

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573>
УДК 615.074



Оригинальная статья / Research article

Сквозная стандартизация оригинальных лекарственных средств при определении родственных примесей

Ю. Э. Генералова✉, И. И. Тернинко, А. Б. Зеленцова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

✉ Контактное лицо: Генералова Юлия Эдуардовна. E-mail: generalova.yuliya@pharminnotech.com

ORCID: Ю. Э. Генералова – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>;
А. Б. Зеленцова – <https://orcid.org/0009-0006-2750-098X>.

Статья поступила: 20.09.2023

Статья принята в печать: 09.11.2023

Статья опубликована: 24.11.2023

Резюме

Введение. Для таблеток «Малобен, 60 мг» и «Этмабен, 300 мг» получены разрешения на проведение I фазы клинических испытаний, поэтому для них требовался полный цикл фармацевтической разработки, который включал аналитические исследования и стандартизацию.

Цель. Разработка единой аналитической методики для определения родственных примесей в образцах (СО, АФС, ГЛС) малобена и этмабена.

Материалы и методы. СО получены на кафедре органической химии СПбХФУ, синтез АФС и производство ГЛС проводили в промышленных масштабах на фармацевтических производствах. Исследования были проведены на жидкостном хроматографе Flexar (PerkinElmer, США), снабженном насосом (формирование градиента на стороне низкого давления), автосемплером, термостатом колонок, УФ-детектором и хроматографической колонкой Intersil® ODS-3V, 5 мкм, 100 Å, 250 × 4,6 (Phenomenex, Япония).

Результаты и обсуждение. В ходе работы выбраны единые оптимальные хроматографические условия методом ВЭЖХ для определения РП в СО, АФС и ГЛС малобена и этмабена. Колонка C18, 250 × 4,6 мм, подвижная фаза 0,1%-я фосфорная кислота и ацетонитрил (градиентное элюирование), скорость потока 1 мл/мин, объем пробы 10 мкл, детектор УФ (270 нм). Проведена их валидация по показателям «специфичность», «линейность», «предел обнаружения», «прецизионность», «робастность», «стабильность растворов». Выбраны аналитические уровни концентраций для формирования проектов нормативных документов. С использованием разработанной аналитической методики проведен анализ образцов СО, АФС и таблеток малобена и этмабена, на основании чего установлены нормы содержания РП в них.

Заключение. Проведен полный цикл исследований, разработана аналитическая методика и определены РП в СО, АФС и ГЛС малобена и этмабена.

Ключевые слова: сквозная стандартизация, оригинальные ЛС, родственные примеси, ВЭЖХ, валидация

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

Вклад авторов. Ю. Э. Генералова – планирование эксперимента, постановка задачи, осуществление эксперимента, анализ полученных данных, написание текста статьи. И. И. Тернинко – обсуждение результатов, общее руководство проектом. А. Б. Зеленцовой – анализ полученных данных, обсуждение результатов.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Генералова Ю. Э., Тернинко И. И., Зеленцова А. Б. Сквозная стандартизация оригинальных лекарственных средств при определении родственных примесей. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(4):209–216. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573>

End-to-end Standardization of Original Medicines when Determining Related Impurities

Yulia E. Generalova✉, Inna I. Terninko, Anna B. Zelentsova

Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ Corresponding author: Yulia E. Generalova. E-mail: generalova.yuliya@pharminnotech.com

ORCID: Yulia E. Generalova – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>;
Anna B. Zelentsova – <https://orcid.org/0009-0006-2750-098X>.

Received: 20.09.2023

Revised: 09.11.2023

Published: 24.11.2023

Abstract

Introduction. For tablets “Maloben, 60 mg” and “Etmaben, 300 mg”, permission was received to conduct phase I clinical trials, so they required a full cycle of research and standardization.

Aim. Development of a unified analytical procedure for the determination of related impurities in samples (RS, API, FPP) of Maloben and Etmaben.

Materials and methods. RSs were obtained at the Department of Organic Chemistry of the St. Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University; the synthesis of APIs and the production of FPP were carried out on an industrial scale in pharmaceutical production. The studies were

© Генералова Ю. Э., Тернинко И. И., Зеленцова А. Б., 2023

© Generalova Yu. E., Terninko I. I., Zelentsova A. B., 2023

carried out on a Flexar liquid chromatograph (PerkinElmer, USA), equipped with a pump (formation of a gradient on the low-pressure side), an autosampler, a column thermostat, a UV detector and a chromatographic column Intersil® ODS-3V, 5 µm, 100 Å, 250 × 4, 6 (Phenomenex, Japan).

Results and discussion. In the research, uniform optimal chromatographic conditions were selected using the HPLC method to determine the RP in RS, API and FPP of Maloben and Ethmaben. Column C18 250×4.6 mm, mobile phase 0.1% phosphoric acid and acetonitrile (gradient elution), flow rate 1 ml/min, sample volume 10 µl, UV detector (270 nm). They were validated in terms of specificity, linearity, detection limit, precision, robustness, and solution stability. Analytical concentration levels were selected for the formation of draft regulatory documents. Using the developed analytical technique, samples of RS, API and tablets of maloben and ethmaben were analyzed.

Conclusion. A full cycle of research was carried out, an analytical methodology was developed and related impurities were identified in RS, API and FPP of Maloben and Ethmaben.

Keywords: end-to-end standardization, original drugs, related impurities, HPLC, validation

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. Yulia E. Generalova – planning the experiment, setting the problem, carrying out the experiment, analyzing the data obtained, writing the text of the article. Inna I. Terninko – discussion of results, general project management. Anna B. Zelentsova – analysis of the data obtained, discussion of the results.

Funding. The results of the work were obtained using equipment the Core Shared Research Facilities «Analytical Center» of the Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement No. 075-15-2021-685; dated 26 July 2021 on the provision of the Federal budget grants).

For citation: Generalova Yu. E., Terninko I. I., Zelentsova A. B. End-to-end standardization of original medicines when determining related impurities. *Drug development & registration*. 2023;12(4):209–216. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-4-1573>

ВВЕДЕНИЕ

Ключевым моментом при стандартизации лекарственных средств является определение родственных примесей (РП) и установление норм их содержания [1]. Данный показатель имеет важное значение для характеристики безопасности лекарственных средств, поэтому подходы к его определению остаются в фокусе фармацевтической разработки. Новое регуляторное требование, которое нашло отражение в Решении Коллегии ЕЭК от 4.10.2022 № 138 «Об утверждении Требований к проведению исследований (испытаний) лекарственных средств в части оценки и контроля содержания примесей»¹, реализует алгоритм действий (в том числе путем процессного подхода «дерева решений») при составлении нормативных документов на новые и воспроизведенные лекарственные средства при определении примесей.

Особую сложность представляют оригинальные молекулы – потенциальные лекарственные кандидаты – ввиду отсутствия подходов к их анализу в научной литературе: профиль примесей неизвестен, пути деградации не установлены, стабильность (в том числе и фото-) молекулы неизвестна. Все это создает предпосылки для комплексных аналитических исследований.

Первым этапом работ при стандартизации новых ЛС является выбор хроматографических условий, позволяющих разделять родственные примеси и основной компонент, проводят профилирование при-

месей при воздействии на АФС стресс-условий [2]. При этом важно понимать, образование каких продуктов деградации молекулы является вероятным, и минимизировать возможность «потери» примесей на хроматограмме (созлоирование пиков, элюирование пика с «мертвым» временем или длительное удержание вещества на колонке и выход ее после окончания записи хроматограммы). Затем проводят установление структур образовавшихся примесей либо с использованием ВЭЖХ-систем с масс-спектрометрами высокого разрешения [3–6], либо выделением примесей и характеристикой их спектральными методами [7]. Второй подход более предпочтителен, так как, помимо установления структуры, важно доказать безопасность примесей, для чего проводят исследования токсичности.

Ранее в СПХФУ были разработаны оригинальные активные фармацевтические субстанции 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоат натрия (малобен) и 4-(3-оксо-3-этоксипропаноил)аминобензойная кислота (этмабен) для производства на их основе таблеток «Малобен, 60 мг» и «Этмабен, 300 мг», для которых получены разрешения на проведение I фазы клинических испытаний № 717 от 23.12.2022 и № 733 от 28.12.2022 соответственно. Поэтому для новых ЛП требовался полный цикл фармацевтической разработки, включающий разработку аналитических методик, их валидацию, а также установление профиля примесей и их характеристику. Оба препарата являются потенциальными оригинальными лекарственными средствами, имеют запатентованные схемы синтеза [8, 9], отработанные технологии получения ГЛС и положительные результаты доклинических исследований. Для проведения клинических исследований необходимо стандартизовать полученные продукты.

¹ Решение Коллегии ЕЭК от 04.10.2022 № 138 «Об утверждении Требований к проведению исследований (испытаний) лекарственных средств в части оценки и контроля содержания примесей». Доступно по: <https://www.alta.ru/tamdoc/22kr0138/> Ссылка активна на 26.09.2023.

Современный аналитический подход направлен на оптимизацию стандартизации, в том числе за счет применения принципа сквозной стандартизации, который подразумевает применение единых методов и условий (аналитических процедур) для контроля ряда ключевых параметров (подлинность, родственные примеси, количественное определение и др.)¹. Такое решение направлено на существенную экономию ресурсов – временных, материальных – и способствует унификации стандартизации в рамках одной молекулы. Учитывая, что оригинальные ЛС этмабен и малобен имеют схожую структуру, правильным аналитическим решением является разработка единых условий для определения родственных примесей.

Таким образом, **целью данного исследования** является разработка единой аналитической методики для определения родственных примесей в активных фармацевтических субстанциях (АФС), стандартных образцах (СО) и готовых лекарственных средствах (ГЛС) – таблетках малобена и этмабена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами анализа являются малобен и этмабен – производные *п*-аминобензойной кислоты (ПАБК) и малонового эфира (рисунок 1) в виде АФС, СО и ГЛС (таблеток).

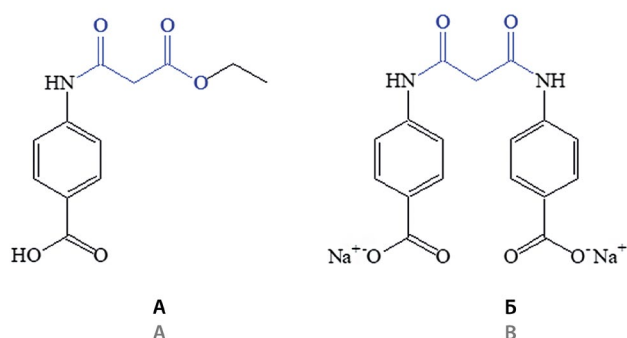


Рисунок 1. Структурные формулы этмабена (а) и малобена (б)

Figure 1. Structural formulas of ethmaben (a) and maloben (b)

СО малобена и этмабена получены на кафедре органической химии СПХФУ, синтез АФС и производство ГЛС (таблетки «Малобен, 60 мг» и таблетки «Этмабен, 300 мг») проводили в промышленных масштабах на фармацевтических производствах.

¹ ICH Topic Q 6 A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical_en.pdf. Accessed: 26.09.2023.

Используемое оборудование и расходные материалы:

- хроматограф жидкостной Flexar (PerkinElmer, США), снабженный насосом (формирование градиента на стороне низкого давления), автосемплером, термостатом колонок, УФ-детектором и хроматографической колонкой Intersil® ODS-3V, 5 мкм, 100 Å, 250 × 4,6 (Phenomenex, Япония);
- хроматограф жидкостной Prominence LC-20 (Shimadzu Corporation, Япония), снабженный четырьмя насосами (формирование градиента на стороне высокого давления), термостатом колонок, ДМ-детектором и хроматографической колонкой Luna C18, 5 мкм, 100 Å, 250 × 4,6 (Phenomenex, Япония);
- аналитические весы «Сартогосм» CE224-С (ООО «Сартогосм», Россия);
- мембранный нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (PerkinElmer, США).

Стандартные образцы и реактивы:

- 4-аминобензойная кислота, реактив чистотой более 99 %;
- примеси В и С, образцы чистотой более 99 %, получены ФГБОУ ВО СПХФУ;
- ацетонитрил для хроматографии или аналогичного качества;
- вода деионизованная свежеполученная;
- кислота орто-фосфорная, х. ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Малобен и этмабен – близкородственные структуры и имеют одинаковые исходные вещества, в связи с чем можно предположить схожие родственные примеси, содержащиеся в их образцах. ПАБК – исходное вещество в синтезе, и контроль ее содержания обязателен в обоих объектах анализа. Ранее были установлены другие структуры РП малобена [10], одна из которых (4-(3-карбоксит-3-оксипропионамидо) бензойная кислота) позднее синтезирована. Кроме того, предположили возможность образования еще двух побочных продуктов реакции – N-ацетил-4-аминобензойной кислоты (N-ацетил-ПАБК) и этилового эфира 4-аминобензойной кислоты (бензокаин), но последний не был обнаружен в образцах. Характеристики использованных РП приведены в таблице 1.

Используя все доступные образцы РП, выбрали оптимальные хроматографические условия (таблица 2), позволяющие их эффективно разделить.

Наложение хроматограмм растворов индивидуальных образцов примесей (концентрация каждой из них 10 мкг/мл), полученных в выбранных условиях, представлено на рисунке 2.

Выбранные хроматографические условия позволяют эффективно разделять аналиты, что подтверждают хроматографические параметры пиков: асимметрия всех пиков составляет 1,1–1,2; эффективность – более 2×10^4 теоретических тарелок; разрешение – более 5,0.

Таблица 1. Характеристики родственных примесей
Table 1. Characteristics of related impurities

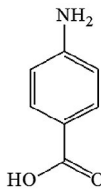
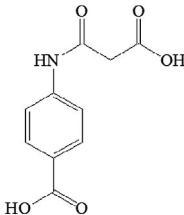
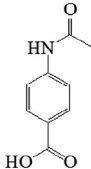
Название Name	Структурная формула Structural formula	Условное название Code name	$\lambda_{\max}$ нм $\lambda_{\max}$ nm
4-аминобензойная кислота (ПАБК) 4-aminobenzoic acid		Примесь А Impurity A	268
4-[(карбоксиацетил)-амино]бензойная кислота 4-[(carboxyacetyl)-amino]benzoic acid		Примесь В Impurity B	266
N-ацетил-4-аминобензойная кислота N-acetyl-4-aminobenzoic acid		Примесь С Impurity C	268
Этмабен Ethmaben	Рисунок 1, А Figure 1, A	Примесь D в малобене Impurity D in malobene	262
Малобен Maloben	Рисунок 1, Б Figure 1, B	Примесь D в этмабене Impurity D in ethmaben	268

Таблица 2. Оптимальные хроматографические условия
для определения родственных примесей
в образцах малобена и этмабена

Table 2. Optimal chromatographic conditions
for the determination of related impurities in Maloben
and Ethmaben samples

Колонка Column	250 × 4,6 мм, 5 мкм; сорбент – силикагель с привитым C ₁₈ -груп- пами 250 × 4.6 mm, 5 μm; sorbent – silica gel grafted with C18 groups		
Подвижная фаза Eluent	0,1%-й раствор H ₃ PO ₄ :ацетонитрил, гра- диентное элюирование, уравнивание 0.1% H ₃ PO ₄ solution: acetonitrile, gradient elution, column equilibration 10 min		
	Время Time	0,1 % p-p H ₃ PO ₄ 0.1 % H ₃ PO ₄ solution	CH ₃ CN
	0 мин 0 min	85 %	15 %
	20 мин 20 min	40 %	60 %
Скорость потока Flow rate	1 мл/мин 1 ml/min		
Температура колонки Temperature of column	40 °C		
Детектор Detector	УФ, 270 нм UV, 270 nm		
Объем пробы Volume injection	10 мкл 10 μl		

Для проведения испытаний по показателю «родственные примеси» рекомендации [11] допускают применение метода сравнения площадей пиков РП с разбавленным раствором испытуемого образца в предельно допустимой концентрации с учетом коэффициентов чувствительности (*k*) примесей по отношению к основному действующему веществу, чтобы избежать использования дорогостоящих и труднодоступных стандартных образцов примесей. Именно такой подход (предел содержания) был выбран для включения в проект нормативного документа, для которого в качестве валидационных критериев достаточно доказать специфичность и установить предел обнаружения. Нами был проведен цикл более показательных валидационных исследований, и процедура валидации выбранных хроматографических условий была проведена по показателям «специфичность», «предел обнаружения» и «предел количественного определения» (для выбора уровня аналитических концентраций), «линейность» (для расчета коэффициентов чувствительности), «прецизионность» (по показателю «сходимость» для установления критериев проверки пригодности хроматографической системы), «робастность» (для проверки воспроизводимости хроматографических условий на аналогичном оборудовании), а также была определена стабильность

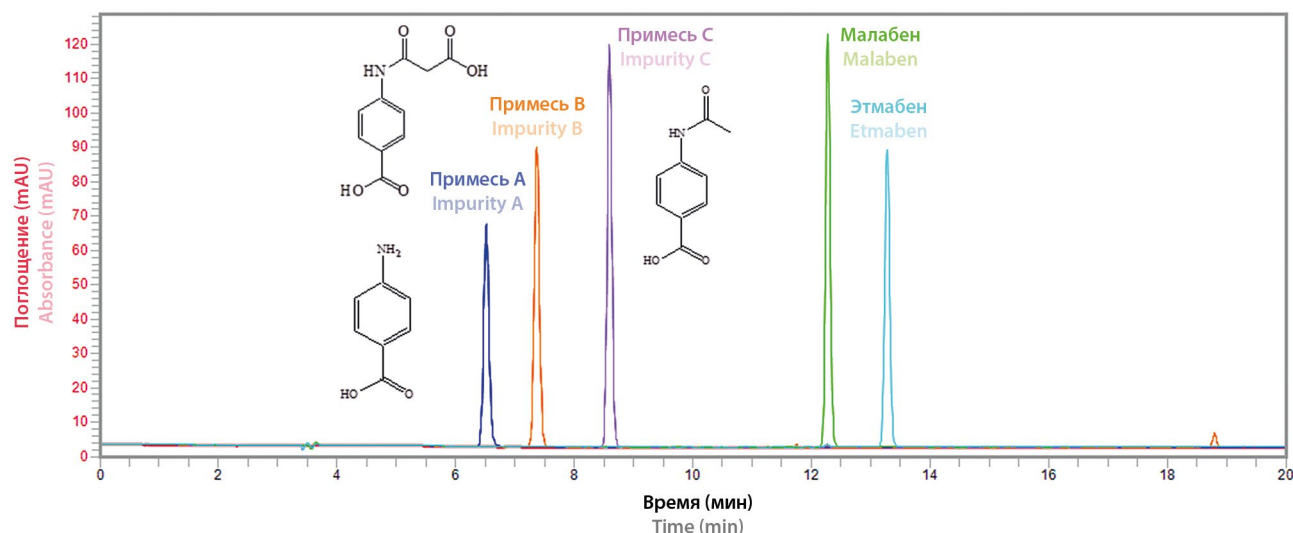


Рисунок 2. Наложение хроматограмм растворов индивидуальных образцов примесей (растворитель – красная; примесь А – синяя; В – оранжевая; С – фиолетовая; малобен – зеленая; этмабен – голубая)

Figure 2. Overlay of chromatograms of solutions of individual impurity samples (solvent – red; impurity A – blue; B – orange; C – violet; Maloben – green; Etmaben – light blue)

анализируемых растворов и установлены их сроки годности.

Специфичность условий анализа продемонстрирована на рисунке 2, где показана возможность селективного и эффективного определения каждого компонента пробы. Для ГЛС проанализированы растворы плацебо, на хроматограммах которых отсутствовали пики. Также приготовлены и проанализированы модельные растворы (раствор плацебо с добавлением АФС), где наблюдали полное совпадение времен удерживания аналитов, что свидетельствует об отсутствии влияния вспомогательных веществ

в таблетках на хроматографический процесс и показывает специфичность валидируемых условий анализа. Хроматограмма испытуемого раствора образца малобена ($C = 0,2$ мг/мл), содержащего все известные примеси, приведена на рисунке 3.

Анализ испытуемого раствора показывает, что увеличение концентрации одного из компонентов пробы не мешает определению других компонентов. В данном случае пики малобена и примеси D (этмабен) являются критической парой и увеличение концентрации малобена в 20 раз по-прежнему позволяет селективно определить пик примеси D.

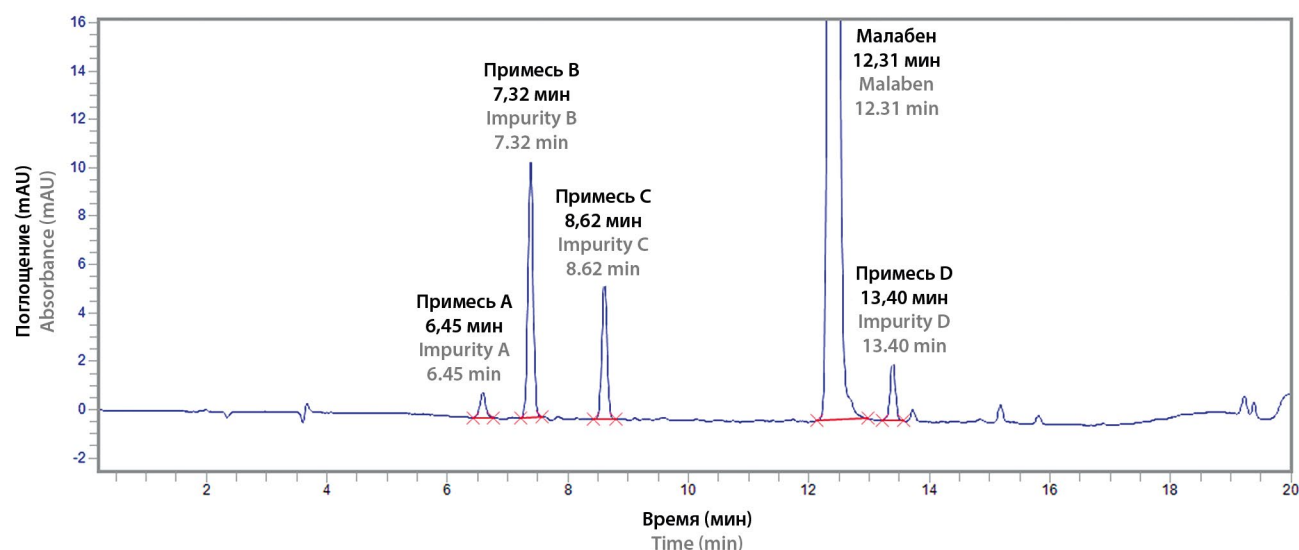


Рисунок 3. Хроматограмма испытуемого раствора малобена

Figure 3. Chromatogram of the test solution of Maloben

Таблица 3. Установление пределов обнаружения и количественного определения ($n = 3$)

Table 3. Establishment of detection and quantitation limits ($n = 3$)

Компонент Component	S/N			
	0,005 мкг/мл 0.005 µg/ml	0,01 мкг/мл 0.01 µg/ml	0,03 мкг/мл 0.03 µg/ml	0,06 мкг/мл 0.06 µg/ml
Примесь А Impurity A	Пики не обнаружены No peaks found	4,5–6,9	10,3–10,8	> 20
Примесь В Impurity B		5,4–7,3	10,3–12,5	> 20
Примесь С Impurity C		6,0–8,6	12,4–18,6	> 20
Малобен Maloben		6,7–9,3	11,5–19,1	> 20
Этмабен Ethmaben		7,4–8,6	12,5–18,2	> 20

ПО и ПКО установлены путем последовательного разбавления смеси растворов РП, малобена и этмабена и оценки соотношения сигнал/шум; результаты определения приведены в таблице 3.

Таким образом, ПО для всех аналитов установлен на уровне 0,01 мкг/мл, ПКО – 0,03 мкг/мл. Относительно представленных результатов построены градуировочные зависимости в диапазоне концентраций 0,03–2,0 мкг/мл, что соответствует уровням от ПКО до 200 % нормируемого содержания РП. По уравнениям линейной регрессии рассчитаны коэффициенты чувствительности (k) примесей к основным компонентам проб как отношение тангенсов угла наклона прямых. Так как полученные уравнения линейной регрессии не предполагалось использовать для количественной оценки содержания РП, то полной статической обработки полученных результатов [12] не проводили. Результаты статистической обработки полученных данных представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты статистической обработки данных при построении градуировочных зависимостей (5 точек, $n = 3$)

Table 4. Results of statistical data processing when constructing calibration dependencies (5 points, $n = 3$)

Компонент Component	Наклон Slope	Отрезок Intercept	r	k к малобену k at maloben	k к этмабену k at ethmaben
Примесь А Impurity A	43973	1001	1,000	1,46	1,18
Примесь В Impurity B	55036	237	1,000	1,17	0,94
Примесь С Impurity C	67530	308	1,000	0,95	0,77
Малобен Maloben	64360	1055	1,000	–	0,81
Этмабен Ethmaben	51871	1164	1,000	1,24	–

Полученные данные показывают наличие линейных зависимостей в выбранном диапазоне концентраций с высокими значениями коэффициентов

корреляции (r), что позволяет использовать их для расчета коэффициентов чувствительности, которые будут включены в проект НД.

Оценку прецизионности (сходимости) проводили во всем диапазоне линейности, для этого рассчитывали значение RSD для времен удерживания и площадей пиков на каждом уровне концентрации. RSD времен удерживания для всех растворов не превышало 1,0 %, а величины RSD площадей пиков представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты статистической обработки данных при оценке сходимости полученных результатов ($n = 3$)

Table 5. Results of statistical data processing when assessing the precision of the results obtained ($n = 3$)

Компонент Component	RSD (S), %				
	0,03 мкг/мл 0.03 µg/ml	0,5 мкг/мл 0.5 µg/ml	1,0 мкг/мл 1.0 µg/ml	1,5 мкг/мл 1.5 µg/ml	2,0 мкг/мл 2.0 µg/ml
Примесь А Impurity A	7,3	0,31	1,2	0,51	0,51
Примесь В Impurity B	4,2	0,45	0,59	0,37	0,20
Примесь С Impurity C	6,6	1,0	1,0	1,2	0,26
Малобен Maloben	2,2	0,80	0,20	0,18	0,21
Этмабен Ethmaben	3,9	1,0	0,33	0,40	0,64

RSD площадей пиков на всех уровнях концентраций, кроме уровня ПКО, не превышает 1,5 %.

Все проведенные и представленные выше эксперименты позволяют выбрать и установить уровни концентраций для включения их в проект нормативного документа: концентрация испытуемого раствора – 0,2 мг/мл, раствора сравнения (при норме содержания примесей 0,5 %) – 1 мкг/мл, раствора для проверки чувствительности (при норме контролируемого предела 0,05 %) – 0,1 мкг/мл.

Для проверки устойчивости хроматографических условий эксперимент был проведен на аналогичном оборудовании и колонке (Shimadzu, Prominence LC-20). Критическими параметрами при оценке пригодности системы были отношение сигнал/шум для раствора проверки чувствительности хроматографической системы из-за смены детектора, коэффициент разрешения между пиками основного вещества и примеси D из-за смены типа насоса и замены колонки, сходимость полученных результатов для раствора сравнения из-за изменения типа ввода пробы. Полученные результаты представлены в таблице 6. Так как эксперименты на PerkinElmer проведены много раз, то в таблице 6 приведены самые грубые результаты.

Таблица 6. Результаты проверки устойчивости (робастности) хроматографических условий

Table 6. Results of testing the stability (robustness) of chromatographic conditions

Оборудование (колонка) Equipment (column)	S/N	Rs	RSD (t_R), %	RSD (S), %
PerkinElmer (InterSil)	>40	>6,6	<0,15	<0,98
Shimadzu (Luna)	45	6,1	0,50	1,25
Норма Norm	>10	>3,0	<1,0	<5,0

Полученные данные на исходном и альтернативном оборудовании демонстрируют выполнение критериев пригодности хроматографической системы, что свидетельствует об устойчивости разработанной методики.

Для изучения стабильности указанных растворов они были приготовлены в требуемых концентрациях (согласно проекту НД), проанализированы сразу после приготовления, через 1, 2, 3, 7 дней (растворы хранили при комнатной температуре) и оценено изменение площадей всех обнаруженных на хроматограммах пиков. Результаты эксперимента показывают, что в течение 3 дней изменение площадей не превышает 5 %, на 7-й день изменения превысили указанную величину, следовательно, при комнатной температуре растворы пригодны для анализа в течение 3 дней.

Таким образом, в ходе работы выбраны единые оптимальные хроматографические условия для определения РП в СО, АФС и ГЛС малобена и этмабена, проведена их валидация, выбраны аналитические уровни концентраций для формирования проектов нормативных документов. С использованием разработанной аналитической методики проведен анализ образцов СО, АФС и таблеток малобена и этмабена на содержание РП, результаты определения представлены в таблице 7 (результаты определения РП в ГЛС полностью идентичны результатам для АФС). Содержание примесей рассчитано с учетом коэффициентов чувствительности к основному пику и с помощью калибровочных прямых.

Таблица 7. Результаты определения родственных примесей в СО и АФС малобена и этмабена ($n = 3$, $u_{co} = 1,5$ %)

Table 7. Results of determination of related impurities in CO and API of Maloben and Ethmaben ($n = 3$, $u_{co} = 1.5$ %)

Образец Sample	Способ расчета Method of calculation	W (ПП), % W (related impurities), %			
		A	B	C	D
СО малобена RS maloben	Коэффициенты Odds	0,052	0,019	–	0,018
	Калибровка Calibration	0,043	0,018	–	0,009
АФС малобена API maloben	Коэффициенты Odds	–	0,20	–	–
	Калибровка Calibration	–	0,18	–	–
СО этмабена RS Ethmaben	Коэффициенты Odds	–	–	0,10	0,50
	Калибровка Calibration	–	–	0,10	0,48
АФС этмабена API Ethmaben	Коэффициенты Odds	–	0,093	0,069	0,82
	Калибровка Calibration	–	0,090	0,067	0,81

Примечание. *Прочерки в ячейках показывают, что примесь в образце не обнаружена или ее содержание ниже контролируемого предела (0,05 %).

Note. *Dashes in the cells indicate that the impurity was not detected in the sample or its content is below the controlled limit (0.05 %).

В целом результаты расчета двумя способами согласуются между собой, но содержание примеси D для СО малобена значительно отличается. Такую разницу можно объяснить низким содержанием примеси (менее 0,05 %), на которое не рассчитан аналитический диапазон разработанной методики. Таким образом, косвенно доказана правильность получаемых результатов при использовании коэффициентов чувствительности. Следует отметить, что применение прямого определения РП по калибровочным прямым позволяет оценить только известные примеси, тогда как применение метода сравнения позволяет косвенно оценить содержание и неидентифицированных примесей, если допустить, что $k = 1$. На основании полученных данных можно установить нормы содержания РП в образцах. Для всех образцов малобена: единичная примесь – не более 0,5 %, единичная неидентифицированная примесь – не более 0,1 %, сумма примесей – не более 1,0 %. Для всех образцов этмабена: примеси A, B, C – не более 0,5 %, примесь D – не более 1,0 %, единичная неидентифицированная примесь – не более 0,1 %, сумма примесей – не более 1,0 %. Тот факт, что структуры примесей установлены и результаты доклинических исследований свидетельствуют об их безопасности, допустимо установить более мягкие критерии их содержания, тем самым снизить расходы на очистку АФС и СО. Норма содержания примеси D в образцах этмабена на уровне 1,0 % возможна благодаря расширенному диапазону линейности (от ПКО до 200 % при нормируемом содержании примесей 0,5 %).

Представленные хроматографические условия могут быть использованы для количественного определения действующих веществ в таблетках после небольших вариаций – изменения способа элюирования на изократическое и увеличения доли ацетонитрила в элюенте до 50–60 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведен полный цикл исследований для определения РП в СО, АФС и ГЛС малобена и этмабена с соблюдением принципа сквозной стандартизации, а именно:

- установлены структуры и получены образцы возможных РП;
- разработаны хроматографические условия, позволяющие определять РП во всех объектах анализа;
- проведена валидация хроматографических условий, в ходе которой установлены коэффициенты чувствительности РП по отношению к основному веществу;
- установлены нормы содержания РП и составлены проекты НД;
- проведен анализ реальных образцов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Graham J. C., Powley M. W., Udovic E., Glowienke S., Nicolette J., Parris P., Kenyon M., White A., Maisey A., Harvey J., Martin E. A., Dowdy E., Masuda-Herrera M., Trejo-Martin A., Bercu J. Calculating qualified non-mutagenic impurity levels: Harmonization of approaches. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021;126:105023. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.105023.
2. Vanavi P. J., Rajput S. J. Impurity profiling of first line anti-tb drug-terizidone using chromatographic and related techniques. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2021;13(5):83–95. DOI: 10.22159/ijpps.2021v13i5.40918.
3. Swaina D., Singh Yadava A., Sasapua C., Akulab V., Samanthula G. Debasish Swaina. UPLC Separation of forced degradation and process related impurities of Velpatasvir and structure elucidation by online LC-Quadrupole-Time of Flight-Tandem mass Spectrometry. *Microchemical Journal*. 2020;155:104657. DOI: 10.1016/j.microc.2020.104657.
4. Rajana N., Devi D. R., Kumar Reddy D. N., Babu J. M., Basavaiah K., Balakumaran K. Characterization of five oxidative degradation impurities and one process impurity of suvorexant drug substance by LC-MS/MS, HR-MS and 1D, 2D NMR: validation of suvorexant drug substance and process impurities by HPLC and UPLC. *Journal of Chromatographic Science*. 2020;58(5):433–444. DOI: 10.1093/chromsci/bmaa003
5. Wu P., Ye S., Li M., Li H., Kan Y., Yang Z. Impurity identification and quantification for arginine vasopressin by liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2020;34:e8799. DOI: 10.1002/rcm.8799.
6. Gabriele J. W. M., Livia B. P., Camila M. B., Julia F. A. G. Determination of empagliflozin in the presence of its organic impurities and identification of two degradation products using UHPLC-QTOF/MS. *Microchemical Journal*. 2021;161:105795.
7. Huang Y., Lu H., Zhang F., Min C. Identification, isolation, characterization, and UHPLC quantification of potential genotoxic impurities in linagliptin. *Journal of Separation Science*. 2018;41(21):3985–3994.
8. Юсковец В. Н., Чернов Н. М., Яковлев И. П., Наркевич И. А. Способ получения 4,4'-(пропандиамидо)дibenзоата натрия. Патент РФ на изобретение № 2624729 С1 от 21.06.2016.
9. Юсковец В. Н., Яковлев И. П., Наркевич И. А. Способ получения 4-[(3-этокси-3-оксoproпаноил)амино]бензойной кислоты. Патент России № 2515245 С1 от 07.02.2013.
10. Generalova Yu., Sipkina N., Alekseeva G. Determination of related impurities in a new active pharmaceutical ingredient – Sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate. *Microchemical Journal*. 2021;168:106498. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106498.
11. Миронов А. Н., Бондарев В. П. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. II. М.: Гриф и К.; 2019. 280 с.
12. Эпштейн Н. А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):122–130.

REFERENCES

1. Graham J. C., Powley M. W., Udovic E., Glowienke S., Nicolette J., Parris P., Kenyon M., White A., Maisey A., Harvey J., Martin E. A., Dowdy E., Masuda-Herrera M., Trejo-Martin A., Bercu J. Calculating qualified non-mutagenic impurity levels: Harmonization of approaches. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2021;126:105023. DOI: 10.1016/j.yrtph.2021.105023.
2. Vanavi P. J., Rajput S. J. Impurity profiling of first line anti-tb drug-terizidone using chromatographic and related techniques. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2021;13(5):83–95. DOI: 10.22159/ijpps.2021v13i5.40918.
3. Swaina D., Singh Yadava A., Sasapua C., Akulab V., Samanthula G. Debasish Swaina. UPLC Separation of forced degradation and process related impurities of Velpatasvir and structure elucidation by online LC-Quadrupole-Time of Flight-Tandem mass Spectrometry. *Microchemical Journal*. 2020;155:104657. DOI: 10.1016/j.microc.2020.104657.
4. Rajana N., Devi D. R., Kumar Reddy D. N., Babu J. M., Basavaiah K., Balakumaran K. Characterization of five oxidative degradation impurities and one process impurity of suvorexant drug substance by LC-MS/MS, HR-MS and 1D, 2D NMR: validation of suvorexant drug substance and process impurities by HPLC and UPLC. *Journal of Chromatographic Science*. 2020;58(5):433–444. DOI: 10.1093/chromsci/bmaa003
5. Wu P., Ye S., Li M., Li H., Kan Y., Yang Z. Impurity identification and quantification for arginine vasopressin by liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2020;34:e8799. DOI: 10.1002/rcm.8799.
6. Gabriele J. W. M., Livia B. P., Camila M. B., Julia F. A. G. Determination of empagliflozin in the presence of its organic impurities and identification of two degradation products using UHPLC-QTOF/MS. *Microchemical Journal*. 2021;161:105795.
7. Huang Y., Lu H., Zhang F., Min C. Identification, isolation, characterization, and UHPLC quantification of potential genotoxic impurities in linagliptin. *Journal of Separation Science*. 2018;41(21):3985–3994.
8. Yuskovets V. N., Chernov N. M., Yakovlev I. P., Narkevich I. A. Method for producing sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate. Patent RUS № 2624729 C1 dated 21.06.2016. (In Russ.)
9. Yuskovets V. N., Yakovlev I. P., Narkevich I. A. Method for producing 4-[(3-ethoxy-3-oxopropanoyl)amino]benzoic acid. Patent RUS № 2515245 C1 dated 02.07.2013. (In Russ.)
10. Generalova Yu., Sipkina N., Alekseeva G. Determination of related impurities in a new active pharmaceutical ingredient – Sodium 4,4'-(propanediamido)dibenzoate. *Microchemical Journal*. 2021;168:106498. DOI: 10.1016/j.microc.2021.106498.
11. Mironov A. N., Bondarev V. P. Guidelines for the examination of medicinal products. V. II. Moscow: Grif and K.; 2019. 280 p. (In Russ.)
12. Epshtein N. A. Validation of analytical procedures: graphic and calculated criteria for assessment of methods linearity in practice. *Drug development & registration*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.)