



Разработка и валидация аналитической методики количественного определения 2-[2-[(5RS)-5-(гидроксиметил)-3-метил-1,3-оксазолидин-2-илиден]-2-цианоэтилиден]-1H-индол-3(2H)-она в лекарственном препарате методом ВЭЖХ-ДМД

К. Д. Шинкин^{1,2} , С. В. Кривошеков² , А. А. Бондарев¹ , В. В. Быков^{1,2} ,
И. П. Каминский² , А. С. Князев³ , М. В. Белоусов²

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Инновационные Фармакологические Разработки» (ООО «Ифар»). 634021, Россия, г. Томск, ул. Елизаровых, д. 79/4

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России). 634050, Россия, г. Томск, Московский тракт, д. 2

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» (НИ ТГУ; ТГУ). 634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина, д. 36

✉ **Контактное лицо:** Шинкин Константин Дмитриевич. **E-mail:** shinkin.kostya@mail.ru

Резюме

Введение. Производное индолинона – 2-[2-[(5RS)-5-(гидроксиметил)-3-метил-1,3-оксазолидин-2-илиден]-2-цианоэтилиден]-1H-индол-3(2H)-он (далее – GRS) – новый стимулятор растворимой гуанилатциклазы, является действующим веществом в новом антитромботическом лекарственном препарате, капсулы, 20 мг. В фармацевтической разработке и промышленном выпуске лекарственных препаратов многоступенчатый контроль качества выступает детерминирующим фактором их эффективности и безопасности. В связи с этим разработка и валидация экспрессных и прецизионных аналитических методик является актуальной научно-практической задачей.

Цель. Разработка и валидация методики количественного определения действующего вещества (GRS) в лекарственном препарате, капсулы, 20 мг, с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали: лекарственный препарат на основе GRS, капсулы, 20 мг, используемые при его производстве вспомогательные вещества и АФС GRS, субстанция-порошок. Условия хроматографирования: хроматографическая колонка Kromasil C18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм; температура термостата – 40 °С; длина волны детекции – 372 нм; подвижная фаза А – ацетатный буфер с pH 4,0, подвижная фаза Б – метанол. Градиентный режим элюирования в течение 17 мин.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика валидирована по показателям «специфичность», «линейность в аналитическом диапазоне», «правильность», «прецизионность» и «робастность».

Заключение. Разработанная методика количественного определения действующего вещества GRS в лекарственном препарате, капсулы, 20 мг, методом ВЭЖХ обладает приемлемыми значениями валидационных характеристик, а также экспрессностью, простотой пробоподготовки, что позволяет использовать ее в рутинном анализе для контроля качества при производстве.

Ключевые слова: разработка аналитической методики, производное индолинона, GRS, валидация, ВЭЖХ, количественное определение

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

Вклад авторов. К. Д. Шинкин и С. В. Кривошеков занимались планированием исследования. Разработкой и валидацией аналитической методики занимался К. Д. Шинкин. Обработкой полученных результатов занимались К. Д. Шинкин, А. А. Бондарев, В. В. Быков и С. В. Кривошеков. В написании текста статьи участвовали К. Д. Шинкин, С. В. Кривошеков, И. П. Каминский, А. С. Князев, М. В. Белоусов. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

© Шинкин К. Д., Кривошеков С. В., Бондарев А. А., Быков В. В., Каминский И. П., Князев А. С., Белоусов М. В., 2026

© Издатель ООО «Центр Фармацевтической Аналитики», 2026

© Shinkin K. D., Krivoshchekov S. V., Bondarev A. A., Bykov V. V., Kaminsky I. P., Knyazev A. S., Belousov M. V., 2026

© Publisher LLC "Center of Pharmaceutical Analytics", 2026

Для цитирования: Шинкин К. Д., Кривошеков С. В., Бондарев А. А., Быков В. В., Каминский И. П., Князев А. С., Белоусов М. В. Разработка и валидация аналитической методики количественного определения 2-[2-[(5RS)-5-(гидроксиметил)-3-метил-1,3-оксазолидин-2-илиден]-2-цианоэтилиден]-1H-индол-3(2H)-она в лекарственном препарате методом ВЭЖХ-ДМД. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(4). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-4-2335>

Поступила в редакцию: 10.04.2026

Поступила после рецензирования: 27.07.2026

Принята к публикации: 02.10.2026

Development and validation of an analytical method for the quantitative determination of 2-[2-[(5RS)-5-(hydroxymethyl)-3-methyl-1,3-oxazolidin-2-ylidene]-2-cyanoethylidene]-1H-indol-3(2H)-one in the medicinal product by HPLC-DAD

Konstantin D. Shinkin^{1,2} , Sergei V. Krivoshchekov² , Alexandr A. Bondarev¹ , Vladimir V. Bykov^{1,2} , Ilya P. Kaminsky² , Alexey S. Knyazev³ , Mikhail V. Belousov² 

¹ Limited Liability Company "Innovative Pharmacology Research" (IPHAR). 79/4, Elizarovikh str., Tomsk, 634021, Russia

² Siberian State Medical University. 2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russia

³ National Research Tomsk State University. 36, prospekt Lenina, Tomsk, 634050, Russia

✉ **Corresponding author:** Konstantin D. Shinkin. **E-mail:** shinkin.kostya@mail.ru

Abstract

Introduction. The indolinone derivative 2-[2-[(5RS)-5-(hydroxymethyl)-3-methyl-1,3-oxazolidin-2-ylidene]-2-cyanoethylidene]-1H-indol-3(2H)-one (hereinafter referred to as GRS) is a novel soluble guanylate cyclase stimulator and serves as the active pharmaceutical ingredient in the new antithrombotic drug, capsules 20 mg. In pharmaceutical development and industrial manufacturing of medicinal products, multistage quality control is a determining factor for their efficacy and safety. Therefore, the development and validation of rapid and precise analytical methods is an important scientific and practical task.

Aim. To develop and validate a method for the quantitative determination of the active substance (GRS) in the drug product (capsules, 20 mg) using high-performance liquid chromatography with a diode array detector.

Materials and methods. The study objects included the drug containing GRS, (capsules, 20 mg), excipients used in its manufacturing, and the GRS API (powder). Chromatographic conditions were as follows: Kromasil C18 chromatographic column (250 × 4.6 mm, 5 μm); column oven temperature 40 °C; detection wavelength 372 nm; mobile phase A – acetate buffer (pH 4.0); mobile phase B – methanol. Gradient elution mode was performed over 17 min.

Results and discussion. The developed method has been validated according to the following parameters: specificity, linearity within the analytical range, accuracy, precision, and robustness.

Conclusion. The developed method of high-performance liquid chromatography for the quantitative determination of the active substance GRS in the drug product (capsules, 20 mg), has acceptable validation characteristics and is rapid and simple in terms of sample preparation, which allows it to be used in routine analysis for quality control during production.

Keywords: development of an analytical methodology, indolinone derivative, GRS, validation, HPLC, quantitative determination

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

Contribution of the authors. Konstantin D. Shinkin and Sergei V. Krivoshchekov were responsible for study planning. Konstantin D. Shinkin developed and validated the analytical method. Konstantin D. Shinkin, Alexandr A. Bondarev, Vladimir V. Bykov and Sergei V. Krivoshchekov analyzed the results. Konstantin D. Shinkin, Sergei V. Krivoshchekov, Ilya P. Kaminsky, Alexey S. Knyazev, and Mikhail V. Belousov contributed to writing the manuscript. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Shinkin K. D., Krivoshchekov S. V., Bondarev A. A., Bykov V. V., Kaminsky I. P., Knyazev A. S., Belousov M. V. Development and validation of an analytical method for the quantitative determination of 2-[2-[(5RS)-5-(hydroxymethyl)-3-methyl-1,3-oxazolidin-2-ylidene]-2-cyanoethylidene]-1H-indol-3(2H)-one in the medicinal product by HPLC-DAD. *Drug development & registration*. 2026;15(4). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-4-2335>

Received: 10.04.2026

Revised: 27.07.2026

Accepted: 02.10.2026

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), включающие в себя широкий спектр патологий сердца и сосудов, часто приводят к тяжелым клиническим последствиям, таким как инфаркт миокарда, инсульт и тромбоз, занимая первое место среди всех причин смертности в мире¹ [1–2]. Разработка лекарственных препаратов для лечения и профилактики ССЗ является одной из актуальных задач современной фармации.

Новое производное индолинона GRS является стимулятором растворимой гуанилациклазы тромбоцитов и гладких мышц сосудов, оказывает в эксперименте антигипертензивное, антитромботическое действие и снижает проявления дисфункции эндотелия [3, 4]. Лекарственный препарат, капсулы, 20 мг, на основе фармацевтической субстанции GRS успешно прошел I и II фазы клинических исследований [5].

Контроль качества лекарственных препаратов представляет собой ключевой этап в процессе их разработки и промышленного производства. Гарантия стабильности и воспроизводимости химического состава лекарственного препарата, а также его соответствие установленным спецификациям обуславливает безопасность и терапевтическую эффективность проводимой фармакотерапии.

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения действующего вещества в лекарственном препарате, капсулы, 20 мг, с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектором (ВЭЖХ-ДМД), являющегося одним из наиболее широко используемых в фармацевтическом анализе благодаря своей универсальности [6] и возможности одновременной регистрации спектров поглощения в широком диапазоне длин волн, что позволяет оценивать чистоту пика [7, 8] для дополнительного подтверждения специфичности аналитической методики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали ЛФ GRS, капсулы, 20 мг (серия 10724, срок годности до 23.07.2026, АО «Органика», Россия).

Активная фармацевтическая субстанция

В составе ЛП, капсулы, 20 мг, в качестве действующего вещества использовали активную фармацевтическую субстанцию GRS (2-[2-[(5RS)-5-(гидроксиметил)-3-метил-1,3-оксазолидин-2-илиден]-2-цианоэтилиден]-1H-индол-3(2H)-он) (серия 10320, годная на момент проведения испытаний, АО «Органика», Россия) [9]. Структурная формула представлена на рисунке 1.

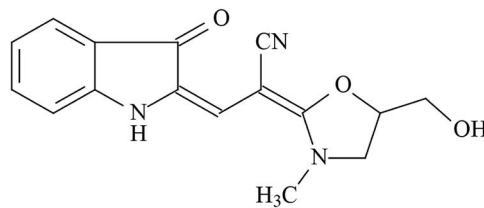


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 1. Структурная формула GRS

Figure 1. Structural formula of GRS

Стандартные образцы

В работе использовали первичный стандартный образец предприятия (СОП) для количественного анализа, содержание GRS в котором составляет 99,23 %. СОП GRS, серия 1012023, годный на момент проведения испытаний (ООО «Ифар», Россия).

Оборудование

Для взвешивания использовали весы лабораторные электронные MB 210-A (ООО «САРТОГОСМ», Россия), для определения pH подвижной фазы использовали pH-метр pH-150МИ (ООО «Измерительная техника», Россия), для увеличения скорости растворения СОП GRS использовали ультразвуковую мойку NU32D (ООО «Нордберг», Россия).

Реактивы

Для разработки и валидации аналитической методики использовали: натрия дигидрофосфат (х.ч., ООО «АЛЬДОСА», Россия), ортофосфорную кислоту (ч.д.а., ООО «АЛЬДОСА», Россия), лития перхлората тригидрат (х.ч., ООО «Химкрафт», Россия), ацетонитрил (ос.ч., сорт «0», ООО «КРИХИМ», Россия), стандарт-титр соляной кислоты 0,1 Н (АО «НПИП «Уралхиминвест», Россия), изопропиловый спирт (ос.ч., АО «ЭКОС-1», Россия), этиловый спирт абсолютный для ВЭЖХ (Fisher Chemical, США), аммоний уксуснокислый (ч.д.а., АО «БЕКТОН», Россия), метанол для градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (ООО «Акваметрия», Россия) и уксусную кислоту ледяную (х.ч., ЗАО «Биомедхим-Фарм», Россия).

Вспомогательные вещества

Для приготовления модельных смесей использовали вспомогательные вещества, входящие в состав лекарственного препарата: целлюлозу микрокристаллическую (DFE Pharma GmbH & Co. KG, Германия), карбоксиметилкрахмал натрия (Anhui Sunhere Pharmaceutical Excipients Co., Ltd., Китай), крахмал картофельный (Anhui Sunhere Pharmaceutical Excipients Co., Ltd., Китай), магния стеарат (Huzhou City Linghu Xinwang Chemical Co., Ltd., Китай).

¹ World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-cvds> Accessed: 22.07.2026.

Фильтры

Для фильтрования растворов использовали поливинилидендифторидовые фильтры PVDF с размером пор 0,45 мкм (Biomed Scientific, США). Эти фильтры выбраны, так как они обладали наименьшей сорбцией среди протестированных фильтров. Данные по выбору шприцевых фильтров представлены в таблице 1.

Таблица 1. Выбор шприцевого фильтра

Table 1. Choice of a syringe filter

Тип шприцевого фильтра (производитель) Syringe filter type (manufacturer)	Средняя площадь пика, mAU · мин Average peak area, mAU · min	Потеря вещества при фильтрации, % Loss of substance during filtration, %
Без фильтрации (центрифугирование) Without filtration (centrifugation)	412583	–
PVDF (поливинилидендифторидовый) (Biomed Scientific, Шри-Ланка) PVDF (polyvinylidene difluoride) (Biomed Scientific, Sri Lanka)	412200	0,09
PTFE (политетрафторэтиленовый) (Darlly, Китай) (polytetrafluoroethylene) (Darlly, China)	411586	0,24
NY (нейлоновый) (Biofil, Китай) NY (nylon) (Biofil, China)	406812	1,40
NY (нейлоновый) (GVS, Италия) NY (nylon) (GVS, Italy)	401240	2,75

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Приготовление растворов

Раствор лития перхлората. Около 330 г лития перхлората помещали в мерную колбу вместимостью 500 см³, прибавляли при перемешивании 450 см³ воды и нагревали до 50 °С, раствор охлаждали до комнатной температуры, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. Далее 2,2 мл хлорной кислоты переносили в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводили раствором лития перхлората до метки, перемешивали. 10 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводили объем раствора до метки дистиллированной водой и перемешивали (состав полученного раствора: 0,2 М лития перхлората, 5 мМ хлорной кислоты).

Ацетатный буфер с pH 4,0 (подвижная фаза А). Растворяли 0,77 г аммония ацетата в 900 мл воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл. Значение pH раствора до значения 4,0 ± 0,1 корректировали добавлением уксусной кислоты, затем объем раствора доводили до метки водой с последующим перемешиванием.

Раствор СОП GRS. Около 0,01 г (точная навеска) СОП GRS помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 70 мл метанола, обрабатывали ультразвуком при 40 °С в течение 5 мин и охлаждали до комнатной температуры, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. Получали раствор концентрации 0,004 мг/мл.

Испытуемый раствор и раствор плацебо. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали навеску содержимого капсулы GRS, для приготовления раствора плацебо использовали смесь вспомогательных веществ, идентичную по составу ЛФ. К навеске добавляли 70 мл метанола, обрабатывали ультразвуком при температуре 40 °С в течение 20 мин и охлаждали до комнатной температуры, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. Раствор фильтровали через мембранный фильтр в виалу для хроматографического анализа, отбрасывая первые 5 мл фильтрата. Концентрация полученного раствора – 0,004 мг/мл.

Модельные смеси. Готовили путем добавления навески СОП в размере 70, 100, 130 % от номинального содержания GRS в капсуле в идентичную по составу ЛФ смесь вспомогательных веществ. Добавляли 70 мл метанола, обрабатывали ультразвуком при температуре 40 °С в течение 20 мин и охлаждали до комнатной температуры, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали. Раствор фильтровали через мембранный фильтр в виалу для хроматографического анализа, отбрасывая первые 5 мл фильтрата. Получали растворы с концентрациями 0,0028; 0,004; 0,0052 мг/мл соответственно.

Стрессовый раствор. Около 0,01 г (точная навеска) субстанции GRS помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл. Добавляли 1 мл раствора 0,1 М соляной кислоты, проводили кислотный гидролиз при температуре 40 °С в течение 20 мин, охлаждали до комнатной температуры. Доводили объем раствора до метки метанолом и перемешивали. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем

раствора водой до метки и перемешивали. Раствор фильтровали через мембранный фильтр в вials для хроматографического анализа, отбрасывая первые 5 мл фильтрата.

Хроматографическое разделение и детектирование

Хроматографическое разделение проводили на хроматографе жидкостном LC-20 Prominence с диодно-матричным детектором SPD-M 20A (Shimadzu Corporation, Япония). Хроматограф оснащен термостатом колонок, дегазатором, насосом и автосемплером. Для хроматографического разделения использовалась колонка Kromasil C18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм (MZ-Analysentechnik, Германия). Разделение проводили с использованием градиентного элюирования, программа градиента представлена в таблице 2.

Таблица 2. Программа градиента

Table 2. Gradient program

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, % Mobile phase A, %	Подвижная фаза Б, % Mobile phase B, %
0	90	10
6	20	80
12	20	80
14	90	10
17	90	10

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

В качестве подвижной фазы А (ПФА) использовали ацетатный буфер с pH 4,0, в качестве подвижной фазы Б (ПФБ) – метанол для градиентной ВЭЖХ. Температура колонки – 40 °С. Объем вводимой пробы составлял 20,0 мкл. Скорость потока подвижной фазы – 1,0 мл/мин. Для детектирования использовали длину волны 372 нм.

Критерии проверки пригодности хроматографической системы

Каждый аналитический цикл сопровождался проверкой пригодности хроматографической системы, которая заключалась в хроматографировании растворителя, раствора СОП не менее 3 раз и стрессового раствора GRS. Хроматографическая система считалась пригодной, если: эффективность хроматографической системы, рассчитанная по пику GRS на хроматограммах СОП GRS, была не менее 15 000 теоретических тарелок, фактор асимметрии пика GRS – от 0,8 до 1,8, относительное стандартное отклонение площади пика GRS, рассчитанное по трем последовательным хроматограммам, – не более 2,0 %, разрешение между пиком GRS и ближайшей примеси на хроматограмме стрессового раствора – не менее 1,5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка аналитической методики

В ходе разработки аналитической методики изучили влияние pH на свойства молекулы GRS при хроматографировании. Для этого были приготовлены фосфатные буферные растворы с pH 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0; 7,0 в соответствии с ОФС.1.3.003 «Буферные растворы» ГФ РФ XV. Хроматографировали раствор GRS в метаноле в изократическом режиме (ПФА 50%-я :ПФБ 50%-я), в качестве ПФБ использовали метанол, а в качестве ПФА – буферные растворы с различным pH. Сравнивали время удерживания (RT), коэффициент удерживания (k), число теоретических тарелок (N), фактор асимметрии пика (A_s). Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты влияния pH на хроматографирование GRS

Table 3. Results of pH influence on GRS chromatography

pH	RT, мин RT, min	k	N	A _s
2,5	7,04	1,82	3473	1,02
3,0	7,06	1,82	3469	1,00
3,5	7,07	1,83	3451	1,00
4,0	7,07	1,83	3438	1,00
4,5	7,07	1,83	3428	1,00
5,0	7,08	1,83	3441	0,99
6,0	7,09	1,84	3413	0,99
7,0	7,09	1,84	3461	1,00

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

По результатам проведенного исследования обнаружили отсутствие значимого влияния pH на свойства молекулы GRS при хроматографировании.

Для выбора неподвижной фазы были протестированы 5 хроматографических колонок: Kromasil C18 100 Å, 250 × 4,6 мм, 5 мкм (MZ-Analysentechnik, Испания), Protecol C18H 120 Å, 150 × 4,6 мм, 5 мкм (Trajan, Австралия), Protecol C8H 120 Å, 150 × 4,6 мм, 5 мкм (Trajan, Австралия), Ascentis RP-Amide 100 Å, 150 × 4,6 мм, 5 мкм (Supelco, США), Prontosil C18 120 Å, 75 × 2 мм, 5 мкм (ООО ИХ «ЭкоНова», Россия). В качестве эксперимента хроматографировали раствор СОП GRS в единых условиях (изократическое элюирование (ПФА 50%-я :ПФБ 50%-я), ПФА – вода для хроматографии, ПФБ – метанол) с изменением только хроматографической колонки и скорости потока с 1,0 до 0,2 мл/мин для колонки Prontosil C18 120 Å, 75 × 2 мм, 5 мкм. Результаты эксперимента представлены в таблице 4.

Сравнительный анализ показал, что среди сорбентов идентичной длины (150 мм) колонка Ascentis RP-Amide демонстрирует наилучшую эффективность хроматографирования молекулы GRS (N = 6097, A_s = 1,18). Также хороший результат показала колон-

ка Kromasil C18, увеличение длины сорбентного слоя до 250 мм позволило компенсировать относительно более низкую эффективность короткой C18-фазы, это обеспечило рост эффективности ($N = 12\,732$) и улучшения формы пика ($A_s = 1,12$) без изменения состава элюента.

Таблица 4. Результаты исследования влияния хроматографических колонок с разным углеродным содержанием

Table 4. Results of the study of the influence of chromatographic columns with different carbon content

Хроматографическая колонка Chromatographic column	RT, мин RT, min	k	N	A_s
Kromasil C18 100 Å, 250 × 4,6 мм, 5 мкм Kromasil C18 100 Å, 250 × 4.6 mm, 5 μm	7,16	1,86	12732	1,12
Protecol C18H 120 Å, 150 × 4,6 мм, 5 мкм Protecol C18H 120 Å, 150 × 4.6 mm, 5 μm	3,83	1,05	6043	1,68
Protecol C8H 120 Å, 150 × 4,6 мм, 5 мкм Protecol C8H 120 Å, 150 × 4.6 mm, 5 μm	3,92	1,24	6497	1,31
Ascentis RP-Amide 100 Å, 150 × 4,6 мм, 5 мкм Ascentis RP-Amide 100 Å, 150 × 4.6 mm, 5 μm	4,32	1,54	6097	1,18
Prontosil C18 120 Å, 75 × 2 мм, 5 мкм Prontosil C18 120 Å, 75 × 2 mm, 5 μm	2,80	1,00	1130	1,57

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Для сравнения селективности и устойчивости разделения в присутствии потенциальных продуктов деградации на двух лидерных колонках был проведен эксперимент. Проводили хроматографирование стрессовых растворов GRS, полученных с помощью кислотного гидролиза [10]. Исследование включало варьирование содержания метанола в подвижной фазе (30–60 %) для построения зависимостей хроматографических параметров от элюирующей силы подвижной фазы. Сравнивали время удерживания (RT), коэффициент удерживания (k), число теоретических тарелок (N), асимметрию пика (A_s) и разрешение между пиком основного вещества и ближайшей примесью (R_s). Результаты представлены в таблице 5.

Исследование продемонстрировало экспоненциальное снижение коэффициента удерживания с ростом доли метанола. Колонка Kromasil C18 показала систематическое превосходство по всем ключевым параметрам: число теоретических тарелок на колонке Kromasil C18 было в 1,5–2,0 раз выше, чем на колонке RP-Amide при эквивалентном составе элюента. Критически важным преимуществом колонки Kromasil C18 стало сохранение высокого разрешения даже при повышенном содержании органического модификатора. При 50 и 60 % метанола значения R_s для колонки Kromasil C18 составили 5,95 и 2,24 соответственно, тогда как для колонки RP-Amide – 4,00 и 0,93. Хроматограммы представлены на рисунках 2–3.

На основании проведенных исследований для разработки и валидации аналитической методики была выбрана колонка Kromasil C18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм (MZ-Analysentechnik GmbH, Германия), так как она продемонстрировала свое превосходство над другими тестируемыми колонками, а также классические октадецилсилильные фазы на высокочистом силикагеле типа В характеризуются высокой гидролитической стабильностью при длительной эксплуатации в водно-органических подвижных фазах [11].

Таблица 5. Влияние содержания метанола на хроматографические параметры аналита и примесей на двух типах колонок

Table 5. Effect of methanol content on the chromatographic parameters of the analyte and impurities for two types of columns

Наименование колонки Column name	% ПФБ % Mobile phase B	RT, мин RT, min	k	N	A_s	R_s
Kromasil C18, 250 × 4,6 мм, 5 мкм Kromasil C18, 250 × 4.6 mm, 5 μm	30	42,20	15,88	19056	1,03	22,28
	40	14,99	5,00	15978	1,07	21,37
	50	7,26	1,90	12863	1,12	5,95
	60	4,60	0,84	9653	1,25	2,24
Ascentis RP-Amide 100 Å, 150 × 4,6 мм, 5 мкм Ascentis RP-Amide 100 Å, 150 × 4.6 mm, 5 μm	30	21,93	8,05	10672	1,05	12,77
	40	8,57	2,71	8175	1,09	7,30
	50	4,38	1,03	6349	1,16	4,00
	60	2,86	0,42	4956	1,27	0,93

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

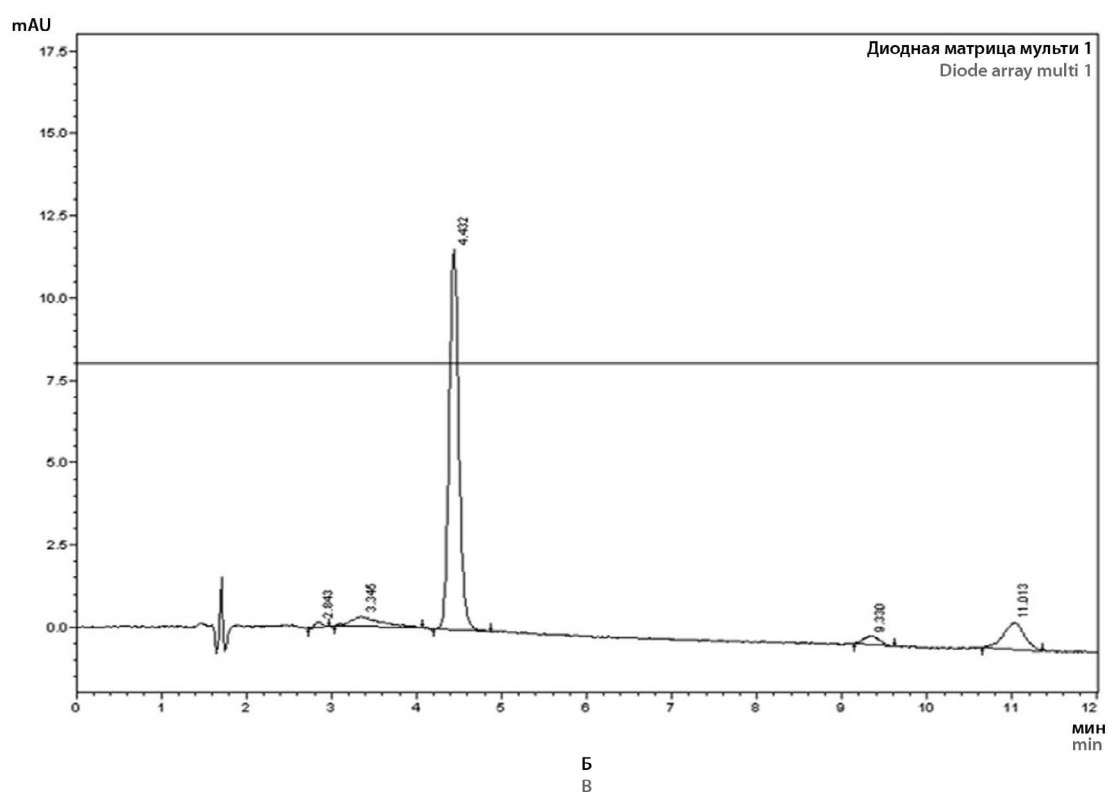
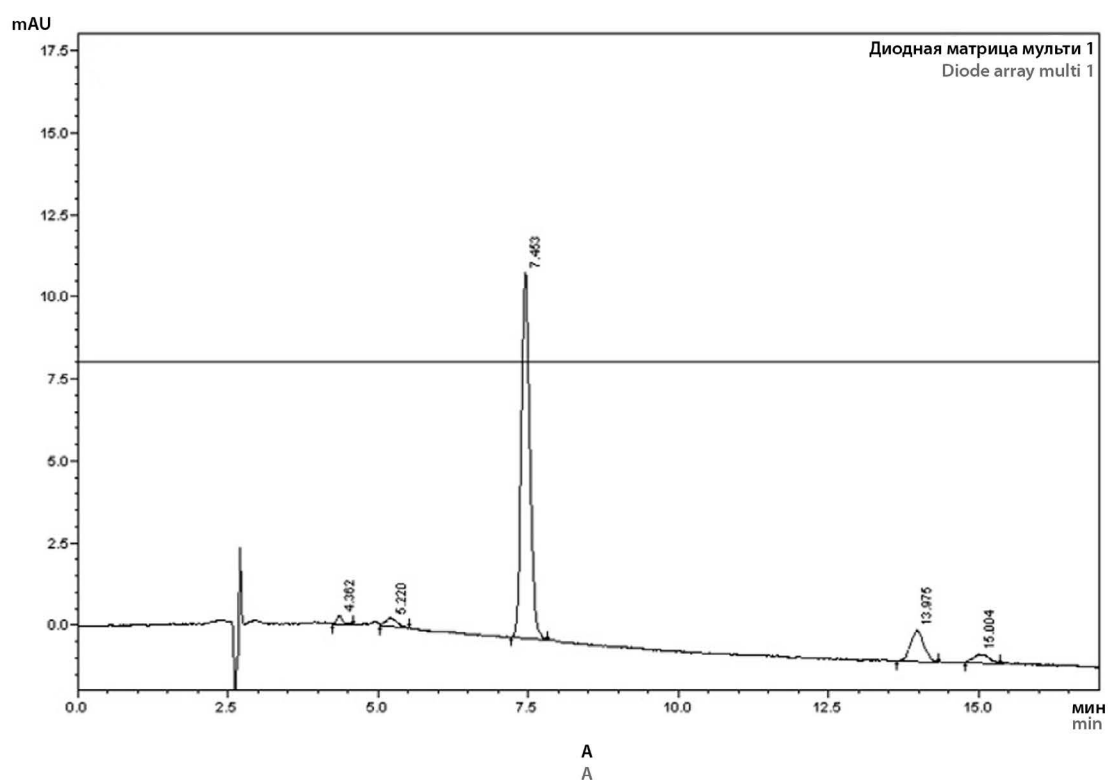


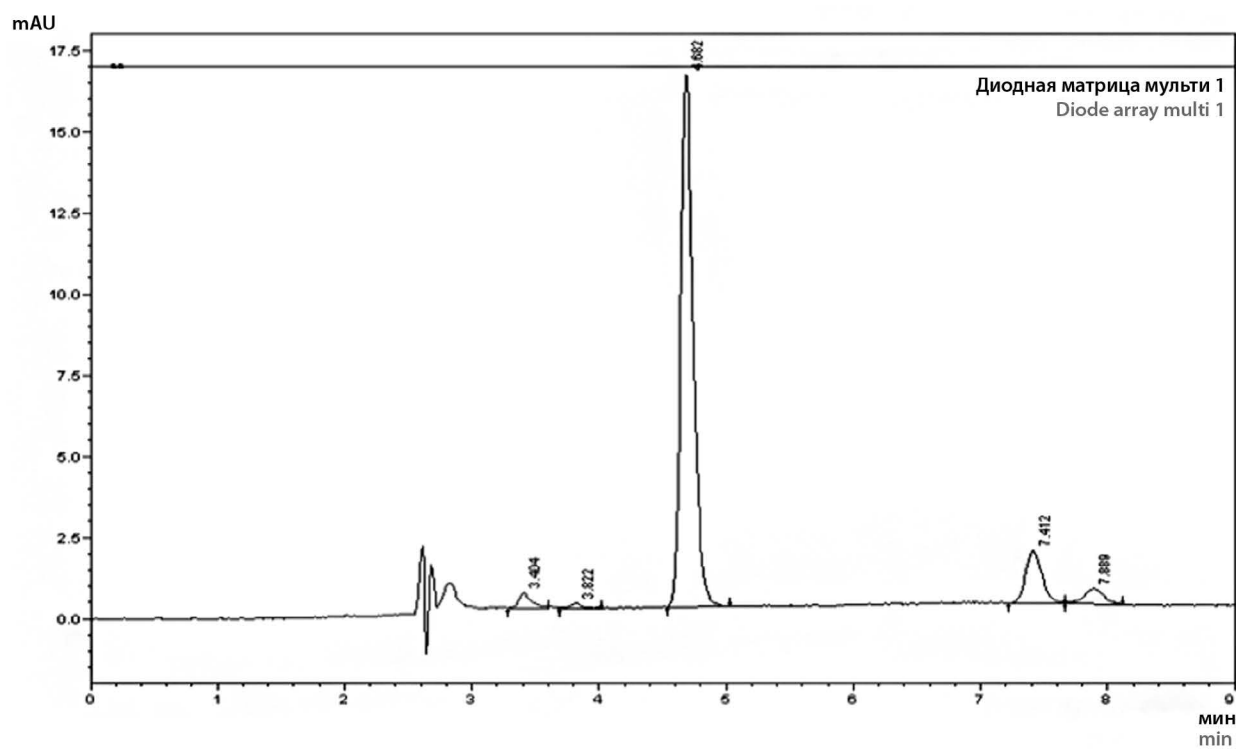
Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 2. Хроматограммы стрессовых растворов GRS:

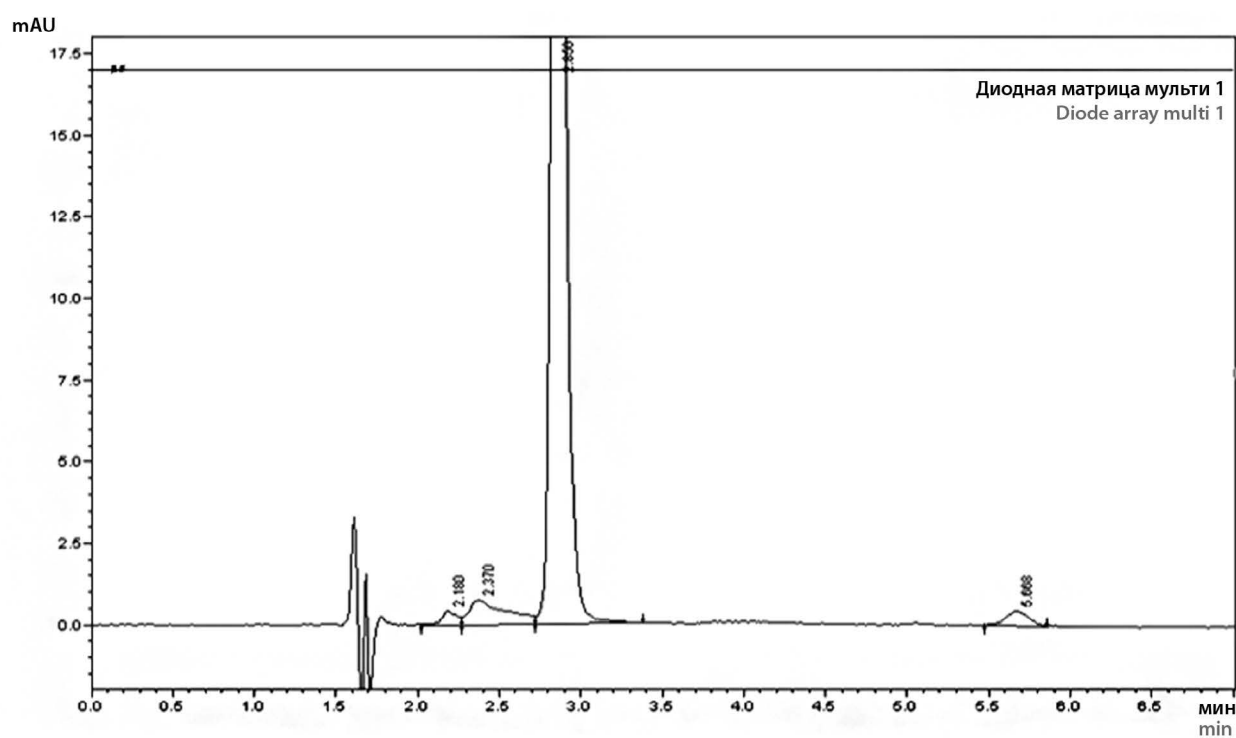
А – 50%-й метанол Kromasil C18, 250 мм; Б – 50%-й метанол Ascentis RP-Amide, 150 мм

Figure 2. Chromatograms of GRS stress solutions:

A – 50 % methanol Kromasil C18, 250 mm; B – 50 % methanol Ascentis RP-Amide, 150 mm



А
А



Б
В

Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 3. Хроматограммы стрессовых растворов GRS:

А – 60%-й метанол Kromasil C18, 250 мм; Б – 60%-й метанол Ascentis RP-Amide, 150 мм

Figure 3. Chromatograms of GRS stress solutions:

А – 60 % methanol Kromasil C18, 250 mm; Б – 60 % methanol Ascentis RP-Amide, 150 mm

Был проведен подбор органического растворителя для использования в качестве ПФБ. Хроматографирование проводили в изократическом режиме (ПФА 50%-я:ПФБ 50%-я), в качестве ПФА использовали воду для хроматографии, в качестве ПФБ вариировали разные популярные для использования обращенно-фазовой ВЭЖХ органические растворители (ацетонитрил, метанол, этанол, изопропиловый спирт). Дополнительно изучали влияние использования воды при пробоподготовке: готовили растворы GRS, растворенные в 100%-й ПФБ, сравнивали с растворами GRS, приготовленными с использованием воды на этапе разбавления. Результаты исследования представлены в таблице 6.

Таблица 6. Влияние разных подвижных фаз Б на хроматографию GRS

Table 6. Effect of different mobile phases B variants on GRS chromatography

Подвижная фаза Б Mobile phase B	Использование воды в пробоподготовке Use of water in sample preparation	RT, мин RT, min	k	N	A _s
Ацетонитрил Acetonitrile	Нет No	3,21	0,28	3703	1,12
	Да Yes	3,26	0,30	9502	1,39
Метанол Methanol	Нет No	7,07	1,83	3600	0,96
	Да Yes	7,26	1,96	12732	1,12
Этанол Ethanol	Нет No	3,41	0,36	1585	1,91
	Да Yes	3,50	0,40	6531	1,34

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

При тестировании этанола и изопропанола зафиксировано существенное повышение давления системы по сравнению с ацетонитрилом и метанолом. Эксплуатация колонки в условиях повышенного давления нежелательна, так как ускоряет уплотнение сорбентного слоя, снижает ее ресурс и повышает риск нестабильности потока. Изопропанол был исключен на этапе скрининга без проведения хроматографических испытаний: давление превысило рабочие лимиты системы, а GRS демонстрировал в нем крайне низкую растворимость, что создавало прямой риск выпадения осадка и загрязнения хроматографического тракта. Этанол обеспечивал приемлемое, хотя и повышенное давление, однако по совокупности гидродинамических характеристик и селективности в качестве рабочего органического компонента был выбран метанол.

На этапе скрининга в изократическом режиме были определены рабочие условия, обеспечивающие приемлемые хроматографические параметры (колонка Kromasil C18, 50%-го метанола:50%-й воды для хроматографии). Была проведена предварительная валидация: изучили повторяемость и правильность полученной методики. Данные представлены в таблице 7.

Значения относительного стандартного отклонения 3,11 % для теста «Повторяемость» и показателя правильности $95,27 \pm 2,42$ % оказались неудовлетворительными. Поэтому было решено перейти на градиентный режим элюирования.

Несмотря на отсутствие значимого влияния pH в диапазоне 2,5–7,0 на хроматографию GRS, при переходе к разработке рутинной методики было принято решение использовать буферы для стабилизации pH системы, так как в дальнейшем полученные хроматографические условия могут быть использованы в качестве основы для валидации аналитических методик не только для лекарственной формы, но и субстанции, а также биоаналитики. При разработке градиентного режима элюирования использование фосфатного буфера привело к существенному росту

Таблица 7. Данные предварительной валидации

Table 7. Preliminary validation data

Масса навески, мг Sample mass, mg	Средняя S, mAU · мин Average S, mAU · min	Теоретическая концентрация, % Theoretical concentration, %	Найденная концентрация, % Found concentration, %	RSD, %	Правильность, % Accuracy, %
20,12	327997	100,60	97,82	3,11	95,27
19,96	324813	99,80	96,87		
20,50	325724	102,50	97,14		
19,82	309515	99,10	92,30		
20,08	312496	100,40	93,19		
19,94	316285	99,70	94,32		

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

давления и появлению системного пика, элюирующегося в непосредственной близости от аналита. Данное явление было интерпретировано как следствие кристаллизации неорганических солей в смесительной камере и хроматографическом тракте при программном увеличении доли органического модификатора, что создавало риск износа оборудования и снижения долгосрочной воспроизводимости методики. Хроматограмма представлена на рисунке 4.

Для устранения данной проблемы фосфатный буфер с pH 2,5 был заменен на раствор лития перхлората. В качестве условий градиентного элюирования с лития перхлоратом использовали описанный ранее для широкого круга соединений режим [12, 13]. Хроматограмма представлена на рисунке 5, А. В качестве альтернативы фосфатному буферному раствору также использовали ацетатный буфер с pH 4,0 с использованием градиента, аналогичного градиенту лития перхлората, хроматограмма представлена на рисунке 5, Б.

Обе буферные системы обеспечили высокую эффективность, удовлетворительную асимметрию и разрешение, однако ацетатный буфер продемонстрировал значимое превосходство по разрешению основного пика с ближайшей примесью ($R_s = 4,17$ против 2,17 у лития перхлората), что в сумме с экономической невыгодностью лития перхлората при потоковом анализе для количественного определения GRS в ЛП, капсулы, 20 мг, позволило сделать окончательный выбор в пользу ацетатного буфера с pH 4,0.

При использовании ацетатного буфера в исходном градиентном профиле время удерживания целевого аналита составляло 19,66 мин, что избыточно для рутинного анализа. Для сокращения времени цикла была проведена оптимизация градиентного профиля: увеличен начальный наклон градиента и скорректированы временные интервалы элюирова-

ния. Несмотря на ожидаемое снижение абсолютных значений эффективности и разрешения, все полученные параметры ($N = 149\,191$, $A_s = 1,20$, $R_s = 2,61$) остаются в пределах, значительно превышающих минимальные критерии пригодности системы, при уменьшении времени удерживания с 19,66 мин до 10,45. Разработанная методика представлена на рисунке 6.

Валидация аналитической методики

Валидацию проводили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XV издания (ГФ РФ XV), а именно ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XV, Руководством по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств, утвержденным решением Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17.07.2018 № 113 и ICH Topic Q2 (R1) «Validation of Analytical procedures: Text and Methodology» по следующим характеристикам: специфичности, аналитической области, линейности, правильности, прецизионности и робастности.

Специфичность

Специфичность методики оценивали для определения селективности измерений GRS в ЛС, капсулы, 20 мг. Проверяли возможные, мешающие измерению GRS факторы – системные пики, пики растворителя и пики вспомогательных веществ.

Специфичность методики оценивали испытанием трех растворов плацебо (рисунок 7), трех растворов СОП GRS (см. рисунок 6), трех испытуемых растворов (рисунок 8), а также стрессовых растворов (рисунок 9). Дополнительно оценена чистота хроматографического пика с помощью диодно-матричного детектора [14]. Каждый раствор хроматографировали по 3 раза.

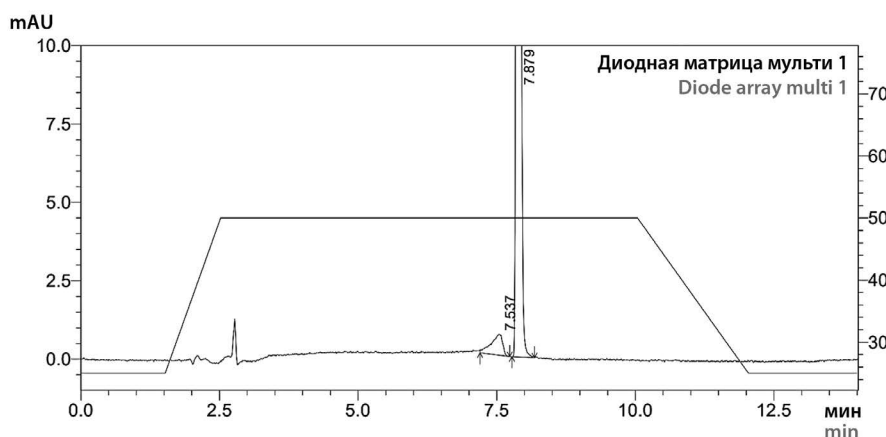
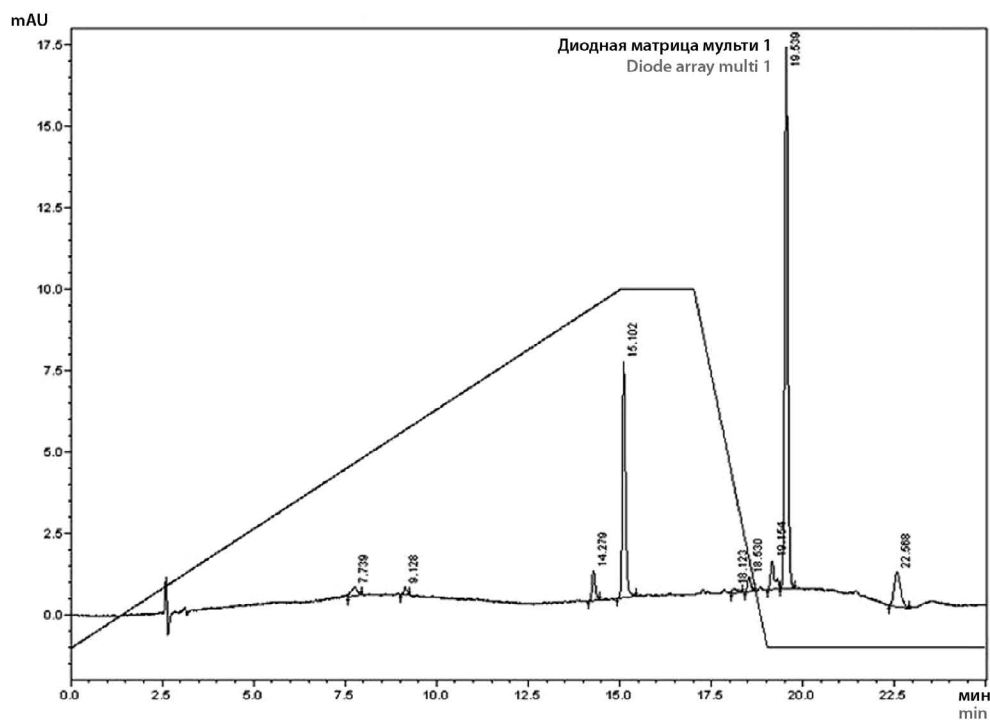


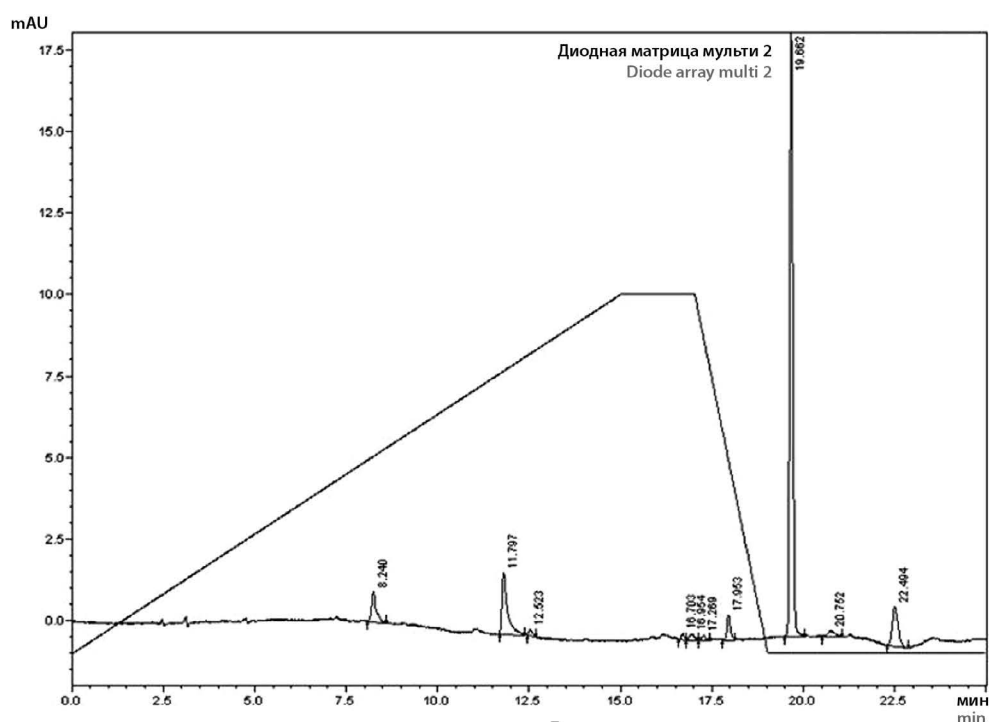
Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 4. Хроматограмма GRS. Фосфатный буфер: ацетонитрил ($N = 52\,538$, $A_s = 1,40$)

Figure 4. Chromatogram of GRS. Phosphate buffer: acetonitrile ($N = 52,538$, $A_s = 1.40$)



А
А



Б
Б

Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 5. Сравнительный анализ хроматографических условий:

А – лития перхлорат 0,2 М : метанол ($N = 208\,246$, $A_s = 1,19$, $R_s = 2,17$); **Б** – ацетатный буфер с pH 4,0 : метанол ($N = 218\,947$, $A_s = 1,19$, $R_s = 4,17$)

Figure 5. Comparative analysis of chromatographic conditions:

A – 0.2 M lithium perchlorate : methanol ($N = 208\,246$, $A_s = 1.19$, $R_s = 2.17$); **B** – acetate buffer, pH 4.0 : methanol ($N = 218\,947$, $A_s = 1.19$, $R_s = 4.17$)

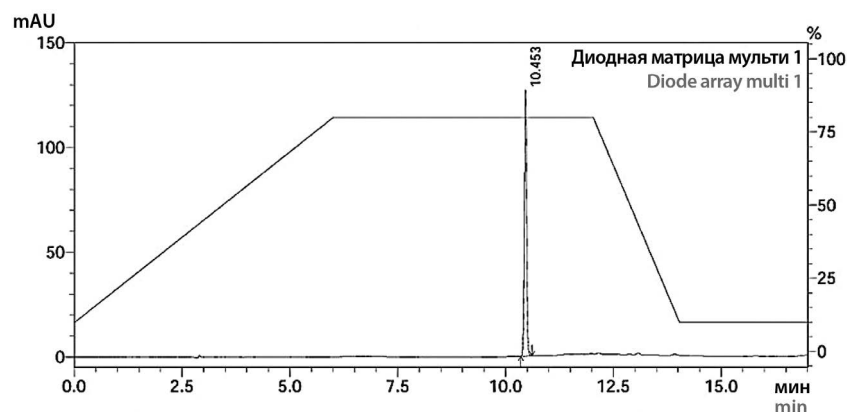


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 6. Хроматограмма СОП GRS. Ацетатный буфер с pH 4,0 : метанол, градиентный режим элюирования ($N = 149\,191$, $A_s = 1,2$)

Figure 6. Chromatogram of the GRS standard sample solution. Acetate buffer solution, pH 4.0 : methanol, gradient elution mode ($N = 149\,191$, $A_s = 1.2$)

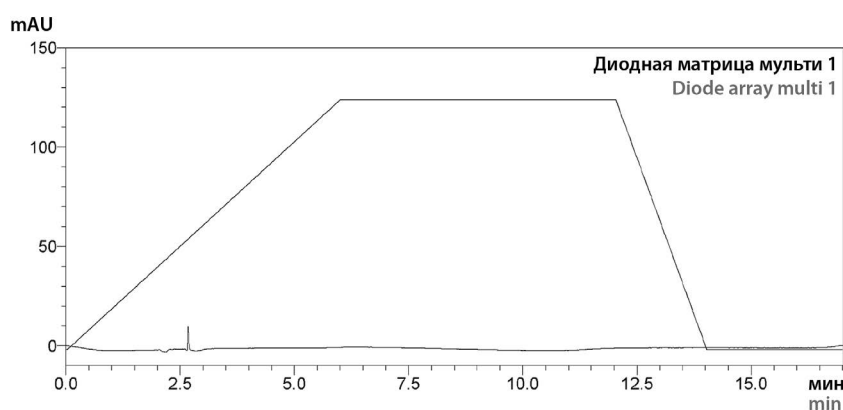


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 7. Хроматограмма раствора плацебо

Figure 7. Chromatogram of placebo solution

Для подтверждения специфичности использовали следующие критерии приемлемости: время удерживания пика GRS должно совпадать на хроматограммах СОП и испытуемого раствора, на хроматограммах растворов плацебо не должно быть пиков, соответствующих времени удерживания GRS, на хроматограмме стрессового раствора разрешение между пиком основного вещества и ближайшей примесью (R_s) $\geq 1,5$.

Установили, что для девяти определений GRS в испытуемых растворах и для девяти определений GRS в СОП время удерживания GRS совпадало и составляло 10,45 мин. В каждой из девяти хроматограмм растворов плацебо не наблюдали пик, соответствующий времени удерживания GRS, на хроматограм-

ме стрессового раствора R_s ближайшей к пику GRS примеси составило 2,59, что соответствует критериям приемлемости. Спектральная чистота пика превышает 0,9999, что свидетельствует об отсутствии родственных примесей, коэлюирующих с пиком GRS.

Аналитическая область

Так как аналитическая методика используется для количественного определения и для определения однородности дозирования, валидируемый аналитический диапазон составил от 70 до 130 %. В качестве 100 % концентрации выбрали концентрацию 4 мкг/мл. Аналитический диапазон – от 2,8 мкг/мл до 5,2 мкг/мл.

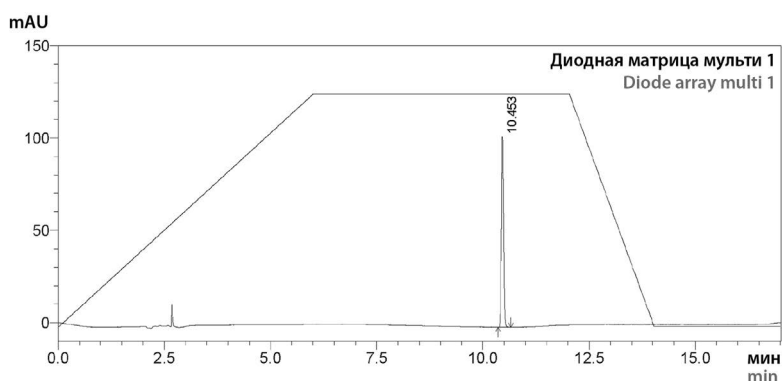


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 8. Хроматограмма испытуемого раствора

Figure 8. Chromatogram of the test solution

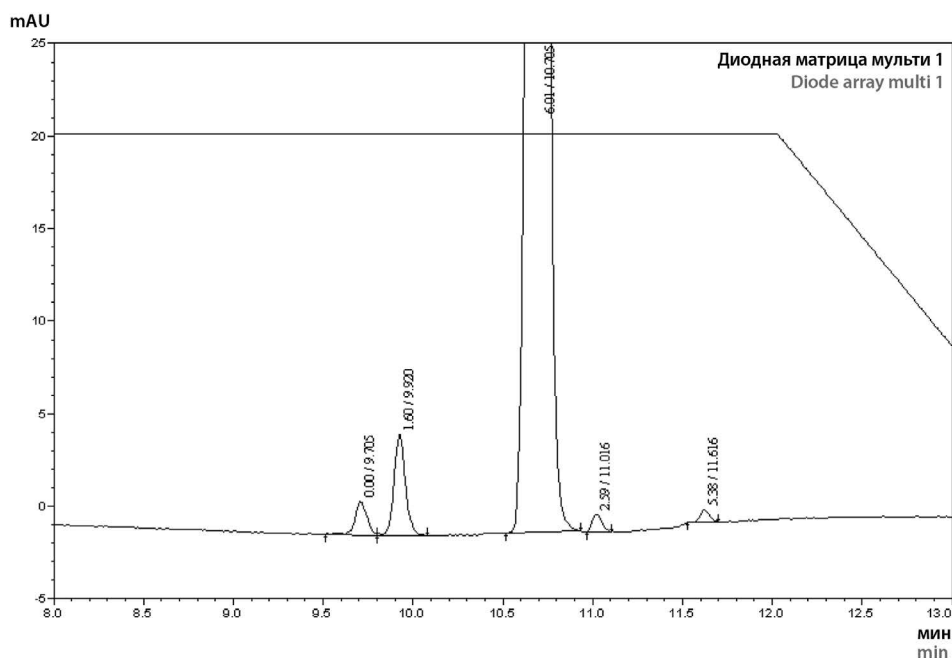


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 9. Хроматограмма стрессового раствора (подписи над пиками: разрешение (R_s) / время удерживания (RT))

Figure 9. Chromatogram of the stress solution (labels above the peaks: resolution (R_s) / retention time (RT))

Линейность

Критерием приемлемости служило описание линейности уравнением вида $y = kx + b$, наличие у градуировочной зависимости коэффициента корреляции со значением не меньше 0,9900, статистически незначимый свободный член уравнения линейности.

Испытание проводили путем анализа трех серий растворов СОП GRS, приготовленных с содержанием определяемого вещества 2,8; 3,2; 3,6; 4,0; 4,4; 4,8;

5,2 мкг/мл. Каждый раствор хроматографировали не менее трех раз.

В таблице 8 представлены данные трех серий, которые использовались для построения результирующей градуировочной зависимости, представленной на рисунке 11.

В результате эксперимента линейность разработанной методики подтвердили, так как градуировочные зависимости трех серий и результирующей имели коэффициенты корреляции со значениями

не менее 0,9900 (0,9999), что удовлетворяет требованиям. Линейность описывалась уравнением $y = 3975,5x - 3327,2$. Незначимость свободного члена проверяли с помощью t-критерия Стьюдента, вычисленное значение 1,9196 оказалось меньше табличного 2,5706 ($\alpha = 0,05$), что доказывало его статистическую незначимость.

Таблица 8. Данные изучения линейности зависимости аналитического сигнала от концентрации GRS

Table 8. Data of the linearity study of the analytical signal dependence on the concentration of GRS

Средняя фактическая концентрация GRS Average actual concentration of GRS		Средняя площадь пика в серии, mAU · мин Average peak area in a series, mAU · min			Общая средняя площадь пика, mAU · мин Total average peak area, mAU · min
%	мкг/мл µg/mL	Серия № 1 Series № 1	Серия № 2 Series № 2	Серия № 3 Series № 3	
70,33	2,81	279478	280333	264677	262504
80,37	3,21	316329	317989	311861	301632
90,42	3,62	358733	359205	345368	343214
100,47	4,02	394460	395335	387737	396187
110,51	4,42	436445	436893	426567	439394
120,56	4,82	477347	477843	467946	483031
130,61	5,22	518869	520110	501297	522514

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

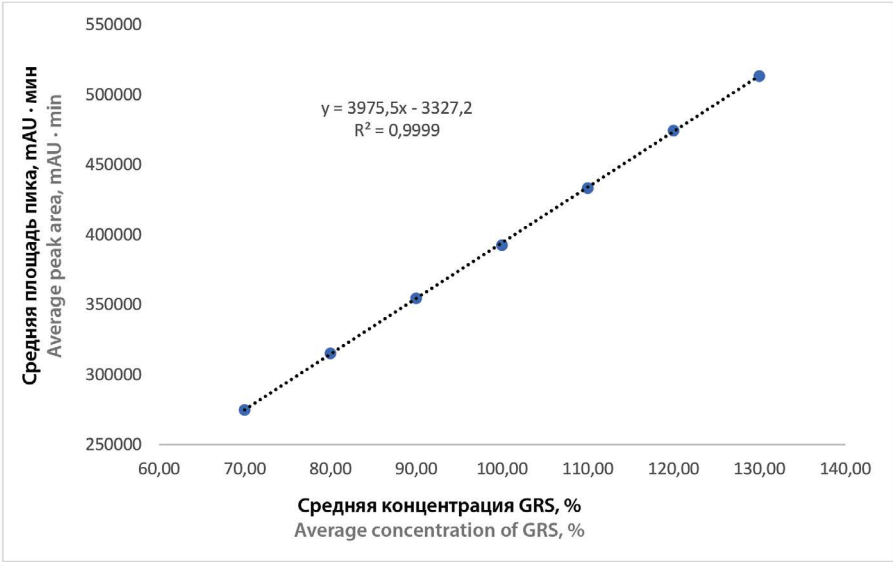


Рисунок предоставлен авторами
The figure was provided by the authors

Рисунок 10. Результирующая градуировочная зависимость

Figure 10. Resulting calibration curve

Прецизионность

Прецизионность (повторяемость) методики определяли по результатам хроматографирования шести испытуемых растворов. Внутрिलाбораторную прецизионность определяли по результатам хроматографирования двенадцати испытуемых растворов, шесть из которых были взяты из проведения теста повторяемости. Остальные 6 были приготовлены и проанализированы в другой день другим аналитиком.

Для подтверждения прецизионности использовали следующие критерии приемлемости:

1. Стандартное отклонение концентрации GRS в шести испытуемых растворах не должно превышать 2 %.
2. Сравнение двух выборок ($n = 6$) методом F- и t-критериев не выявляет значимых различий ($\alpha = 0,05$).

В таблицах 9 и 10 представлены результаты исследования прецизионности разработанной методики. Для статистической обработки данных рассчитали значение критерия Шапиро – Уилка, который показал отсутствие статистически значимых отклонений распределения от нормального в двух группах измерений ($p = 0,612, 0,279$ соответственно). Расчетный критерий Фишера составил 1,34, что меньше критического значения (5,05, при $\alpha = 0,05$), различий между дисперсиями не выявлено. Для сравнения средних значений применяли критерий Стьюдента для двух независимых выборок. Расчетный t-критерий составил 0,0004, что меньше критического значения (2,201, при $\alpha = 0,05$). Таким образом, значимых различий между подгруппами не обнаружено.

Таблица 9. Результаты оценки повторяемости

Table 9. Repeatability assessment results

№	Концентрация GRS, % Concentration of GRS, %	Средняя концентрация GRS, % Average concentration of GRS, %	Стандартное отклонение, % RSD, %
1	101,53	100,44	1,00
2	98,88		
3	101,06		
4	100,19		
5	99,80		
6	101,21		

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

По результатам теста «Прецизионность» методика имеет удовлетворительную повторяемость, а статистическая обработка результатов соответствует критериям приемлемости, что подтверждает внутрилабораторную прецизионность методики.

Правильность

Оценку правильности проводили с использованием модельных смесей с концентрациями 70, 100 и 130 % от номинальной. Результаты эксперимента представлены в таблице 11. Критерий приемлемости: доверительные интервалы правильности должны покрывать 100,00 %.

В результате проведения теста подтвердилась близость между теоретической и найденной концент-

рацией. Итоговая правильность для девяти определений составила $100,71 \pm 1,73$ %, что соответствует критерию приемлемости.

Робастность

Исследование робастности методики проведено методом «one-factor-at-a-time» [15]. Для оценки робастности методики исследовались такие факторы, как стабильность растворов, температура хроматографической колонки, скорость потока и рабочая длина волны.

Стабильность растворов

Исследовалась стабильность раствора СОП GRS и испытуемого раствора во временных точках 0, 24 и 72 ч после приготовления. При температуре хранения 2–8 °С и 18–24 °С. В качестве критерия приемлемости было выбрано условие: содержание GRS в растворе должно быть $100,00 \pm 2,00$ % [15]. В таблице 12 представлены результаты исследования стабильности.

Значения площадей пиков GRS на хроматограммах СОП и ИП в 0 точке были приняты за 100,00 %, стабильность изучали путем сравнения значения отклика пика GRS на хроматограммах СОП и ИП в точках 24 ч и 72 ч относительно точки 0. Данные представлены в таблице 12.

По результатам исследования установлено, что раствор СОП GRS остается стабильным в течение 72 ч как при хранении при комнатной температуре, так и в холодильнике. В то же время испытуемый раствор через 72 ч при хранении при комнатной температуре выходит за пределы установленного диапазона $100,00 \pm 2,00$ %.

Таблица 10. Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности

Table 10. Results of intralaboratory precision assessment

№	Концентрация GRS, % Concentration of GRS, %	Средняя концентрация GRS, % Average concentration of GRS, %	Стандартное отклонение, % RSD, %	Критерий Шапиро – Уилка Shapiro – Wilk test	F-критерий расчетный F-criterion calculated	t-критерий расчетный t-criterion calculated
1	101,53	100,01	1,12	0,934	1,34	0,0004
2	98,88					
3	101,06					
4	100,19					
5	99,80					
6	101,21					
7	99,31			0,882		
8	101,57					
9	98,49					
10	99,80					
11	98,47					
12	99,76					

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Таблица 11. Экспериментальные данные правильности

Table 11. Accuracy experimental data

Масса навески, г Sample weight, g	Теоретическая концентрация GRS, % Theoretical concentration of GRS, %	Средняя площадь пика, mAU · мин Average peak area, mAU · min	Найденная концентрация GRS, % Founded GRS concentration, %	Правильность, % Accuracy, %	Средняя правильность, % Average accuracy, %
Концентрации растворов 70 % Solution with concentration 70 %					
0,01451	72,55	270677	71,38	98,39	99,45
0,01460	73,00	274508	72,39	99,17	
0,01445	72,25	276125	72,82	100,79	
Концентрации растворов 100 % Solution with concentration 100 %					
0,02033	101,65	388015	102,33	100,67	99,45
0,02027	101,35	373855	98,59	97,28	
0,02045	102,25	389252	102,65	100,39	
Концентрации растворов 130 % Solution with concentration 130 %					
0,02613	130,65	506503	133,58	102,24	103,23
0,02604	130,20	514608	135,71	104,23	
0,02609	130,45	510539	134,64	103,21	

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Таблица 12. Результаты исследования стабильности растворов

Table 12. Results of the solution stability study

Временная точка, ч Time point, h	Температура хранения, °C Storage temperature, °C	Среднее значение отклика для СОП GRS, % Average response value for RS GRS, %	Среднее значение отклика для ИР, % Average response value for TS, %
0	18–24	100,00	100,00
24	2–8	99,99	99,48
	18–24	99,93	99,28
72	2–8	99,81	99,19
	18–24	98,26	93,93

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

Влияние хроматографических параметров

Для оценки влияния заданных хроматографических параметров предложены следующие критерии:

1. Количество теоретических тарелок должно соответствовать пригодности хроматографической системы (15 000 ТТ).

2. Асимметрия пика (A_s) должна быть от 0,8 до 1,8.
3. Время удерживания (RT) GRS не должно отличаться более чем на 15 % [15].
4. Относительное стандартное отклонение площади пика GRS не должно превышать 2 %.

В качестве хроматографических параметров для исследования робастности выбрали: температуру (Т) хроматографической колонки ± 3 °C от принятой в методике (40 °C), скорость потока (F) ± 10 % от методики (1,0 мл/мин), длину волны детектирования (λ) ± 2 нм от принятых в методике 372 нм. Результаты исследования представлены в таблице 13.

Таким образом, установили, что изменение температуры колонки на ± 3 °C от принятой в методике (40 °C) и изменение длины волны детектирования на ± 2 нм от принятых в методике 372 нм не ведет к значительным отличиям времени выхода и площади пика GRS. Изменение скорости потока на ± 10 % от принятой в методике (1,0 мл/мин) значительно влияет на площадь пика и время удерживания основного вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработали и валидировали методику количественного определения действующего вещества GRS в лекарственном препарате, капсулы, 20 мг. По резуль-

Таблица 13. Результаты исследования робастности

Table 13. Results of the robustness study

Показатель Indicator	Методика Method	T –3 °C	T +3 °C	F = 0,9 мл/мин F = 0.9 mL/min	FR = 1,1 мл/мин FR = 1.1 mL/min	λ –2 нм λ –2 nm	λ +2 нм λ +2 nm
RT, мин RT, min	10,43	10,51	10,37	11,16	9,88	10,43	10,43
N, TT	151866	364055	361995	158206	145814	151866	151866
A _s	1,2	1,0	1,0	1,2	1,2	1,2	1,2
S, mAU · мин S, mAU · min	473625	472590	472393	521495	430847	467694	476568
Отличие S, % Difference S, %	–	0,21	0,26	10,11	9,03	1,25	0,62
Отличие RT, % Difference RT, %	–	0,76	0,58	7,00	5,27	0,0	0,0
Критерий приемлемости, +/- Acceptance criteria, +/-		+	+	–	–	+	+

Таблица предоставлена авторами
The table was provided by the authors

татам валидационных испытаний доказали, что методика специфична, линейна – коэффициент корреляции превосходит значение 0,9900 (0,9999), линейность описывается уравнением $y = 3975,5x - 3327,2$, значение относительного среднеквадратического отклонения при оценке повторяемости не превышает 2,00 %, а сравнение дисперсий и средних значений подтвердило внутрилабораторную прецизионность. Показано, что раствор СОП стабилен в течение 72 ч, а испытуемый раствор стабилен в течение 24 ч, изучена робастность аналитической методики при изменении температуры колонки, скорости потока и длины волны детектирования.

Предложенная методика основывается на методе ВЭЖХ с фотометрическим детектированием и отличается простой пробоподготовкой, доступностью реагентов, что дает возможность использовать ее в рутинном анализе для контроля качества на производственных площадках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roth G. A., Mensah G. A., Johnson C. O., Addolorato G., Ammirati E., Baddour L. M., Barengo N. C., Beaton A. Z., Benjamin E. J., Benziger C. P., Bonny A., Brauer M., Brodmann M., Cahill T. J., Carapetis J., Catapano A. L., Chugh S. S., Cooper L. T., Coresh J., Criqui M., DeCleene N., Eagle K. A., Emmons-Bell S., Feigin V. L., Fernandez-Sola J., Fowkes G., Gakidou E., Grundy S. M., He F. J., Howard G., Hu F., Inker L., Karthikeyan G., Kassebaum N., Koroshetz W., Lavie C., Lloyd-Jones D., Lu H. S., Mirijello A., Temesgen A. M., Mokdad A., Moran A. E., Muntner P., Narula J., Neal B., Ntsekhe M., Moraes de Oliveira G., Otto C., Owolabi M., Pratt M., Rajagopalan S., Reitsma M., Ribeiro A. L. P., Rigotti N., Rodgers A., Sable C., Shakil S., Sliwa-Hahnle K., Stark B., Sundström J., Timpel P., Tleyjeh I. M., Valgimigli M., Vos T., Whelton P. K., Yacoub M., Zuhlke L., Murray C., Fuster V. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;76(25):2982–3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
2. Timmis A., Aboyans V., Vardas P., Townsend N., Torbica A., Kavousi M., Boriani G., Huculeci R., Kazakiewicz D., Scherr D., Karagiannis E., Cvijic M., Kaplon-Cieslicka A., Ignatiuk B., Raatikainen P., De Smedt D., Wood A., Dudek D., Van Belle E., Weidinger F., ESC National Cardiac Societies. European Society of Cardiology: the 2023 atlas of cardiovascular disease statistics. *European Heart Journal*. 2024;45(38):4019–4062. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehae466>
3. Быков В. В., Быкова А. В., Станкевич С. А., Алиев О. И., Сидехменова А. В., Дунаева О. И., Хазанов В. А., Венгеровский А. И., Удут В. В. Фармакологические эффекты нового стимулятора растворимой гуанилатциклазы при экспериментальной легочной артериальной гипертензии. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(1):14–22. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-1-14-22>
4. Быков В. В., Смольякова В. И., Чернышева Г. А., Алиев О. И., Анищенко А. М., Сидехменова А. В., Дунаева О. И., Станкевич С. А., Хазанов В. А. Влияние нового антитромботического средства GRS – стимулятора растворимой гуанилатциклазы на эндотелиальную дисфункцию у

крыс после инфаркта миокарда. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021;172(12):707–710. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-172-12-707-710>

5. Мартынов А. И., Барбараш О. Л., Кобалава Ж. Д., Малавин А. Г., Бощенко А. А., Венгеровский А. И., Затеищikov Д. А., Чесникова А. И., Якушин С. С., Кашталап В. В., Хазанов В. А., Быков В. В., Ларченко В. В. Резолюция совета экспертов «Перспективные возможности применения препарата GRS в терапевтической практике». *Терапия*. 2024;10(5):144–149. <https://doi.org/10.18565/therapy.2024.5.144-149>
6. Temova Rakuša Ž., Grobin A., Roškar R. A comprehensive approach for the simultaneous analysis of all main water-soluble vitamins in multivitamin preparations by a stability-indicating HPLC-DAD method. *Food Chemistry*. 2021;337:127768. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127768>
7. Debnath S., Das M., Mondal S., Sarkar B. K., Babu G. Advances in chromatography: contemporary techniques and applications. *Essential Chem*. 2025;2(1):1–27. <https://doi.org/10.1080/28378083.2025.2466624>
8. Петраков А. И., Кривошеков С. В., Гурьев А. М., Белоусов М. В. Получение и аттестация первичного стандартного образца 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-*F*]ксантина. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2025;15(6):655–663. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-6-655-663>
9. Граник В. Г., Рябова С. Ю., Паршин В. А., Михайлова Л. А., Григорьев Н. Б. Новое антитромботическое и антиатеросклеротическое средство и способ его получения (варианты). Патент РФ на изобретение № RU 2483066C1. 27.05.2013. Доступно по: <https://patents.google.com/patent/RU2483066C1/ru> Ссылка активна на 23.07.2026
10. Эпштейн Н. А. О стрессовых экспериментах при разработке / усовершенствовании аналитических методик и технологий лекарственных субстанций и препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016;(3):118–132.
11. Liu X., Bordunov A. V., Pohl C. A. Preparation and evaluation of a hydrolytically stable amide-embedded stationary phase. *Journal of Chromatography A*. 2006;1119(1–2):128–134. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.086>
12. Барам Г. И., Грачев С. А. Использование перхлората лития при выделении и анализе олиго- и полинуклеотидов. *Биоорганическая химия*. 1985;11(10):1420–1422.
13. Азарова И. Н., Барам Г. И. Применение перхлората лития в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии аминокислот. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2014;14(1):65–74.
14. Эпштейн Н. А. Валидация хроматографических методик: контроль чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):129–136. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136>
15. Эпштейн Н. А., Севастьянова В. Л., Королева А. И. Исследование робастности при валидации методик ВЭЖХ и УЭЖХ: современный подход, включающий анализ рисков. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(1):96–109.

REFERENCES

1. Roth G. A., Mensah G. A., Johnson C. O., Addolorato G., Ammirati E., Baddour L. M., Barengo N. C., Beaton A. Z., Benjamin E. J., Benziger C. P., Bonny A., Brauer M., Brodmann M., Cahill T. J., Carapetis J., Catapano A. L., Chugh S. S., Cooper L. T., Coresh J., Criqui M., DeCleene N., Eagle K. A., Emmons-Bell S., Feigin V. L., Fernandez-Sola J., Fowkes G., Gakidou E., Grundy S. M., He F. J., Howard G., Hu F., Inker L., Karthikeyan G., Kassebaum N., Koroshetz W., Lavie C., Lloyd-Jones D., Lu H. S., Mirijello A., Temesgen A. M., Mokdad A., Moran A. E., Muntner P., Narula J., Neal B., Ntsekhe M., Moraes de Oliveira G., Otto C., Owolabi M., Pratt M., Rajagopalan S., Reitsma M., Ribeiro A. L. P., Rigotti N., Rodgers A., Sable C., Shakil S., Sliwa-Hahnle K., Stark B., Sundström J., Timpel P., Tleyjeh I. M., Valgimigli M., Vos T., Whelton P. K., Yacoub M., Zuhlke L., Murray C., Fuster V. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;76(25):2982–3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
2. Timmis A., Aboyans V., Vardas P., Townsend N., Torbica A., Kavousi M., Boriani G., Huculeci R., Kazakiewicz D., Scherr D., Karagiannis E., Cvijic M., Kapłon-Cieślicka A., Ignatiuk B., Raatikainen P., De Smedt D., Wood A., Dudek D., Van Belle E., Weidinger F., ESC National Cardiac Societies. European Society of Cardiology: the 2023 atlas of cardiovascular disease statistics. *European Heart Journal*. 2024;45(38):4019–4062. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehae466>
3. Bykov V. V., Bykova A. V., Stankevich S. A., Aliev O. I., Sidehmenova A. V., Dunaeva O. I., Hazanov V. A., Vengerovskii A. I., Udut V. V. Pharmacological effects of a novel soluble guanylate cyclase stimulator in experimental pulmonary arterial hypertension. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2023;22(1):14–22. (In Russ.) <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-1-14-22>
4. Bykov V. V., Smol'yakova V. I., Chernysheva G. A., Aliev O. I., Anishchenko A. M., Sidekhmenova A. V., Dunaeva O. I., Stankevich S. A., Khazanov V. A. Effects of a new anti-thrombotic drug GRS, a soluble guanylate cyclase stimulator, on endothelial dysfunction in rats with myocardial infarction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2021;172(12):707–710. (In Russ.) <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-172-12-707-710>
5. Martynov A. I., Barbarash O. L., Kobalava Zh. D., Malyavin A. G., Boshchenko A. A., Vengerovsky A. I., Zateyshchikov D. A., Chesnikova A. I., Yakushin S. S., Kashtalap V. V., Khazanov V. A., Bykov V. V., Larchenko V. V. Expert Council Resolution: «Promising Opportunities for the Use of the Drug GRS in Therapeutic Practice». *Therapy*. 2024;10(5):144–149. (In Russ.) <https://doi.org/10.18565/therapy.2024.5.144-149>
6. Temova Rakuša Ž., Grobin A., Roškar R. A comprehensive approach for the simultaneous analysis of all main water-soluble vitamins in multivitamin preparations by a stability-indicating HPLC-DAD method. *Food Chemistry*. 2021;337:127768. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127768>

7. Debnath S., Das M., Mondal S., Sarkar B. K., Babu G. Advances in chromatography: contemporary techniques and applications. *Essential Chem.* 2025;2(1):1–27. <https://doi.org/10.1080/28378083.2025.2466624>
8. Petrakov A. I., Krivoshchekov S. V., Guryev A. M., Belousov M. V. Obtaining and Certifying Primary Reference Standard of 6,8-Dimethyl-2-Piperidinomethyl-2,3-Dihydrothiazolo[2,3-F]xanthine. *Regulatory Research and Medicine Evaluation.* 2025;15(6):655–663. (In Russ.) <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2025-15-6-655-663>
9. Granik V. G., Ryabova S. Yu., Parshin V. A., Mikhailova L. A., Grigor'ev N. B. Novel antithrombotic and anti-atherosclerotic agent and method for producing the same (variants). Patent RUS № 2483066C1. 27.05.2013. Available at: <https://patents.google.com/patent/RU2483066C1/ru> Accessed: 23.07.2026. (In Russ.)
10. Epshtein N. A. About stress experiments by developing / improving analytical methods and technology of drug substances and medicines. *Drug development & registration.* 2016;(3):118–132. (In Russ.)
11. Liu X., Bordunov A. V., Pohl C. A. Preparation and evaluation of a hydrolytically stable amide-embedded stationary phase. *Journal of Chromatography A.* 2006;1119(1–2):128–134. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.086>
12. Baram G. I., Grachev S. A. Use of lithium perchlorate in the isolation and analysis of oligo- and polynucleotides. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 1985;11(10):1420–1422. (In Russ.)
13. Azarova I. N., Baram G. I. Application of lithium perchlorate in reversed-phase high-performance liquid chromatography of amino compounds. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy.* 2014;14(1):65–74. (In Russ.)
14. Epshtein N. A. Validation of Chromatographic Methods: Checking the Peak Purity and the Specificity of Methods with Diode Array Detectors (Review). *Drug development & registration.* 2020;9(3):129–136. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136>
15. Epshtein N. A., Sevastianova V. L., Koroleva A. I. Investigation of robustness at validation of hplc and uplc methods: a modern approach including risk analysis. *Drug development & registration.* 2018;(1):96–109. (In Russ.)