого раствора (В) Т2

Figure 3. Chromatograms of a solvent (A) and test solution (B) of T2

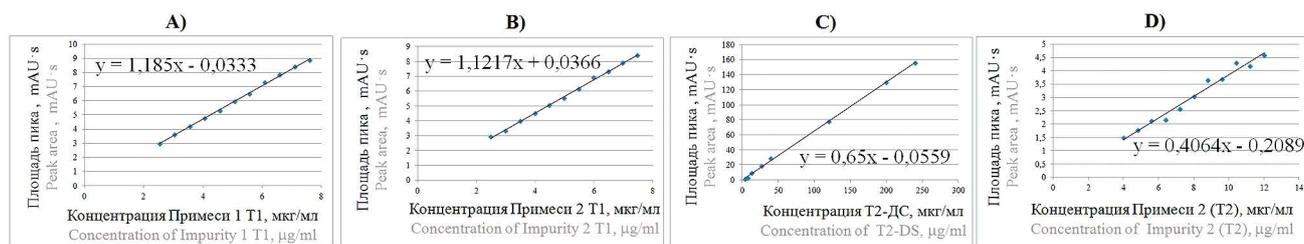


Рисунок 4. Графики и уравнения линейной зависимости площади пика на хроматограмме от концентрации:

А – Примеси 1 Т1; В – Примеси 2 Т1; С – Т2-ДС; D – Примеси 2 Т2

Figure 4. Linearity between peak area and concentration of:

А – Impurity 1 T1; В – Impurity 2 T1; С – T2-DS; D – Impurity 2 T2

деления примесей. Промежуточную прецизионность оценивали по критериям Фишера и Стьюдента, рассчитанным по значениям площадей пиков на хроматограммах, полученных в разные дни на одном оборудовании и одной серии опытных образцов Т1 и Т2. Результаты валидации (таблица 2) соответствуют критериям приемлемости.

Аналитическая область, согласно диапазону экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели, составляет 50–120 % от контролируемого предела для Примеси 1 Т1, Примеси 2 Т1 и Т2-ДС соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были разработаны и валидированы методики определения примесей в новых перспективных антиоксидантах додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфиде и бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-

гидроксифенил)пропил]сульфиде. Методики могут быть включены в Проекты Нормативных документов на указанные вещества для проведения дальнейших исследований и регистрации додецил(3,5-диметил-4-гидроксибензил)сульфида и бис-[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфида в качестве лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

- Бахтина И. А., Антипова Е. В., Просенко А. Е., Стрельцова Г. П., Душкин М. И., Зенков Н. К., Меньшикова Е. Б., Рагино Ю. И. Влияние антиоксиданта «тиофан» на параметры антиокислительного стресса при ишемической болезни сердца. *Бюллетень СО РАМН*. 2000;(3–4):24–29.
- Фридлянд И. Ф., Просенко А. Е., Клепикова С. Ю., Кандалицева Н. В., Леплина О. Ю., Тихонова М. А., Останин А. А., Черных Е. Р. Влияние антиоксидантов на функциональную активность мононуклеарных клеток периферической крови больных вирусным гепатитом С. *Медицинская иммунология*. 2001;3(2):243.

Таблица 2. Результаты валидации методик определения примесей Т1 и Т2 методом ВЭЖХ

Table 2. Results of methods validation for the HPLC determination of relative substances in T1 and T2

Параметры валидации Validation parameters	Определение примесей Т1 Determination of relative substances in T1		Определения примесей Т2 Determination of relative substances in T2	
Специфичность Specificity	На хроматограмме растворителя отсутствуют пики со временами удерживания Т1 и его основных примесей; $R_{S1} = 6,35$ и $R_{S2} = 10,17$ Chromatogram of solvent has no peaks at retention time of T1 and its impurities; $R_{S1} = 6,35$ и $R_{S2} = 10,17$		На хроматограмме растворителя отсутствуют пики со временами удерживания Т2 и его основных примесей; $R_{S1} = 2,74$ и $R_{S2} = 4,20$ Chromatogram of solvent has no peaks at retention time of T2 and its impurities; $R_{S1} = 2,74$ и $R_{S2} = 4,20$	
Проверка пригодности хроматографической системы System suitability	$R_s = 24,25$; $N = 5306$; $A_s = 1,077$; $RSD\% = 0,84\%$		$R_{S1} = 2,69$; $R_{S2} = 4,17$; $N_{T2} = 5465$; $N_{T2-DC} = 3854$; $N_{Imp2} = 1894$; $AS_{T2} = 1,27$; $AS_{T2-DC} = 1,12$; $AS_{Imp2} = 0,89$; $RSD\%_{T2} = 0,98\%$; $RSD\%_{T2-DC} = 1,06\%$; $RSD\%_{Imp2} = 1,62\%$ $R_{S1} = 2,69$; $R_{S2} = 4,17$; $N_{T2} = 5465$; $N_{T2-D5} = 3854$; $N_{Imp.2} = 1894$; $AS_{T2} = 1,27$; $AS_{T2-D5} = 1,12$; $AS_{Imp.2} = 0,89$; $RSD\%_{T2} = 0,98\%$; $RSD\%_{T2-D5} = 1,06\%$; $RSD\%_{Imp.2} = 1,62\%$	
Линейность Linearity	$r = 0,9993$ (Примесь 1) $r = 0,9993$ (Impurity 1)		$r = 0,9997$ (Т2-ДС) $r = 0,9997$ (T2-DS)	
	$r = 0,9992$ (Примесь 2) $r = 0,9992$ (Impurity 2)		$r = 0,9885$ (Примесь 2) $r = 0,9885$ (Impurity 2)	
Прецизионность (повторяемость/промежуточная прецизионность) Precision (repeatability/intermediate precision)	$RSD = 0,98\%$ (Примесь 1) $RSD = 0,98\%$ (Impurity 1)	$F = 1,74$ $F(95\%, 5,5) = 5,05$ $t_{St} = 2,16$ $t_{St}(95\%, 10) = 2,23$	$RSD = 0,53\%$ (Т2-ДС) $RSD = 0,53\%$ (T2-DS)	$F = 2,13$ $F(95\%, 5,5) = 5,05$ $t_{St} = 0,51$ $t_{St}(95\%, 10) = 2,23$
	$RSD = 1,22\%$ (Примесь 2) $RSD = 1,22\%$ (Impurity 2)	$F = 3,87$ $F(95\%, 5,5) = 5,05$ $t_{St} = 0,49$ $t_{St}(95\%, 10) = 2,23$	$RSD = 1,29\%$ (Примесь 2) $RSD = 1,29\%$ (Impurity 2)	$F = 1,24$ $F(95\%, 5,5) = 5,05$ $t_{St} = 2,04$ $t_{St}(95\%, 10) = 2,23$
Правильность Accuracy	$t_a = 0,4396$ (Примесь 1) $t_{St}(95\%, 9) = 2,26$ $t_a = 0,4396$ (Impurity 1) $t_{St}(95\%, 9) = 2,26$		$t_a = 0,18$ (Т2ДС) $t_{St}(95\%, 6) = 2,45$ $t_a = 0,18$ (T2-DS) $t_{St}(95\%, 6) = 2,45$	
	$t_a = 0,4382$ (Примесь 2) $t_{St}(95\%, 9) = 2,26$ $t_a = 0,4382$ (Impurity 2) $t_{St}(95\%, 9) = 2,26$		$t_a = 1,21$ (Примесь 2) $t_{St}(95\%, 9) = 2,26$ $t_a = 1,21$ (Impurity 2) $t_{St}(95\%, 9) = 2,26$	
Предел количественного определения Limit of quantification	0,65 мкг/мл (Примесь 1) 0,65 mg/ml (Impurity 1)		12,89 мкг/мл (Т2-ДС) 12,89 mg/ml (T2-DS)	
	0,68 мкг/мл (Примесь 2) 0,68 mg/ml (Impurity 2)		3,89 мкг/мл (Примесь 2) 3,89 mg/ml (Impurity 2)	

- Плотников М. Б., Просенко А. Е., Смольякова В. И., Иванов И. С., Чернышева Г. А., Кандалицева Н. В. Синтез и антиокислительная активность 3,5-диметил-4-гидроксibenзилтиододекана. *Химико-фармацевтический журнал*. 2010;44(3):65–67.
- Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Кандалицева Н. В. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing; 2012. 488 с.
- Боровская Т. Г., Гольдберг Е. Д., Щемерова Ю. А., Пахомова А. В., Перова А. В., Просенко А. Е., Дюбченко О. И. Средство для коррекции нарушений женской репродуктивной функции, вызванных цитостатическим воздействием. Патент РФ на изобретение № 2367420 С1. 20.09.2009. Доступно по: <https://new.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=a0a3f5f82b5424e5337046838c394e0a>. Ссылка активна на 04.10.2021.
- Просенко А. Е., Гросс М. А., Кандалицева Н. В., Толстикова Т. Г., Сорокина И. В. Средство для коррекции цитотоксических эффектов паранеопластических процессов и химиотерапии, обладающее противоопухолевой активностью. Патент РФ на изобретение № 2447888 С1. 20.04.2012. Доступно по: <https://new.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=c9dbcb6a5ec333ebf1998a2e91bdc6654>. Ссылка активна на 04.10.2021.
- Плотников М. Б., Смольякова В. И., Иванов И. С., Чернышева Г. А., Просенко А. Е., Гросс М. А., Бойко М. А. Средство, обладающее антиагрегантной, уменьшающей повышенную вязкость крови и антитромбогенной активностью. Патент РФ на изобретение № 2368376 С1. 27.09.2009. Доступно по: <https://new.fips.ru/iiss/document.xhtml?faces-redirect=true&id=2dd769e1785fe39dfd1f744dee2cfa8>. Ссылка активна на 04.10.2021.
- Воевода Т. В., Толстикова Т. Г., Сорокина И. В. Изучение токсического действия нового фенольного антиоксиданта СО-3 в субхроническом эксперименте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2000;63(4):57–60.
- Чернышева Г. А., Гурто Р. В., Хазанов В. А., Плотников М. Б., Смольякова В. И., Просенко А. Е., Кандалицева Н. В. Фармакокинетика тиофана при внутривенном введении. *Химико-фармацевтический журнал*. 2010;44(4):7–11.

- Okamoto M. Assay validation and technology transfer: Problems and solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;87:308–12. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.06.028.
- Sahu P. K., Ramiseti N. R., Cecchi T., Swain S., Patro C. S., Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;147:590–611. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.006.
- Epshtein N. A. Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice. *Drug development and registration*. 2019;8(2):122–30. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
- Эпштейн Н. А., Севастьянова В. Л., Королева А. И. Валидация методик «родственные примеси» для неидентифицированных примесей. *Химико-фармацевтический журнал*. 2020;54(9):48–56. DOI: 10.30906/0023-1134-2020-54-9-48-56.
- Raposo F., Ibelli-Bianco C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *Trends in Analytical Chemistry*. 2020;129:115913. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115913.
- Voevoda T. V., Tolstikova T. G., Sorokina I. V. Study of toxic effect of new phenolic antioxidant CO-3 in subchronic experiment. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2000;63(4):57–60. (In Russ.)
- Chernysheva G. A., Gurto R. V., Khazanov, V. A., Prosenko A. E., Kandalintseva N. V. Pharmacokinetics of thiophane upon intragastric administration. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2010;44(4):171–174. DOI: 10.1007/s11094-010-0424-7.
- Okamoto M. Assay validation and technology transfer: Problems and solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;87:308–12. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.06.028.
- Sahu P. K., Ramiseti N. R., Cecchi T., Swain S., Patro C. S., Panda J. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;147:590–611. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.05.006.
- Epshtein N. A. Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice. *Drug development and registration*. 2019;8(2):122–30. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
- Epshtein N. A., Sevast'yanova V. L., Koroleva A. I. Validation of Related-Substances Determination Methods for Detecting Unidentified Substances. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2020;54(9):959–967. DOI: 10.1007/s11094-020-02303-x.
- Raposo F., Ibelli-Bianco C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *Trends in Analytical Chemistry*. 2020;129:115913. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115913.

REFERENCES

- Bakhtina I. A., Antip'eva E. V., Prosenko A. E., Streltsova G. P., Dushkin M. I., Zenkov N. K., Men'shchikova E. B., Ragino Yu. I. Effect of the antioxidant «thiophan» on antioxidative stress parameters in ischaemic heart disease. *Byulleten' SO RAMN*. 2000;(3–4):24–29. (In Russ.)
- Fridlyand I. F., Prosenko A. E., Klepikova S. Yu., Kandalintseva N. V., Leplina O. Yu., Tikhonova M. A., Ostanin A. A., Chernykh E. R. Effect of antioxidants on the functional activity of peripheral blood mononuclear cells of patients with viral hepatitis C. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology*. 2001;3(2):243. (In Russ.)
- Plotnikov M. B., Prosenko A. E., Smol'yakova V. I., Ivanov I. S., Chernysheva G. A., Kandalintseva N. V. Synthesis and antioxidant activity of 3,5-dimethyl-4-hydroxybenzylthiododecane. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical chemistry journal*. 2010;44(3):65–67. (In Russ.)
- Men'shchikova E. B., Lankin V. Z., Kandalintseva N. V. *Fenol'nye antioksidanty v biologii i meditsine* [Phenolic antioxidants in biology and medicine]. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing; 2012. 488 p. (In Russ.)
- Borovskaja T. G., Gol'dberg E. D., Shchemerova Ju. A., Pakhomova A. V., Perova A. V., Prosenko A. E., Djubchenko O. I. *Sredstvo dlya korrektsii narusheniy zhenskoy reproduktivnoy funktsii, vyzvannykh tsitostaticheskim vozdeystviem* [Means for correcting disorders of female reproductive function caused by cytostatic effect]. Patent RUS № 2367420 C1. 20.09.2009. Available at: <https://new.fips.ru/iiss/document.xhtml?fases-redirect=true&id=a0a3f5f82b5424e5337046838c394e0a>. Accessed: 04.10.2021. (In Russ.)
- Prosenko A. E., Gross M. A., Kandalintseva N. V., Tolstikova T. G., Sorokina I. V. *Sredstvo dlya korrektsii tsitotoksicheskikh effektov paraneoplasticheskikh protsessov i khimioterapii, obladayushchee protivopukhholevoy aktivnost'yu* [Agent for correcting cytotoxic effects of paraneoplastic processes and chemotherapy showing anticancer activity]. Patent RUS № 2447888 C1. 20.04.2012. Available at: <https://new.fips.ru/iiss/document.xhtml?fases-redirect=true&id=c9dbc6a5ec333ebf1998a2e91bdc6654>. Accessed: 04.10. 2021. (In Russ.)
- Plotnikov M. B., Smol'yakova V. I., Ivanov I. S., Chernysheva G. A., Prosenko A. E., Gross M. A., Boyko M. A. *Sredstvo, obladayushchee antiagregantnoy, umen'shayushchey povyshennuyu vyazkost' krovi i antitrombogennoy aktivnost'yu* [Remedy having antiaggregant activity, activity decreasing blood hyperviscosity and antithrombogenic activity]. Patent RUS № 2368376 C1. 27.09.2009. Available at: <https://new.fips.ru/iiss/document.xhtml?fases-redirect=true&id=2dd769e1785fe39dfd1f744dee2cafa8>. Accessed: 04.10. 2021. (In Russ.)