

# Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-6-53-60  
© Коллектив авторов, 2018

М. С. Гойзман<sup>1</sup>, Н. Л. Шимановский<sup>2</sup>, Д. Л. Шоболов<sup>1</sup>, О. А. Зотова<sup>1</sup>,  
О. С. Ермакова<sup>1</sup>, Г. Б. Тихомирова<sup>1</sup>, М. Г. Чернобровкин<sup>1</sup>

## МЕТОДЫ АНАЛИТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ТАБЛЕТИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ДАРУНАВИРА. СООБЩЕНИЕ II

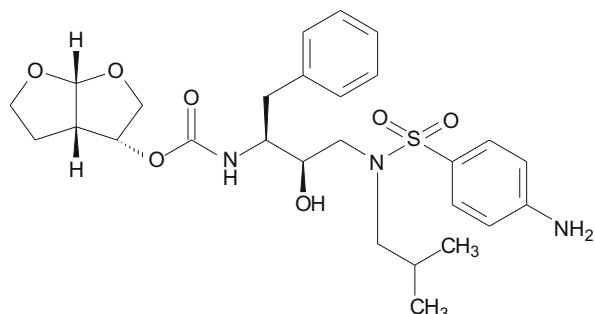
<sup>1</sup> ООО “Технология лекарств”, Россия, Химки, Московская обл., Рабочая ул., д. 2а;  
e-mail: goizmanmi@gmail.com

<sup>2</sup> ГБОУ ВПО “РНИМУ им. Н. И. Пирогова” Минздрава РФ, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1;  
e-mail: shimannn@yandex.ru

Ранее показано, что целенаправленная разработка специальных методик, регламентирующих методы аналитического контроля лекарственных форм дарунавира (ДРВ), позволяет избежать использования дорогостоящих импортных стандартных образцов (СО). В сообщении I описаны такие методики и результаты их валидации. Предназначались они для разделов “Подлинность”, “Тальк, кремния диоксид, титана двуокись” и “Растворение” соответствующих монографий. В сообщении II продолжено рассмотрение методик, не требующих использования СО, предлагаемых для включения в разделы монографий “Посторонние примеси” и “Количественное определение”. Оценку содержания посторонних примесей предложено проводить методом ВЭЖХ в градиентном режиме. Нижний предел определяемого содержания отдельной примеси по отношению к ДРВ равен 0,02 %, относительное стандартное отклонение (*RSD*) суммарного содержания примесей не превышает 10 %. В разделе “Количественное определение” концентрацию ДРВ предложено определять методом прямой УФ-спектрофотометрии в растворе аналита (рН ~ 9) по методике, применение которой потребовало предварительного экспериментального определения величины удельного показателя поглощения ДРВ ( $A_{1\text{см}}^{1\%}$ ) в водно-метанольных растворах (рН ~ 9) в максимуме при длине волны 267 нм. Найденное значение  $A_{1\text{см}}^{1\%} = 393,4 \text{ см}^{-1}$  (*RSD* < 1 % при степени надёжности  $\alpha = 0,05$ ). Следовательно, величина  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  является физико-химической константой. Её использование обеспечивает при количественных определениях ДРВ методом прямой УФ-спектрофотометрии снижение *RSD* результатов до 1 % и сокращение затрат времени в 2 – 3 раза ввиду отсутствия необходимости приготовления растворов стандартного образца и измерения их оптической плотности.

**Ключевые слова:** монография; дарунавив (ДРВ); ДРВ этанолят; ДРВ аморфный; стандартный образец (СО); метод ГЖХ; примеси; удельный показатель поглощения ( $A_{1\text{см}}^{1\%}$ ); активная фармацевтическая субстанция (АФС); УФ-спектрофотометрия; валидация.

Одним из лучших фармакоэкономически эффективных ингибиторов ВИЧ протеазы является [(3*R*,3*aS*,6*aR*)-гексагидрофурано[2,3-*b*]фуран-3-ил]-*N*-[(1*S*,2*R*)-3-[[[4-аминофенил]сульфонил](изобутил)амино]-1-бензил-2-гидроксипропил]карбамат, получивший МНН “Дарунавив” (ДРВ) [1, 2].



Эмпирическая формула  $C_{27}H_{37}N_3O_7S$ ; молекулярная масса 547,7

ДРВ содержится в таблетках KEMERUVIR в форме несольватированного аморфного вещества, а в таблетках PREZISTA — в форме кристаллического этанолята [2].

Эмпирическая формула ДРВ этанолята —  $C_{27}H_{37}N_3O_7S \cdot C_2H_5OH$ ; молек. масса ДРВ этанолята — 593,7.

В работе [1] показано, что целенаправленная разработка специальных методик для включения их в разделы монографий, регламентирующих методы контроля качества лекарственных форм ДРВ, позволяет исключить использование дорогостоящих стандартных образцов (СО). При этом были разработаны методики, предназначенные для включения в разделы “Подлинность”, “Тальк, кремния диоксид, титана двуокись” и “Растворение”. В настоящем сообщении представлены методики, предназначенные для включения в разделы “Посторонние примеси” и “Количественное оп-

ределение”. Они также не требуют использования СО и, с учётом своих валидационных характеристик [3, 4], пригодны для включения в монографии, регламентирующие контроль качества лекарственных форм, содержащих ДРВ в качестве активной фармацевтической субстанции (АФС).

**Раздел “Посторонние примеси”.** Определение содержания примесей проводят методом ВЭЖХ [5]. На основании результатов валидации в монографию введена следующая методика:

Колонка	Xbridge C18 3,5 мкм 4,6 × 150 мм
Температура колонки	40 °С
Расход подвижной фазы (ПФ)	1,3 мл/мин
СФ детектор	λ 264 нм

Программа “время — состав ПФ” представлена в табл. 1.

**Компонент А ПФ.** Помещают 0,77 г аммония ацетата в мерную колбу вместимостью 1 л, добавляют 600 мл воды, перемешивают до растворения. Под потенциометрическим контролем при перемешивании доводят рН полученного раствора до 9,6 добавлением 25 – 30 капель раствора аммиака концентрированного 25 %. Объём раствора в колбе доводят водой до метки, перемешивают и фильтруют через стеклянный фильтр № 3, затем дегазируют (срок годности компонента А ПФ — 1 сут).

**Компонент В ПФ.** Ацетонитрил для хроматографии.

**Бланк-раствор.** В коническую колбу с притёртой пробкой вместимостью 250 мл вносят по 100 мл компонентов А и В ПФ, перемешивают (срок годности бланк-раствора — 1 сут).

**Испытуемый раствор.** Помещают 50 мг порошка растёртых таблеток в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 12,5 мл ацетонитрила (т.е. компонента В ПФ), полученную суспензию обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин и после охлаждения до комнатной температуры доводят её объём до метки компонентом А ПФ, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (первые 2 мл фильтрата отбрасывают). Фильтрат используют в качестве испытуемого раствора (срок годности — 8 ч).

**Примечание.** Навеска рассчитана в предположении, что 1 г таблеточной массы содержит ~ 0,50 г ДРВ.

**Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.** Помещают 1 мл испытуемого раство-

ра в коническую колбу с притёртой пробкой вместимостью 10 мл, прибавляют 4 мл 1 М раствора хлористоводородной кислоты, перемешивают. Кислый раствор выдерживают 30 мин при температуре от 95 до 100 °С, охлаждают до комнатной температуры и прибавляют к нему 4 мл 1 М раствора натрия гидроксида, перемешивают (срок годности раствора для проверки пригодности хроматографической системы — 8 ч).

**Примечание.** В указанных условиях частично происходит гидролиз ДРВ с образованием эквимолекулярных количеств сульфаниловой кислоты и [(3*R*,3*aS*,6*aR*)-гексагидрофууро[2,3-*b*]фуран-3-ил]-*N*-[(1*S*,2*R*)-3-[(изобутил)амино]-1-бензил-2-гидроксипропил]карбамата. Оба продукта имеют фенильный хромофор, следовательно, можно считать, что сумма их молярных показателей поглощения должна быть равна молярному показателю поглощения ДРВ. Экспериментально показано, что в пересчёте на равные количества хроматографируемых веществ площадь единственного пика ДРВ (*S*) на рис. 1, б и сумма площадей 3 пиков ( $\Sigma S$ ) на рис. 2 отличаются от их среднего значения ( $(S + \Sigma S)/2$ ) не более чем на 5 %.

**Раствор сравнения.** Помещают 1 мл испытуемого раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора до метки бланк-раствором, перемешивают. Полученный раствор в объёме 1 мл помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объём раствора до метки бланк-раствором, перемешивают (срок годности раствора сравнения — 8 ч).

**Порядок хроматографирования.** Хроматографическую колонку кондиционируют не менее 10 мин (расход ПФ 1,3 мл/мин при объёмном отношении компонентов ПФ А и В 9:1).

Последовательно хроматографируют (по 20 мкл) бланк-раствор (не менее 1 раза), раствор для проверки пригодности хроматографической системы (не менее 1 раза), раствор сравнения (не менее 2 раз), испытуемый раствор (не менее 3 раз). Типичные хроматограммы представлены на рис. 1 и 2.

**Хроматографическая система считается пригодной, если:**

на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы (рис. 2) величина разрешения между пиком ДРВ (основной пик) и ближайшим к нему пиком продукта разложения  $\geq 2$ ;

на хроматограмме испытуемого раствора величина хвостового фактора пика ДРВ (основной пик) не превышает 1,7;

эффективность колонки по пику ДРВ не меньше 5000 теоретических тарелок;

отношение площадей пиков ДРВ на хроматограммах испытуемого раствора к площадям его пиков на хроматограммах соответствующих растворов сравнения находится в пределах от 800 до 1200.

В случае необходимости допускается корректировка условий хроматографирования в целях достижения пригодности хроматографической системы.

Программа “время – состав”

Таблица 1

Время, мин	Компонент А ПФ, %	Компонент В ПФ, %
0 → 25	90 → 58	10 → 42
25 → 30	58	42
30 → 40	58 → 30	42 → 79
40 → 50	30	70
50 → 51	30 → 90	70 → 10

*Расчет.* Содержание любой примеси в препарате ( $X_i$ ) в отн. % от содержания в нём ДРВ вычисляются по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \cdot 0,1}{S_0};$$

где  $S_i$  — площадь пика  $i$ -той примеси на хроматограмме испытуемого раствора;  $S_0$  — площадь пика ДРВ на хроматограмме раствора сравнения.

Пики примесей, для которых величина  $X_i < 0,02$  %, при расчёте суммарного содержания примесей не учитываются.

Содержание любой единичной примеси в препарате в отн. % к ДРВ не должно превышать 0,2 %, при этом их суммарное содержание в препарате ( $\sum X_i$ ) не должно превышать 0,5 %.

Результаты испытания считаются достоверными, если хроматографическая система признана пригодной к использованию.

**Валидация.** Методика определения посторонних примесей в таблетках, содержащих ДРВ в качестве АФС, была экспериментально валидирована по следующим характеристикам [3]: предел обнаружения (чувствительность); предел количественного определения; аналитическая область; линейность; правильность; прецизионность (повторяемость, иначе сходимость; промежуточная прецизионность). Использовались жидкостные хроматографы Alliance (Waters, США) и Agilent 1200 (Agilent Technologies, США).

*Предел обнаружения (чувствительность).* В соответствии с приведенной выше методикой для приготовления раствора сравнения испытуемый раствор разбавляют в 1000 раз. Следовательно, площадь основного пика на хроматограмме этого раствора должна составлять ~ 0,1 % от площади пика ДРВ на хроматограмме испытуемого раствора (рис. 1, хроматограммы  $a$  и  $b$ ). При этом экспериментально показано, что на хроматограммах испытуемого раствора могут фиксироваться пики, по площади составляющие ~ 0,01 % от площади основного пика. Мы рассматриваем эту величину как предел обнаружения содержания примесей по предложенной методике, что и является критерием приемлемости последней по характеристике “Предел обнаружения (чувствительность)”.

*Пределы количественного определения.* С учётом изложенного нижний предел количественной оценки содержания отдельной примеси принимается равным 0,02 %. При этом верхний предел определения содержания отдельной примеси мы формально принимаем равным 1 %. Реально верхний предел не следует ограничивать, поскольку, как указано выше, содержание любой единичной примеси в препарате в отн. % к ДРВ не должно превышать 0,2 %. В принципе, при наличии экспериментальных данных о пригодности валидируемой методики для надёжного определения содержания отдельных примесей, лежащего как ниже, так и выше допущенной для каждой из них нормы, определять пределы обнаружения нет необходимости [3].

*Аналитическая область.* В данном случае аналитическая область методики для отдельной примеси лежит выше 0,02 % от хроматографируемого количества ДРВ, равного ~ 20 мкг, что полностью удовлетворяет требованиям к критериям пригодности методики по характеристике валидации “Пределы количественного определения”.

*Линейность и правильность.* Подтверждением того, что по характеристикам “Линейность” и “Правильность” методика удовлетворяет необходимым требованиям, служит близкая к 1000 (т.е. к степени разбавления) величина отношения ( $j$ ) площадей пиков ДРВ на хроматограммах испытуемого раствора к площадям его пиков на хроматограммах соответствующих растворов сравнения. При этом уравнение графика зависимости площади пика ( $S$ ) от массы ДРВ в заколе ( $m$ , мкг) является линейным. При обработке [4] методом наименьших квадратов (МНК) данных хроматограмм, представленных на рис. 1,  $b$  и 2, вычислено:

$$S = 1366268m + 3007, R = 1,0000$$

(абсциссы в мкг:  $m_1 = 0$ ;  $m_2 = 0,0192$ ;  $m_3 = 19,2$ ).

Абсолютную величину стандартного отклонения величины  $j$  от 1000 при этом можно рассматривать как критерий соответствия валидируемой методики требованиям характеристик “Линейность” и “Правильность”. Для величины  $j$  должно быть справедливо неравенство:  $|j - 1000| \cdot 100 \% / 1000 \leq 20 \%$ . Для 10 параллельных определений величина  $|j - 1000| \cdot 100 \% / 1000$  не превышала 20 %. Например, для хроматограмм  $a$  и  $b$  (рис. 1)  $j = 26235349/32250 = 813,4$ ,  $|813,4 - 1000| \cdot 100 \% / 1000 = 18,7 \%$ , т.е.  $\leq 20 \%$ . Если же вычислять  $S_2$  по уравнению  $S = 1366268m + 3007$  при  $m_2 = 0,0192$ , то  $j = 26235349/29239 = 897,3$ , и тогда получим:  $|897,3 - 1000| \cdot 100 \% / 1000 \approx 10 \%$ .

Таким образом, по характеристикам “Линейность” и “Правильность” методика пригодна для включения в монографию.

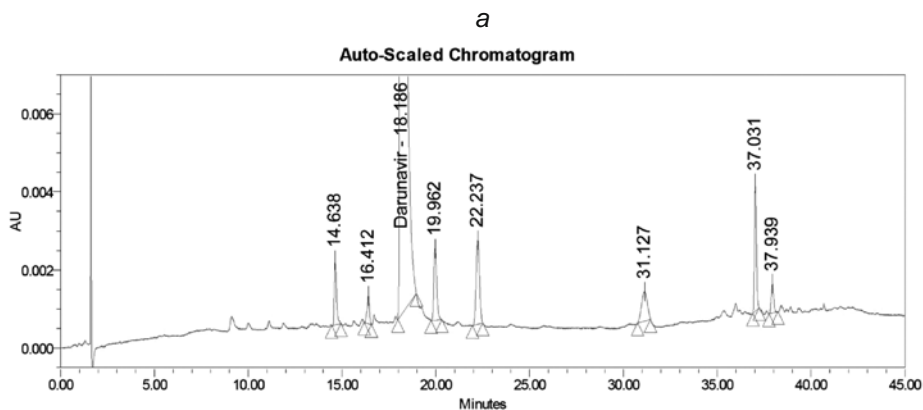
*Прецизионность.* Применительно к валидируемой методике эту характеристику надлежит оценивать на 2 уровнях:

- как повторяемость (сходимость);
- как промежуточную прецизионность.

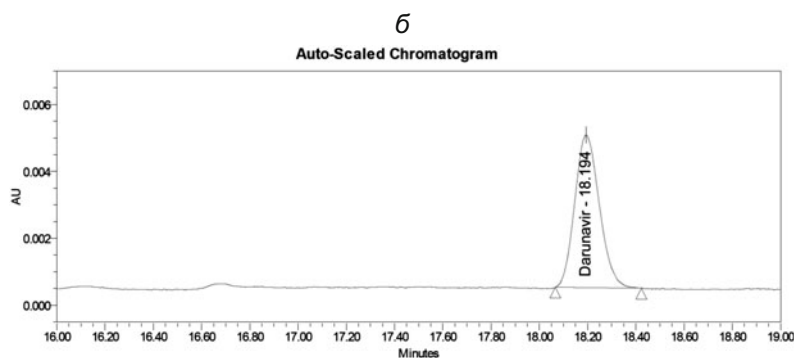
*Повторяемость (сходимость)* характеризует прецизионность аналитической методики при одинаковых условиях испытания в отдельно взятой лаборатории в пределах краткого промежутка времени (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов).

*Промежуточная прецизионность* характеризует влияние на прецизионность аналитической методики факторов варьирования условий (разные дни проведения испытаний, исполнители, приборы). Исследование влияния перечисленных факторов может проводиться одновременно.

Валидируемая методика предписывает регулярную проверку пригодности хроматографической системы перед началом работы.



	Name	RT	Area	Height	% Area	USP Plate Count	USP Resolution	USP Tailing
1		14,638	13319	1661	0,05	8,637483e+ 004		1,417036e+ 000
2		16,412	5970	713	0,02	9,823241e+ 004	8,199167e+ 000	8,538859e- 001
3	Darunavir	18,186	26235349	2976032	99,58	1,287581e+ 005	8,233150e+ 000	1,173209e+ 000
4		19,962	19324	1846	0,07	8,461945e+ 004	7,392545e+ 000	2,267029e+ 000
5		22,237	26724	2163	0,10	7,311277e+ 004	7,497444e+ 000	1,068151e+ 000
6		31,127	16259	759	0,06	4,840277e+ 004	1,861386e+ 001	9,652479e- 001
7		37,031	23195	3270	0,09	6,161997e+ 005	1,449510e+ 001	1,128458e+ 000
8		37,939	6937	749	0,03	3,554658e+ 005	4,053845e+ 000	1,070428e+ 000



	Name	RT	Area	Height	% Area	USP Plate Count	USP Resolution	USP Tailing
1	Darunavir	18,194	32250	4566	100,00	1,506227e+ 005		1,159846e+ 000

Рис. 1. Хроматограммы растворов ДРВ: а — испытуемого (~ 19,2 мкг ДРВ) и б — сравнения (~ 0,0192 мкг ДРВ).

В процессе валидации критерием пригодности по характеристике “Прецизионность” является величина относительного стандартного отклонения (*RSD*) площадей пиков ДРВ на хроматограммах растворов сравнения. Усреднённое значение этой величины не должно превышать 10 %.

Первый эксперимент проводился параллельно 2 исполнителями на протяжении 5 рабочих дней с использованием растворов сравнения, приготовленных из препарата 3 различных серий. Получены данные для оценки промежуточной прецизионности, приведенные в табл. 2.

На основании приведенных данных валидируемая методика может быть включена в монографию, поскольку выполнение неравенства  $RSD \leq 10\%$  для площадей пиков ДРВ на хроматограммах растворов сравнения подтвердил эксперимент. При реально найденном значении этого критерия ( $RSD < 5\%$ ) содержание

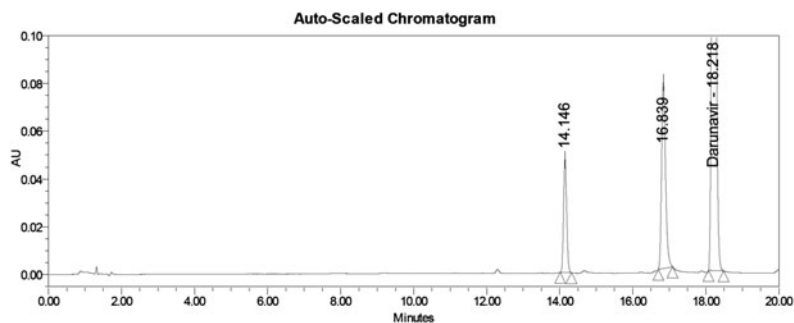
отдельной примеси, равное ~ 0,2 %, может определяться с  $RSD \leq 2,5\%$ , а равное ~ 0,05 % — с  $RSD \leq 10\%$ , если считать уровень “шума”, не превышающим 3 % от стандартного отклонения площади пика на хроматограммах раствора сравнения, полученных при проверке пригодности хроматографической системы.

Во втором эксперименте для одной серии таблеток ДРВ (0,5 г ДРВ в 1 г таблеточной массы) проведено 5 параллельных определений примесей. Найденные величины  $X_i$ , отвечающие условию  $X_i < 0,02\%$ , приведены в табл. 3.

Для суммарного содержания примесей  $\sum X_i$  в данном случае в качестве критерия пригодности методики принято условие:  $RSD \sum X_i$  не должно превышать 10 %.

Следовательно, методика определения примесей удовлетворяет необходимым требованиям по характе-





	Name	RT	Area	Height	% Area	USP Plate Count	USP Resolution	USP Tailing
1		14,146	280434	47348	7,95	1,294747e+ 005		1,124053e+ 000
2		16,839	587025	77879	16,64	1,181259e+ 005	1,494479e+ 000	
3	Darunavir	18,218	2659323	380420	75,40	1,556013e+ 005	7,104654e+ 000	1,142247e+ 000

Рис. 2. Хроматограмма раствора для проверки пригодности системы (~ 1,9 мкг в пересчете на массу исходного ДРВ).

ристике “Прецизионность” в целом и может быть включена в монографию.

**Раздел “Количественное определение”.** Для количественного определения ДРВ или ДРВ этанола в препарате предложено использовать метод УФ-спектрофотометрии [6, 7]. Данные представляют в пересчёте на ДРВ. На основании результатов валидации методика может быть введена в монографию в редакции:

*Раствор сравнения.* 25 мл буферного раствора pH 9,0 (1) (ГФ XIII, т. I, ОФС.1.3.0003.15, с. 1450) помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 400 мл метанола и перемешивают. После охлаждения до комнатной температуры объём раствора доводят метанолом до метки, перемешивают (срок годности раствора сравнения 7 сут).

*Испытуемый раствор.* Около 0,15 г (точная навеска) порошка таблеток, растёртых в агатовой ступке, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 70 мл раствора сравнения, полученную суспензию обрабатывают ультразвуком (5 мин), охлаждают до комнатной температуры, доводят её объём раствором сравнения до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Первую порцию фильтрата (~ 10 мл) отбрасывают.

2 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объём раствора раствором сравнения до метки, перемешивают (срок годности испытуемого раствора — 6 ч).

*Измерения.* Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре относительно раствора сравнения в максимуме поглощения при длине волны  $(267 \pm 2)$  нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Содержание  $C_{27}H_{37}N_3O_7S \cdot C_2H_5OH$  (ДРВ этанола) в таблетке в миллиграммах ( $X$ ) в пересчёте на  $C_{27}H_{37}N_3O_7S$  (ДРВ) и среднюю массу таблетки вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot m_c \cdot 1000}{A_{1cm}^{1\%} \cdot 2 \cdot a} = \frac{A \cdot m_c \cdot 50000}{A_{1cm}^{1\%} \cdot a},$$

где  $A$  — оптическая плотность испытуемого раствора;  $A_{1cm}^{1\%}$  — удельный показатель поглощения раствора дарунавира в среде раствора сравнения с pH ~ 9 ( $A_{1cm}^{1\%} = 392,6 \text{ см}^{-1}$ );  $a$  — навеска порошка растёртых таблеток, г;  $m_c$  — средняя масса таблетки, г.

Содержание  $C_{27}H_{37}N_3O_7S \cdot C_2H_5OH$  (ДРВ этанола) в таблетке ( $X$ , мг) в пересчёте на  $C_{27}H_{37}N_3O_7S$  (ДРВ) и среднюю массу таблетки должно быть в пределах  $\pm 5\%$  от номинального.

Таблица 2

**Величины RSD площадей пиков ДРВ на хроматограммах растворов сравнения**

День по порядку (серия). Исполнитель	Количество растворов		Число полученных хроматограмм для каждого раствора сравнения	RSD, %
	испытуемых	сравнения		
1 (1) Первый	1	2	3	4,8
2 (2) Второй	1	2	3	2,9
3 (3) Первый	1	2	3	5,1
4 (2) Первый	1	2	3	4,4
5 (3) Второй	1	2	3	3,6
Средняя величина RSD в % и её доверительный интервал — 95 % доверительная вероятность; число степеней свободы $(6 \cdot 5^{-4}) = 26$				4,2 ± 0,4

**Валидация.** Приведенная методика валидировалась по следующим характеристикам [3]: специфичность; аналитическая область; линейность; правильность; прецизионность.

Использование приведенной выше методики и её валидация требовали точного предварительного определения удельного показателя поглощения ДРВ, растворённого в среде, величина рН которой не допускает его протонирования. В такой среде при выбранной длине волны величина удельного показателя поглощения максимальна, даже если батохромный сдвиг рабочего максимума поглощения не наблюдается. Работа по определению величины удельного показателя поглощения растворов ДРВ проводилась по той же схеме, что и при её определении для растворов ДРВ в среде растворения [1]. Полученные в эксперименте данные представлены в табл. 4 и на рис. 3.

**Специфичность.** Методика валидировалась по этой характеристике в разделе “Подлинность” (рис. 1) [1]. Было найдено, что присутствие вспомогательных веществ не изменяет характер УФ-спектра раствора препарата в сравнении с УФ-спектром раствора АФС ДРВ этанолята, что является критерием пригодности методики по характеристике “Специфичность”.

*Аналитическая область, линейность, правильность, прецизионность*

На рис. 3 приведен график линейной зависимости оптической плотности ( $A$ ) растворов с известной концентрацией ДРВ ( $c$ , г/100 мл) в среде раствора сравнения с рН  $\sim 9$ . При этом с использованием МНК [4] в соответствии с табл. 4 найдено:  $A_{1\text{см}}^{1\%} = 392,58$  (рис. 3).

Табл. 3 и построенный на её основе график (рис. 3) обобщают результаты, полученные на протяжении 6 мес 4 разными исполнителями при работе на 2 разных спектрофотометрах, Cary 50 Scan UV-VIS (США) и Agilent 8453 UV-VIS (США), с использованием для приготовления модельных растворов 7 образцов ДРВ этанолята, полученных из 5 источников. Для точного расчёта концентрации спектрофотометрируемых растворов содержание ДРВ во всех образцах ДРВ этанолята предварительно определялось их титрованием по первичной ароматической аминогруппе, как указано в

разделе “Растворение” [1]. С учётом всех полученных данных значение углового коэффициента линейной зависимости  $A = A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot x + b$  методом МНК [4] было найдено равным  $392,59 \text{ см}^{-1}$ , её свободный член  $b$  статистически достоверно не отличался от нуля, коэффициент корреляции  $R$  равен  $0,99955$ , а доверительный интервал  $\Delta A_{1\text{см}}^{1\%}$  лежал в пределах  $\pm 2,4 \text{ см}^{-1}$  ( $\pm 0,6\%$  относительных) при степени надёжности  $\alpha$ , равной  $0,05$ .

Концентрация ДРВ в испытуемом растворе должна быть  $\approx 0,00192\%$ . Оптическая плотность такого раствора равна  $\approx 0,755$ . Таким образом, с учётом подтверждённой специфичности методики (рис. 1, [1]) её пригодность по характеристикам аналитическая область (графы 1, 2 табл. 3), правильность, прецизионность (графа 3 табл. 3) доказана. Методика может быть включена в монографии на препараты, содержащие ДРВ и ДРВ этанолят в качестве АФС.

На основании изложенного включение предлагаемых методик в монографии, регламентирующие качество содержащих ДРВ препаратов, позволяет полностью исключить необходимость использования СО при анализе таких препаратов.

В разделе “Посторонние примеси” для оценки чистоты препаратов ДРВ предложено использовать метод ВЭЖХ [5]. Проверку пригодности хроматографической системы проводят по величине разрешения между пиком ДРВ (основной пик) и ближайшим к нему пиком продукта гидролиза на хроматограммах раствора для проверки пригодности хроматографической системы. Эта величина должна быть  $\geq 2$ . Указанный раствор и раствор сравнения готовят непосредственно из испытуемого раствора, что исключает необходимость использования СО. Метод валидирован.

В разделе “Подлинность” [1] предложено использовать спектрофотометрическое подтверждение наличия ДРВ в препарате. В разделах “Растворение” [1] и “Количественное определение” также применён спектрофотометрический метод — при вычислении концентраций испытуемых растворов соответственно использованы разные значения удельных показателей поглощения ДРВ:  $A_{1\text{см}}^{1\%} = 359,6$  и  $A_{1\text{см}}^{1\%} = 392,6$ . Они соответствуют величинам рН испытуемых растворов в тесте “Растворение” рН  $\approx 3$ , в тестах “Подлинность” и “Количественное определение” рН  $\approx 9$ .

Надо отметить, что использование СО при спектрофотометрическом определении подлинности известных веществ нерационально, т.к. характеристические значения абсцисс экстремумов в соответствующих электронных и колебательных спектрах имеют фиксированные значения при соблюдении предписанных условий эксперимента [6, 7]. При этом отказ от использования СО минимум в 2 раза сокращает продолжительность и заметно повышает точность анализа: величина  $RSD$  результата отдельного определения не превышает  $2\%$ .

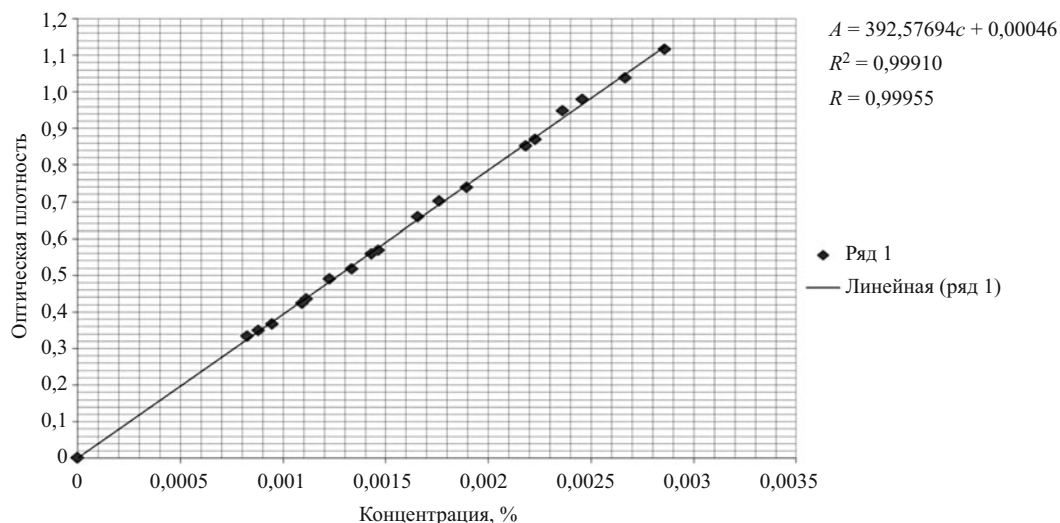
Результаты, полученные при разработке методики количественного определения ДРВ, подтверждают, что в ОФС [6] имеются очевидные ошибки, перечис-

Таблица 3

**Проверка промежуточной прецизионности**

Определение	Найденные значения $X_i$ , %				Сумма примесей ( $\Sigma X_i$ ), %
	$i = 1$	$i = 2$	$i = 3$	$i = 4$	
1	0,12	0,12	0,06	0,06	0,36
2	0,11	0,13	0,06	0,07	0,37
3	0,10	0,14	0,05	0,05	0,34
4	0,13	0,14	0,07	0,06	0,40
5	0,11	0,12	0,06	0,07	0,36
Среднее	0,114	0,130	0,060	0,062	0,37
$RSD$ , %	10,00	7,69	11,78	13,50	5,97

Примечания. Определения 1 – 3 и 4, 5 выполнялись в разные дни и разными исполнителями. Использовались таблетки, покрытые оболочкой, производства ООО “Технология лекарств”, содержащие аморфный ДРВ.



**Рис. 3.** График линейной функции  $A = f(c)$ . Удельный показатель поглощения ДРВ  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  в максимуме при 268 нм рассчитан МНК. Найдено:  $A_{1\text{см}}^{1\%} = 392,58$ ; коэффициент корреляции  $R = 0,99955$ . Среда — раствор сравнения, т.е. метанол, содержащий 5 об. % буферного раствора pH 9,0 (первый раствор по ГФ XIII, ОФС.1.3.0003.15).

ленные ранее [1]. Её следует привести в соответствие с ОФС “Определения, основанные на измерении поглощения света”, включённой в ГФ СССР X издания (1968 г.) [7]. В последней указано, что при использовании известного значения удельного показателя поглощения относительная ошибка спектрофотометрических определений концентрации индивидуальных соединений  $\leq 2\%$ . В настоящее время, спустя 50 лет, благодаря улучшению качества используемых приборов и оборудования, эта величина редко превышает 1% (табл. 4). Несмотря на это, в ОФС [7] бездоказа-

тельно утверждается, что использование значений удельных показателей поглощения при количественных определениях приводит к получению результатов с относительной ошибкой  $\sim 10\%$ .

Полученные в данной работе результаты подтверждают необходимость прекращения в РФ практики целенаправленного лоббирования применения дорогостоящих импортных СО при разработке нормативных документов, регламентирующих качество фармацевтических продуктов. Такая практика не только антима-

Таблица 4

Данные эксперимента (с и А) по изучению зависимости  $A = f(c)$  для растворов ДРВ

Концентрация ДРВ (с), г/100 мл или %	Оптическая плотность (А)	Единичное. значение $A_{1\text{см}}^{1\%}$	№ лота	Исполнитель (1, 2, 3 или 4)	Производитель ДРВ
0	0	-	-	-	-
0,001464	0,569	385,25	629	1	Nanjing
0,001114	0,436	391,30	694	1	Sicemo
0,002227	0,869	390,21	694	2	Sicemo
0,0008278	0,333	402,27	694	3	Sicemo
0,001656	0,659	397,95	694	4	Sicemo
0,002362	0,948	401,30	745	4	Mylan
0,001091	0,423	397,70	804	3	Laurus
0,002182	0,851	390,00	804	3	Laurus
0,001430	0,558	390,21	909	4	Mylan
0,002860	1,115	389,86	909	3	Mylan
0,001334	0,517	387,50	975	3	Mylan
0,002668	1,037	388,60	975	3	Mylan
0,0009482	0,367	388,69	975	1	Mylan
0,001896	0,738	389,24	975	1	Mylan
0,001228	0,489	398,20	1007	2	ИИХР*
0,002457	0,979	398,45	1007	3	ИИХР
0,0008816	0,349	395,87	1007	4	ИИХР
0,001763	0,702	398,18	1007	4	ИИХР

$A_{1\text{см}}^{1\%}$  среднее =  $393,37 \pm 2,4$  (со степенью надёжности  $\alpha$ , равной 0,05);  $RSD = \pm 0,6\%$

\* АО “Исследовательский институт химического разнообразия” (Химки).

учна, она вредна экономически и подрывает лекарственную безопасность страны.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. С. Гойзман, А. А. Корлюков, К. Ю. Супоницкий, Н. Л. Шимановский и др., *Хим-фарм. журн.*, **51**(11), 45 – 52 (2017); *Pharm. Chem. J.*, **51**(11), 1030 – 1036 (2017).
2. М. С. Гойзман, А. А. Корлюков, К. Ю. Супоницкий, Н. Л. Шимановский и др. *Хим-фарм. журн.*, **50**(6), 45 – 51 (2016); *Pharm. Chem. J.*, **50**(6), 413 – 418 (2016).
3. *Государственная Фармакопея России*, XIII изд., (ГФ XIII), Москва (2015), ОФС. 1.1.0012.15. “Валидация аналитических методик”, т. I, с. 222.
4. ГФ XIII, ОФС. 1.1.0013.15. “Статистическая обработка результатов химического эксперимента”, т. I, Москва (2015), с. 235.
5. ГФ XIII, ОФС. 1.2.1.2.0005.15 “Высокоэффективная жидкостная хроматография”, т. I, Москва (2015), с. 496.
6. ГФ XIII, ОФС. 1.2.1.1.0003.15. “Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях”, т. I, Москва (2015), с. 370.
7. ГФ СССР X, ОФС “Определения, основанные на измерении поглощения света”, Медицина, Москва (1968), с. 778.

Поступила 15.02.18

## METHODS FOR ANALYTICAL CONTROL OF DARUNAVIR MEDICINAL FORMS: PART II

M. S. Goizman<sup>1</sup>, N. L. Shimanovskii<sup>2\*</sup>, D. L. Shobolov<sup>1</sup>, A. O. Zotova<sup>1</sup>, O. S. Ermakova<sup>1</sup>, G. B. Tikhomirova<sup>1</sup>, and M. G. Chernobrovkin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Drug Technology Co., Khimki, Moscow oblast, 141400 Russia

<sup>2</sup> Department of Molecular Pharmacology and Radiobiology, N.I. Pirogov National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

\* e-mail: shimannn@yandex.ru

It was previously shown that purposeful development of special analytical methods to be included into pharmacopoeial monographs on the quality of darunavir (DRV) preparations allows eliminating the use of expensive imported standard sample (SS) for the drug analysis. These methods and their validation are described in Part I of the present work for monograph sections “Authenticity,” “Talc, Silica, Titania” and “Dissolution.” The present article continues with considering methods not requiring using SS for monographs on “Foreign Impurities” and “Quantitative Determination.” It is proposed to analyze foreign impurities by HPLC in the gradient elution mode. Lower limit of separate impurity content relative to DRV is recommended to be 0.02%, and the relative error of the total content of impurities must not exceed RSD = 10%. The “Quantitative Determination” section proposes the DRV concentration to be determined by direct UV spectrophotometry of analyt solution at pH ~ 9 using the experimentally measured specific absorbance  $\varepsilon$  of the spectral peak at 267 nm. The established value of  $\varepsilon = 393.4 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$  (RSD < 1% at confidence level of  $\alpha = 0.05$ ) is a physicochemical constant. Its use provides a relative error below 1% and ensures up to three-fold reduction in the time of analysis because there is no need in preparing SS solutions and measuring their optical density.

**Keywords:** pharmacopoeial monograph; darunavir; darunavir ethanolate; amorphous darunavir; standard sample; gas-liquid chromatography; impurities; specific absorbance; active pharmaceutical substance; UV spectrophotometry; validation of method.