



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544: 615.074

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11867

Определение родственных примесей субстанции диоксидина хроматографическими методами

Надежда Александровна Образцова[✉],

Алексей Алексеевич Самсонов, Валентин Сергеевич Бережной,

Варвара Николаевна Шмелева, Наталья Александровна Голубева

АО «Валента Фарм» Россия, Щелково, Московская область, Россия,

Nadezhda.Obraztsova@valentapharm.com[✉]

Аннотация. При разработке методов анализа активных фармацевтических субстанций (АФС) необходимо учитывать современные требования к содержанию в них примесей. При этом для некоторых лекарственных средств (ЛС), длительное время присутствующих на фармацевтическом рынке, по-прежнему применяются методы анализа, которые неспособны обеспечить необходимую чувствительность и специфичность. Одной из таких АФС является 2,3-бис(гидроксиэтил)хиноксалин-1,4-диоксид (диоксидин), который обладает высокой бактерицидной активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов. В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания (ГФ РФ) для анализа его родственных примесей используется тонкослойная хроматография (ТСХ). Однако, этот метод является полуколичественным и относительным. Цель данной работы – определение примесей в субстанции диоксидина с использованием методов высокоэффективной жидкостной и тонкослойной хроматографии. В соответствии с требованиями монографии ГФ РФ в АФС оценивается суммарное содержание всех примесей и отдельно определяется только содержание хиноксидина, который зачастую отсутствует в субстанции. При помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) были впервые обнаружены три типичные родственные примеси диоксидина. Далее мы подобрали условия для их обнаружения методом ТСХ. Смеси метанол/ацетонитрил (75/25) и дихлорметан/ацетонитрил (50/50) являлись наиболее подходящими в качестве растворителя для примесей и подвижной фазы для ТСХ соответственно. В подобранных условиях наблюдалось удовлетворительное разделение хроматографических зон всех четырех примесей и субстанции диоксидина. Соответствующие зоны хорошо различимы при концентрации веществ 1%. Однако уменьшение их концентрации до требуемых 0.1% приводит к затруднению визуального фиксирования примесей. Таким образом, при варьировании условий ТСХ не удалось получить достоверные данные о содержании родственных примесей, что связано с ограничениями самого метода. Напротив, анализ субстанций диоксидина методом ВЭЖХ позволяет достаточно точно количественно определять отдельные родственные примеси.

Ключевые слова: родственные примеси диоксидина, тонкослойная хроматография, хиноксидин, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Для цитирования: Образцова Н.А., Самсонов А.А., Бережной В.С., Шмелева В.Н., Голубева Н.А. Определение родственных примесей субстанции диоксидина хроматографическими методами // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 6. С. 1060-1068. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11867>

Original article

Optimization of the thin layer chromatography method conditions for the detection of related dioxidine impurities

Nadezhda A. Obraztsova[✉], Aleksey A. Samsonov, Valentin S. Berezhnoy,

Varvara N. Shmeleva, Natalia A. Golubeva

Valenta Pharm, Shchelkovo, Moscow region, Russia, Nadezhda.Obraztsova@valentapharm.com[✉]



Abstract. When developing methods for analysing active pharmaceutical substances (API), it is necessary to take into account modern requirements for the content of impurities in them. At the same time, for some drugs that have been on the pharmaceutical market for a long time, analysis methods are still used that are unable to provide the necessary sensitivity and specificity. One of these API is 2,3-bis(hydroxymethyl)quinoxaline-1,4-dioxide (dioxidin), which has high bactericidal activity against a wide range of microorganisms. According to the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV edition, related impurities of this API are analysed by thin layer chromatography (TLC). However, this method is semi-quantitative and relative. The purpose of this work is to determination of impurities in the dioxidine substance using high-performance liquid and thin-layer chromatography methods. In accordance with the requirements of the monograph of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, the total content of all impurities in the API is assessed and only the content of quinoxidine is determined separately, which is often absent from the substance. For the first time, three typical dioxidine related impurities were revealed using HPLC. Next, we selected the optimal conditions for their detection by TLC. Methanol/acetonitrile (75/25) and dichloromethane/acetonitrile (50/50) mixtures were the most suitable as a solvent for impurities and the TLC elution system, respectively. Under the selected conditions, satisfactory separation of the chromatographic zones of all four impurities and the dioxidine substance was observed. The corresponding zones were clearly visible at a substance concentration of 1%. However, reducing their concentration to the required 0.1% made it difficult to visually detect impurities. Thus, even when optimizing TLC conditions, it is impossible to obtain reliable data on the content of related impurities, which is due to the limitations of the method. On the contrary, the analysis of dioxidine substances by HPLC allows fairly accurate quantitative determination of individual related impurities.

Keywords: related impurities of dioxidine, thin layer chromatography, quinoxidine, high performance liquid chromatography.

For citation: Obraztsova N.A., Samsonov A.A., Berezhnoy V.S., Shmeleva V.N., Golubeva N.A. Optimization of the thin layer chromatography method conditions for the detection of related dioxidine impurities. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(6): 1060-1068. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11867>

Введение

Одним из ключевых вопросов современной фармации является профилирование примесей. Развитие технологий и методов исследования способствует увеличению специфичности, точности и воспроизводимости анализа веществ. Это, в свою очередь, позволяет обнаруживать и идентифицировать новые примеси в используемых активных фармацевтических субстанциях (АФС). При этом формируются предпосылки к пересмотру ранее утвержденных методов анализа и требований к чистоте АФС.

Стоит заметить, что для ряда веществ, давно присутствующих на фармацевтическом рынке, методы анализа были утверждены до того, как были приняты современные требования к безопасности лекарственных средств (ЛС). Так, например, подходы к анализу гепарина были значительно изменены после многочисленных летальных случаев в 2008 году, связанных с присутствием в нем примеси гипертсульфатированного хондроитин

сульфата [1]. Методы оценки чистоты гепарина (тесты оптического вращения и зонный электрофорез), применяемые в соответствии с фармакопейными требованиями, не позволяли объективно установить присутствие этой примеси [2]. В результате на рынок были выпущены ЛС фальсифицированного гепарина. После проведенных исследований для идентификации примесей гепарина стал применяться метод анионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и ¹H-ЯМР спектроскопии.

По мнению авторов работы [3], методы тонкослойной хроматографии (ТСХ) и аминокислотного анализа, которые в соответствии с фармакопейными требованиями применяются для анализа АФС, содержащих аминокислоты или их производные, не дают корректной информации для определения родственных примесей. Одним из примеров является инцидент с примесями триптофана, которые вызывают синдром эозинофильной миалгии [4]. Такие примеси были определены при помощи многоступенчатой

масс-спектрометрии (МС-МС), совмещенной с жидкостной хроматографией (ЖХ). Соответствующие изменения были внесены в Европейскую фармакопею (ЕФ) 9.0 для оценки чистоты субстанции триптофана.

Стоит отметить, что к ЛС, направляемым на фармэкспертизу, применяют современные требования по содержанию родственных примесей в зависимости от их токсичности и максимальной суточной дозы препарата. Соответственно, методы анализа таких веществ должны давать достоверную информацию о количественном содержании известных примесей и позволять своевременно фиксировать новые. В то же время для ЛС, зарегистрированных уже длительное время, применяются методы анализа, которые, согласно современным фармацевтическим стандартам, не обеспечивают требуемую чувствительность и специфичность. Так, например, для цефрадина, антибиотика полусинтетического происхождения, основной примесью является цефалексин [5]. Его количественное содержание определяли методом ВЭЖХ и оно должно было составлять не более 5.0%. В то же время для анализа остальных родственных примесей цефрадина долгое время применялся метод ТСХ, рекомендованный ЕФ. При этом определялось только их общее содержание, которое не должно было превышать 1.0%. В ряде работ [6, 7] исследователи отмечали низкую чувствительность и воспроизводимость метода ТСХ при анализе примесей цефрадина. В качестве альтернативы для анализа родственных примесей был предложен метод ВЭЖХ, который превосходит ТСХ по чувствительности, воспроизводимости и простоте пробоподготовки [8, 9]. Интересно, что ни один из шести препаратов цефрадина, проанализированных методом ВЭЖХ, не соответствовал фармакопейным требованиям. В монографии цефрадина ЕФ 5.4 метод ТСХ для анализа родственных примесей

был заменен на ВЭЖХ с градиентным режимом. Список примесей был расширен до девяти, и содержание каждой из них ограничено 0.25%.

Для гидрохлорида ципрогептадина характерно появление дополнительных пятен при анализе на родственные примеси методом ТСХ [10]. Было установлено [11], что это связано с разложением анализируемого вещества и образованием аддукта ципрогептадина и дихлорметана. Природу побочных продуктов определили с использованием ЖХ/МС и ¹H-ЯМР спектроскопии. Появление дополнительных пятен приводило к ложноотрицательным результатам. Таким образом метод ТСХ в данном случае являлся неподходящим и в ЕФ 6.5 он был заменен на ВЭЖХ, в которой не требуется применение дихлорметана.

Метод анализа родственных примесей был изменен для многих веществ, среди них лоразепам [12], диазепам [13], триамтерен [14], дапсон [15], тропикамид [16]. В приведенных выше примерах исследователи отмечали, что ВЭЖХ позволяет достаточно точно количественно определять отдельные примеси. В то время как применение ТСХ дает возможность только оценить содержание примесей по визуальному сравнению их зон адсорбции с зонами эталонных растворов известной концентрации. Метод ТСХ является относительным и зависит от многих факторов, в том числе от субъективного восприятия размера и насыщенности пятна.

Для некоторых АФС по-прежнему в качестве анализа на родственные примеси в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XV издания (ГФ РФ) требуется использование метода ТСХ [17]. Одной из таких субстанций является гидроксиметилхиноксалиндиоксид (диоксидин), который обладает высокой бактерицидной активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов.

Таблица 1. Состав и полярность элюирующих систем, примененных в ТСХ
Table 1. Composition and polarity of elution systems used in TLC

Элюирующая система	Соотношение компонентов системы	Полярность
C_3H_7OH/C_6H_{14}	70/30	3.0
$CHCl_3/C_2H_5OH$	95/5	4.4
$CHCl_3/C_4H_8O_2$	90/10	4.4
$CHCl_3/CH_3OH$	95/5	4.5
CH_2Cl_2/CH_3CN	60/40; 50/50; 40/60; 20/80	4.5; 4.8; 5.1; 5.6
$CH_3CN/CH_3OH/H_2O$	50/40/10	6.6
CH_3CN/H_2O	90/10; 80/20; 50/50	6.5; 6.8; 7.6

Цель данной работы – определение примесей в субстанции диоксидина с использованием методов высокоэффективной жидкостной и тонкослойной хроматографии.

Экспериментальная часть

В качестве элюентов и растворителей в работе использовали: хлороформ ($CHCl_3$), дихлорметан (CH_2Cl_2), метанол (CH_3OH), этанол (C_2H_5OH), 2-пропанол (C_3H_7OH), ацетонитрил (CH_3CN), вода, н-гексан (C_6H_{14}), этилацетат ($C_4H_8O_2$). Применяемые в работе реактивы имели класс чистоты «для ВЭЖХ» или осч. производства Sigma Aldrich (США) и Криохром (Россия). Диоксидин и стандартный образец хиноксидина (примесь А) производства ОАО «Усолъе-Сибирский химфармзавод», Россия. Примеси В, С и D были выделены из субстанции диоксидина при помощи препаративной хроматографии (на хроматографе Waters, США) и охарактеризованы как типичные примеси АФС.

ТСХ проводили на пластинах Silicagel 60 F254 с флуоресцентным индикатором размером 20x20 см (Merck, Германия) на алюминиевой подложке, предварительно активированные нагревом в течении 60 мин при 105°C в сушильном шкафу. Растворы образцов готовили в смеси метанол/ацетонитрил (75/25 об.) и наносили на стартовую линию хроматографической пластинки микрошприцами (Hamilton, США) объемом 10 и 100 мкл. Затем пластинку высушивали на воздухе и помещали в камеру, предварительно насыщенную парами подвижной фазы (ПФ). В качестве ПФ использовали смеси

растворителей в различном соотношении (табл. 1). После поднятия фронта ПФ на 80-90% высоты пластинки от линии старта, ее вынимали и сушили на воздухе в течение 10 мин. Детектирование анализов осуществляли, просматривая пластинки в камере при облучении УФ светом ($\lambda=254$ нм). Концентрация раствора диоксидина составляла 5 мг/см³, примесей 0.5 мг/см³. Растворы для проверки пригодности хроматографической системы (ППХС) имели концентрацию 0.1 и 0.2% по отношению к анализируемой субстанции.

Для количественной оценки содержания родственных примесей диоксидина был проведен анализ ВЭЖХ на хроматографе Waters Alliance (США) со спектрофотометрическим детектором при $\lambda=242$ нм. Разделение проводили на колонке «Hydrosphere C18», 3 мкм, 150x4.6 мм, УМС (Япония). ПФ состояла из раствора фосфорной кислоты 0.1% (А) и ацетонитрила (В). Хроматографический анализ проводили в градиентном режиме (соотношение элюентов А:В от 95:5 до 60:40); скорость потока 1.0 см³/мин; температура колонки 30°C; объем вводимой пробы 5 мкл. Растворитель представляет собой смесь фосфорной кислоты (0.1%)/ацетонитрила (95/5), концентрация испытуемого раствора 0.25 мг/см³.

Обсуждение результатов

Метод ТСХ имеет значительные ограничения при анализе родственных примесей: низкая специфичность и чувствительность, невозможность объективной

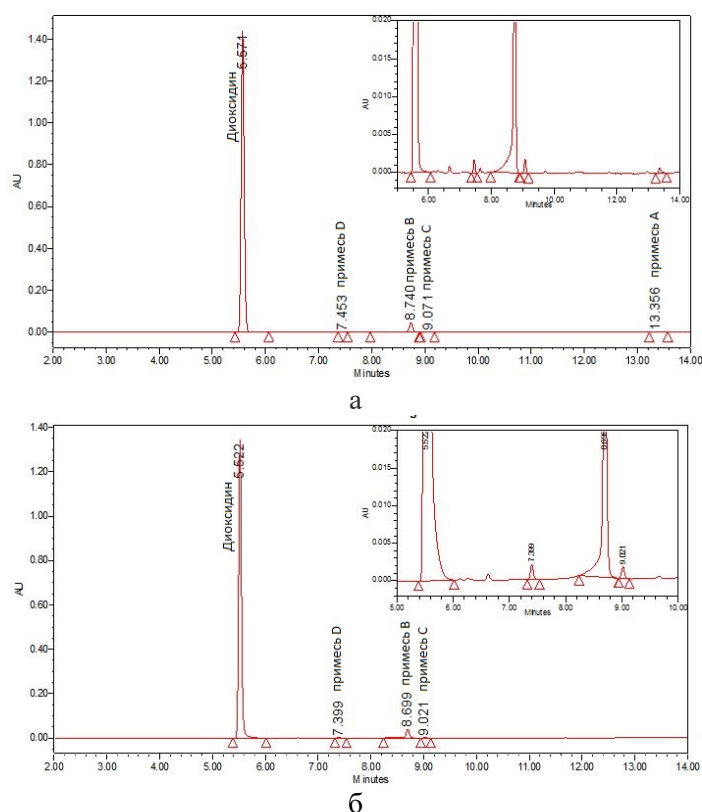


Рис. 1. Хроматограммы, полученные методом ВЭЖХ, для субстанций диоксидина I (а) и II (б).

Fig. 1. Chromatograms obtained by HPLC for dioxidine substances I (a) and II (b).

количественной оценки вещества. Поэтому для разделения и количественного определения примесей диоксидина использовали метод ВЭЖХ как более информативный. Сначала в статье будет приведено описание результатов, полученных с применением ЖХ, затем будут представлены данные ТСХ.

Метод ВЭЖХ. Метод ВЭЖХ применяется для определения диоксидина в биологических жидкостях и тканях [18, 19]. Однако анализ примесей не являлся целью этих исследований. В патенте [20] авторы указывают на присутствие дополнительных родственных примесей помимо хиноксидина. В нашей работе выделены три новые родственные примеси (В, С, D) диоксидина.

На рисунке 1а приведена хроматограмма субстанции I. На ней присутствуют пики диоксидина и его четырех родственных примесей. Пик в области 13.35 мин соответствует примеси А. Хиноксидин является исходным веществом,

из которого посредством гидролиза получают диоксидин. Стоит отметить, что хиноксидин легко гидролизуется, поэтому примесь А присутствует в незначительном количестве или часто полностью отсутствует на хроматограммах. Так, например, в субстанции II, которая длительное время (3 года) хранилась в защищенном от света месте с доступом влаги воздуха, пик, соответствующий примеси А, отсутствует. При этом в анализируемых субстанциях содержание примесей В, С и D близкое и составляет 2.46, 0.14, 0.06% для субстанции I, и 2.21, 0.13, 0.08% для субстанции II. Было установлено, что примеси В и D образуются из диоксидина в результате окислительно-восстановительных реакций. Вероятно, примесь В представляет собой описанный в литературе полуацеталь диоксидина [21]. В то время как, примесь С является промежуточным продуктом реакции при синтезе диоксидина из хиноксидина.

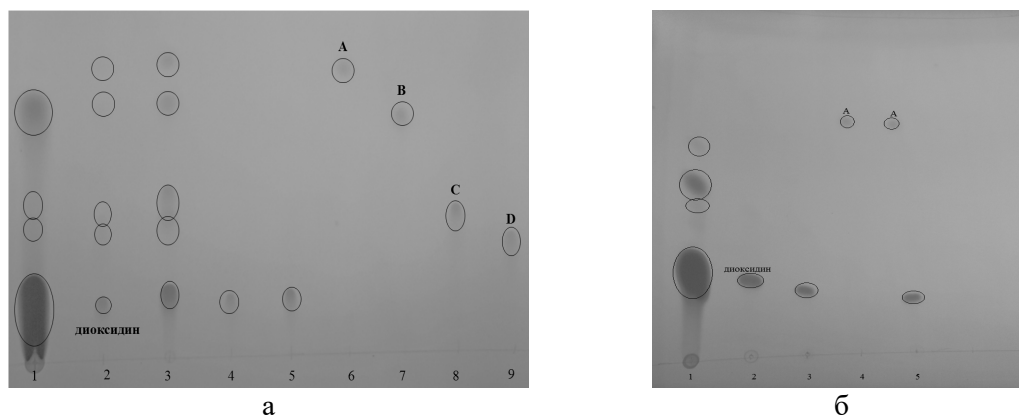


Рис. 2. Хроматограммы субстанции диоксилина II, полученные методом ТСХ в подобранных нами условиях (а) и описанных в ГФ РФ (б). (2 а) Концентрации веществ: 1, 4, 5 – субстанция 500 мкг, 0.5 мкг (0.1%) и 1 мкг (0.2%) соответственно; 2 и 3 – раствор ППХС, 0.5 мкг и 5 мкг (0.1 и 1% соответственно); 6, 7, 8, 9 – примеси А, В, С, D 5 мкг (1%). (2 б) Концентрации веществ: 1, 2, 3 – субстанция 500 мкг, 5 мкг (1%) и 2 мкг (0.4%) соответственно; 4 – примесь А 1 мкг (0.2%); 5 – раствор ППХС, 1 мкг хиноксидина и 2 мкг субстанции (0.2 и 0.4% соответственно).

Fig. 2. Chromatograms of the dioxidine II substance, obtained by TLC under the conditions selected by us (a) and described in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (b). (2 a) Substance concentrations: 1, 4, 5 – substance 500 µg, 0.5 µg (0.1%) and 1 µg (0.2%) respectively; 2 and 3 – SST solution, 0.5 µg and 5 µg (0.1 and 1%, respectively); 6, 7, 8, 9 – A, B, C, D impurities, 5 µg (1%). (2 b) Substance concentrations: 1, 2, 3 – substance 500 µg, 5 µg (1%) and 2 µg (0.4%), respectively; 4 – impurity A 1 µg (0.2%); 5 – SST solution, 1 µg of quinoxidine and 2 µg of the substance (0.2 and 0.4%, respectively).

Метод ТСХ. Одной из задач было подобрать условия проведения ТСХ таким образом, чтобы получить информацию о содержании каждой примеси диоксилина по отдельности. При этом анализ субстанции в соответствии с требованиями ГФ РФ дает данные о суммарном содержании примесей и позволяет отдельно оценить только примесь А. В качестве среды растворения для примесей нами были проанализированы отдельные растворители и их смеси. При этом учитывали, что примеси плохо растворимы в воде. Кроме того, в водном растворе диоксилина содержание примесей В и D растет значительно быстрее по сравнению с неводными средами. Поэтому применение воды при работе с диоксилином было ограничено. В качестве растворителя для примесей была выбрана смесь метанол/ацетонитрил (75/25). В работе были исследованы более 10 элюирующих систем с различным значением полярности,

определенной с применением индекса полярности Снайдера (табл. 1). Наиболее подходящей элюирующей системой была смесь дихлорметан/ацетонитрил (50/50). На рисунке 2а приведены результаты ТСХ для субстанции II диоксилина, полученные в условиях, которые были выбраны как наиболее предпочтительные для обнаружения всех родственных примесей данной АФС. Раствор для ППХС был получен смешиванием индивидуальных растворов диоксилина и его четырех родственных примесей. Для раствора ППХС с концентрацией 1% в подобранных условиях наблюдается удовлетворительное разделение хроматографических зон всех четырех примесей и самой субстанции диоксилина (3, рис. 2а). Однако визуальное фиксирование примесей при уменьшении их концентрации до 0.1% осложнено нечетким и размытым контуром их зон сорбции (2, рис. 2а). Стоит отметить, что зоны сорбции инди-

видуальных примесей С и D расположены близко и имеют небольшой «шлейф» (8, 9 рис. 2а). В результате хроматографического анализа субстанции II на пластине наблюдаются пятна трех примесей. Поскольку зоны сорбции С и D частично перекрываются, не представляется возможным однозначно установить присутствие примеси D, содержание которой составляет 0.08% (данные ВЭЖХ), что меньше предела визуального фиксирования. В тоже время в данной субстанции содержание примеси В составляет 2.21% (данные ВЭЖХ), что выше допустимых значений для суммарной концентрации примесей в соответствии с требованиями ГФ РФ (не более 1%). Установить такое значительное превышение содержания примеси В по яркости его пятна не представляется возможным. Следовательно, метод ТСХ не подходит для контроля содержания примесей субстанции диоксидина.

Для субстанции II диоксидина приведена также хроматограмма (рис. 2б), полученная по методике, описанной в ГФ РФ. Раствор ППХС (концентрация 0.2%) в данном случае представляет собой смесь индивидуальных растворов субстанции и примеси А. В соответствии с требованиями, приведенными в фармакопее, можно только оценить суммарное содержание всех примесей диоксидина по совокупности величины и интенсивности окраски зон. Однако, такая оценка является относительной и зависит от многих факторов (освещенности, квалификации исследователя и т.п.). При этом видно, что на хроматограмме субстанции присутствуют 3 хроматографические зоны, которые, вероятно, соответствуют её примесям, зона самой субстанции сильно размыта.

Список литературы/References

1. Szajek A.Y., Chess E., Johansen K., Gratzl G., Gray E., Keire D., Al-Hakim A. The US regulatory and pharmacopeia response to the global heparin contamination

Заключение

Таким образом, варьирование условий метода ТСХ не позволяет получить данные необходимые для объективной оценки качества субстанции и её безопасности, что связано с ограничениями самого метода. Напротив, метод ВЭЖХ делает возможным количественное определение отдельных родственных примесей в субстанции диоксидина даже при их низком содержании.

Определение содержания примесей является важным этапом в оценке качества АФС, поскольку их потенциальный вклад в побочные эффекты ЛС достаточно велик. При этом профиль примесей ЛС зависит от многих факторов: пути синтеза, происхождения и чистоты исходных материалов и реагентов, метода очистки и условий хранения. Различные примеси могут возникать из-за изменения этих параметров. Поэтому используемые методы анализа должны обеспечивать специфичность, точность и воспроизводимость необходимые для контроля содержания уже известных примесей и своевременного обнаружения новых. Пересмотр и актуализация методов анализа АФС с внесением соответствующих изменений в фармакопею должен быть своевременным и систематическим.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

crisis. *Nat. biotechnol.* 2016; 34(6): 625-630. <https://doi.org/10.1038/nbt.3606>

2. Volpi N., Maccari F., Suwan J., Linhardt R.J. Electrophoresis for the analysis of heparin purity and quality. *Electrophoresis.*



- 2012; 33(11): 1531-1537. <https://doi.org/10.1002/elps.201100479>
3. Wahl O., Holzgrabe U. Amino acid analysis for pharmacopoeial purposes. *Talanta*. 2016; 154: 150-163. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.071>
4. Kamb M.L., Murphy J.J., Jones J.L., Caston J.C., Nederlof K., Horney L.F., Swygert L.A., Falk H., Kilbourne E.M. Eosinophilia-myalgiasyndrome in l-tryptophan-exposed patients. *Jama*. 1992; 267: 77-82.
5. Hyun M.H., Jeong E.D., Shin M.S., Jin J.S. A comparison of analytical methods for the content and purity of cefradine. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2008; 29(6): 1185-1189. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2008.29.6.1185>
6. Hendrix C., Roets E., Bervoets V.R., Thomas J., Pijcke M., Busson R., Hoogmartens J. Synthesis of potential impurities of cefalexin and cefradine. *Archiv der pharma.* 1994; 327(4): 215-219. <https://doi.org/10.1002/ardp.19943270405>
7. Crombez E., Bens G.A., Van der Weken G., Van den Bossche W., De Moerloose P. Application of thin layer and high performance liquid chromatography to the separation and determination of cephalixin in cephradine, in bulk powder and in pharmaceuticals. *Chromatographia*. 1978; 11(11): 653-657. <https://doi.org/10.1007/BF02269000>
8. Yongxin Z., Hendrix C., Busson R., Janssen G., Roets E., Hoogmartens J. Isolation and structural elucidation of an impurity of cefradine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1994; 12(9): 1137-1140. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(94\)00042-5](https://doi.org/10.1016/0731-7085(94)00042-5)
9. Hendrix C., Yongxin Z., Pijcke M., Roets E., Hoogmartens J. A comparative study of LC methods for analysis of cefradine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993; 11(7): 595-599. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(93\)80010-X](https://doi.org/10.1016/0731-7085(93)80010-X)
10. Beckett A.H., Ali H.M. Artifacts produced by using dichloromethane in the extraction and storage of some antihistaminic drugs. *J. Chromatogr. A*. 1979; 177(2): 255-262. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)96321-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)96321-6)
11. Li M., Ahuja E.S., Watkins D.M. LC-MS and NMR determination of a dichloromethane artifact adduct, cyproheptadine chloromethochloride. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 31(1): 29-38. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00599-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00599-X)
12. Zhu S., Jiang J., Liu Y., Zou W., Hu P., Lu Y., Structural identification of the related substances of lorazepam tablets by LC-MS. *J. China Pharm. Univ.* 2021: 555-565.
13. Jatoi W.B., Shar G.Q., Makheja P.M. Scope of harmonization of pharmacopoeial liquid chromatography (LC) methods for diazepam and its related substances. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* 2015; 16(1): 6-9.
14. Bonfilio R., De Araujo M.B., Salgado H. R. N. Recent applications of analytical techniques for quantitative pharmaceutical analysis: a review. *WSEAS Trans. Biol. Biomed.* 2010; 7(4): 316-338.
15. Leistner A., Holzgrabe U. Impurity profiling of dapsone using gradient HPLC method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2021; 198: 113982. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113982>
16. Stefanowicz Z., Stefanowicz J., Mulas K. Determination of tropicamide and its major impurity in raw material by the HPLC-DAD analysis and identification of this impurity using the off-line HPLC-FT-IR coupling. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009; 49(2): 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.10.024>
17. Golubitckiy G.B., Kulikov A.L. Khromatograficheskie svojstva Arbidola i kolichestvennoe opredelenie ego primesej metodom obrashchenno-fazovoj vysokojefektivnoj zhidkostnoj khromatografii, *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2019; 12(6): 981-988. (In Russ.)
18. Temenchuk K.P., Dvoryantsyeva G.G., Musatova I.S., Elina A.S. Photochemical reactions of 2, 3-bis (hydroxymethyl) quinoxaline 1, 4-di-N-oxide (dioksidin). *Pharm. Chem. J.* 1984. Vol. 18(12), pp. 848-853. <https://doi.org/10.1007/BF00768342>.
19. Budanova L.I., Vigdorichik M.M., Elina A.S., Kuzovkin V.A., Musatova I.S.,



Padeiskaya E.N., Sokolov S.D. Investigation of the metabolism of dioxidin. *Pharm. Chem. J.* 1980; 14(1): 4-9.

20. Morgunina L.V., Volodina T.V. Patent RF, № 2 517 761 C1, 2014.

21. Temenchuk K.P., Dvoryantseva G.G., Musatova I.S., Elina A.S. Investigation of the kinetics of the redox reactions of dioxidine. *Pharm. Chem. J.* 1984; 18(5): 340-345. <https://doi.org/10.1007/BF00766670>

Информация об авторах / Information about the authors

Н.А. Образцова – к.х.н., научный сотрудник, АО «Валента Фарм», Щелково, Россия

А.А. Самсонов – главный научный сотрудник, АО «Валента Фарм», Щелково, Россия

В.С. Бережной – младший научный сотрудник АО «Валента Фарм», Щелково, Россия

В.Н. Шмелева –руководитель управления по исследованиям и разработкам, АО «Валента Фарм», Щелково, Россия

Н.А. Голубева –директор по НИОКР, АО «Валента Фарм», Щелково, Россия

N.A. Obratsova– Ph.D (chemistry), JSC "Valenta Pharm", researcher, Shchelkovo, Moscow region, Russia, e-mail:Nadezhda.Obratsova@valentapharm.com; ORCID: 0000-0002-3239-9613

A.A. Samsonov – JSC "Valenta Pharm", chief researcher, Shchelkovo, Moscow region, Russia, e-mail:aleksey.samsonov@valentapharm.com; ORCID: 0000-0002-3557-3824;

V.S. Bereznoy – JSC "Valenta Pharm", junior researcher, Shchelkovo, Moscow region, Russia, e-mail: Valentin.Bereznoy@valentapharm.com; ORCID: 0000-0002-1035-8239;

V.N. Shmeleva – JSC "Valenta Pharm", head of research and development, Shchelkovo, Moscow region, Russia, e-mail: Varvara.Shmeleva@valentapharm.com; ORCID: 0000-0001-6973-0405;

N.A. Golubeva – JSC "Valenta Pharm", R&D director, Shchelkovo, Moscow region, Russia, e-mail: natalia.golubeva@valentapharm.com; ORCID: 0000-0002-4065-8494

Статья поступила в редакцию 26.05.2023; одобрена после рецензирования 11.12.2023; принята к публикации 20.12.2023.

The article was submitted 26.05.2023; approved after reviewing 11.12.2023; accepted for publication 20.12.2023.