ЭКСПЕРТИЗА КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ БЕЗ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

МЕТОДАМИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ И ЯМР

Г.Калабин, д.х.н., **В.Васильев**, **Е.Чернецова**, к.х.н.,
А.Прокопьев, **Р.Абрамович**, д.фарм.н., **В.Ивлев**, **И.Матео**,
Российский университет дружбы народов
kalabinga@mail.ru

УДК 543.51, 543.429.23;
ВАК 02.00.02

Рассмотрены возможности качественного и количественного анализа лекарственных средств и биологически активных добавок сочетанием методов спектроскопии ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрии высокого разрешения. Экспериментальная реализация подхода показана на примере лекарственного препарата "Бисептол".

Результативность медицинской помощи зависит не только от профессионализма врачей, но и во многом определяется адекватной диагностикой заболевания, эффективной технологией лечения, наличием и качеством необходимых лекарственных средств (ЛС). В последние годы в России массово внедряются передовое зарубежное диагностическое оборудование и персонифицированный подход, который учитывает факторы сопутствующих заболеваний и противопоказаний. Однако открытой остается проблема эффективности и полезности ЛС. Последняя редакция Федерального закона "Об обращении лекарственных средств" (от 12 апреля 2010 года № 61-ФЗ с изм. от 22 апреля 2014 года № 429-ФЗ) препятствует распространению препаратов, которые не проходили широкомасштабных предклинических и клинических испытаний. Но на рынке по-прежнему присутствует медицинская продукция, которую ВОЗ относит к "некондиционной/поддельной/ложно маркированной/фальсифицированной/контрафактной" (НПЛФК). На январь 2016 года НПЛФК была выявлена среди 920 наименований ЛС [1]. Опыт авторов статьи по экспертизе лекарственных средств показал, что в России примерно 15% из них не соответствуют заявленному составу, тогда как для некоторых групп парафармацевтиков НПЛФК составляют до 50%.

В 2015 году был принят Федеральный закон, противодействующий обороту НПЛФК [2], и опубликовано очередное 13-е издание Государственной фармакопеи РФ (ГФ), которая содержит ряд новых общих фармакопейных статей (ОФС) по методам контроля лекарственных средств. Однако рекомендованные там методики обладают недостатками при доказательстве подлинности ЛС. В частности, проведение экспертизы требует обязательного сравнения исследуемых образцов со стандартными (СО), включает большое число операций, затратно по времени, предполагает сочетание весьма разнообразных процедур химического и физико-химического анализа. Значительные ограничения сопутствуют применению ИК-спектроскопии, которую ГФ рекомендует как унифицированный способ идентификации лекарственных субстанций. Кроме того, одним из объектов фальсификации Федеральный закон называет биологически активные добавки (БАД) – группу препаратов, наиболее близких к медицинским по их регламентируемой или доказанной лечебно-профилактической эффективности. Для них практически отсутствуют официальные критерии подлинности и качества.

Новый федеральный закон требует совершенствования подходов к экспертизе подлинности и качества как лекарственных средств, так и парафармацевтиков. В статье предложен метод доказательного фармацевтического анализа на основе сочетания масс-спектрометрии (МС) с количественной спектроскопией ЯМР (КС ЯМР).

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА МЕТОДОВ

Аналитические возможности и доказательная информативность МС и КС ЯМР велики. Эти методы широко используются в статьях фармакопей ЕС и США. Однако в ГФ их присутствие номинально. Спектроскопия ЯМР (ОФС.1.2.1.1.0007.15) конкретно рекомендована лишь

DOI: 10.22184/2227-572X.2017.33.2.106.112

для двух классов ЛС – гепарина и полисахаридных вакцин, а масс-спектрометрия (ОФС.1.2.1.1.0008.15) включена в 13-е издание фармакопеи вообще впервые. При этом оба метода не требуют обязательного использования дорогостоящих СО и в совокупности позволяют для многокомпонентных органических объектов быстро и надежно установить элементный состав, точную молекулярную массу, структурные формулы и содержание отдельных компонентов ЛС, примесей и остаточных растворителей в них. Особенно это имеет значение для экспертизы галеновых препаратов и парафармацевтиков, предназначенных для решения задач профилактической медицины. Для этих препаратов практически отсутствуют как СО, так и общепринятые и высокоэффективные методики доказательства подлинности.

Спектроскопия ЯМР на ядрах ^{1}H, ^{2}H, ^{13}C, ^{19}F и ^{31}P предназначена для установления молекулярной формулы и количественного анализа веществ. Она официально признана в статусе прямого первичного метода количественных измерений, поскольку регистрируемые интегральные интенсивности сигналов ядер отдельных атомов химического соединения прямо пропорциональны его мольной доле в смеси веществ [3].

В последнее десятилетие опубликован ряд обзоров, посвященных КС ЯМР. Они демонстрируют ее высокую универсальность, экспрессность, прецизионность, надежность при изучении лекарственных субстанций [4], вспомогательных веществ [5], вакцин [6], природных [7, 8] и биофармацевтических препаратов [9]. Показано, что КС ЯМР ^{1}H не требует СО и пробоподготовки (за исключением перевода твердых форм в раствор) при идентификации и количественном определении компонентов ЛС, выявлении и оценке содержания в них нерегламентированных примесей и остаточных растворителей. На ядрах ^{1}H метод позволяет обнаружить примеси с содержанием на уровне 0,01–0,1%. Большинство методик ЯМР ^{1}H и ^{19}F может быть адаптировано к простым настольным спектрометрам ЯМР с рабочими частотами для протонов 40–60 МГц [10, 11], которые не требуют криожидкостей, достаточно чувствительны и, что наиболее важно, на порядок и более дешевле, чем спектрометры ЯМР с криомагнитами. Независимость получаемой информации позволяет использовать КС ЯМР для экспертизы валидированных методик, верификации состава СО и референтных материалов.

Особую ценность метод приобретает в условиях возрастания доли контрафактных и фальсифицированных ЛС, в которых содержание лекарственной субстанции снижено, она подменена, отсутствует, или препарат в целом ненадлежащего качества. КС ЯМР обеспечивает фундаментальную доказательную платформу аутентификации лекарств и создает основу для правоприменительной практики в отношении недобросовестных участников фармацевтического рынка в соответствии с законодательством.

Масс-спектрометрия – наиболее высокочувствительный аналитический метод, способный обнаруживать примеси в пикограммовых количествах. Масс-спектры позволяют получить информацию о точных молекулярных массах и определяемых из нее брутто-формулах отдельных искомых соединений. Поскольку ЛС представляют собой сложные многокомпонентные смеси, то в их анализе часто используются "мягкие" методы ионизации. К ним, в частности, относятся МАЛДИ (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация), ИЭР (ионизация электрораспылением), ДАРТ (прямой анализ в режиме реального времени). Они на порядок повысили экспрессность проведения анализов, позволили в сочетании с масс-анализатором высокого разрешения измерять массы молекулярных ионов и их фрагментов с погрешностью порядка 5 ppm [12]. Обобщенные критерии выбора условий анализа методом ДАРТ были нами подробно рассмотрены ранее [13].

Применение спектроскопии ЯМР в сочетании с МС делает совокупно получаемую информацию исключительно ценной, поскольку методы независимы как друг от друга, так и от классических хроматографических или химических фармакопейных. Тем самым существенно повышается значимость экспертных оценок.

Анализ твердых образцов, их водных, органических растворов и экстрактов производится в КС ЯМР и МС при минимальной унифицированной пробоподготовке (растворение с ультразвуковым воздействием, центрифугированием и количественным добавлением произвольного стандарта, если это целесообразно). Аналитический процесс выполняется в уже апробированной последовательности: "пробоподготовка – идентификация компонентов – количественное определение компонентов (действующее вещество, вспомогательные вещества, примеси) – заключение о подлинности и качестве". Для выявления фальсификатов БАД возможны упрощенные алгоритмы анализа.

Некоторые возможности сочетания методов ЯМР и МС уже были отмечены при анализе биологических жидкостей человека, ЛС и БАД [14–17]. Апробация разрабатываемого подхода с привлечением МС ДАРТ впервые успешно реализована нами в ЦКП (НОЦ) РУДН при исследовании ряда лекарственных субстанций, различных форм ЛС (таблеток и капсул, суппозиториев

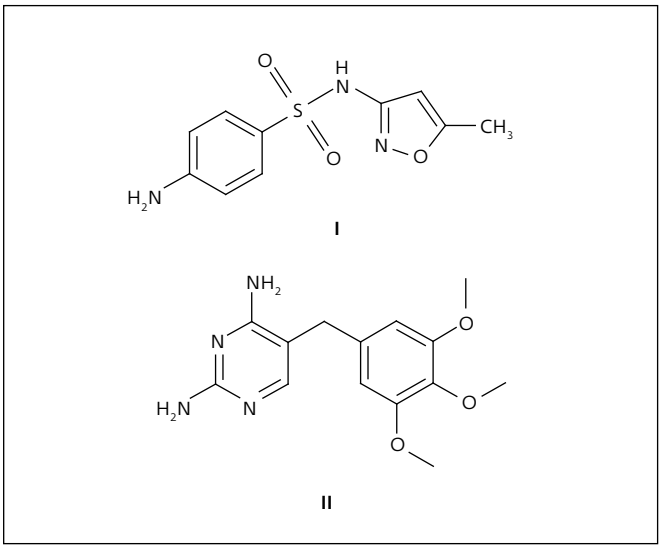

Рис.1. *Действующие вещества ЛС "Бисептол": сульфаметоксазол (I) и триметоприм (II)*

и мазей, жиров и масел), новых биофармацевтических препаратов [18–23].

Рассмотрим методологию проведения экспертизы содержания компонентов в ЛС как показателей его подлинности и качества на примере твердой формы (таблетки) популярного противомикробного комбинированного препарата "Бисептол".

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта анализа использовали таблетки ЛС "Бисептол", производитель "Польфа" (Польша), срок годности – до 01.07.2019.

Масс-спектры ДАРТ регистрировали с помощью времяпролетного масс-спектрометра модели "AccuTOF" (JEOL, Япония), с ионным источником ДАРТ (IonSense, США). Разломленную таблетку вносили пинцетом в зазор между источником ДАРТ и входным конусом масс-спектрометра. Для ионизации использовали гелий марки 5,0–6,0 чистоты >99,999% (Московский газоперерабатывающий завод, Россия), который нагревали до 260 °С. Скорость потока газа составляла 2 л/мин. Регистрировали положительные ионы при напряжении на газоразрядной игле источника ДАРТ 4 кВ и потенциале на входном конусе масс-спектрометра 10 В. Масс-спектры записывали в диапазоне m/z 70–800. Условия эксперимента соответствовали приведенным в [13], время одного измерения составляло около 5 с.

Для регистрации спектров ^{1}H ЯМР порошок таблеток "Бисептол" растворяли в дейтерированном диметилсульфоксиде (ДМСО-d6) чистотой 99,0% D и плотностью 1,1004 г/мл (Acros organics, Бельгия), для которого предварительно было измерено точное содержание остаточных протонов (1,04 ± 0,02%). Содержание остаточных протонов дейтерорастворителя определяли по количественным спектрам растворенного в нем стандартного образца бензойной кислоты (Acros organics, Бельгия), взятой как внутренний эталон (1 мг в 1 мл ДМСО-d6). Сигнал остаточных протонов ДМСО-d6 в спектре ^{1}H ЯМР (2,50 м.д.) использовали в качестве эталонного для определения содержания действующих веществ ЛС.

Взвешивание производили на весах модели "Acculab ATL-220i" (Acculab, США) с погрешностью 0,00001 г. Отбирали точную навеску порошка таблеток весом 52,60 мг, растворяли в ДМСО-d6, перемешивали полученную взвесь 30 с на миксере Vortex, обрабатывали ультразвуком в течение 15 мин и затем центрифугировали в течение 5 мин при скорости 14000 мин$^{-1}$. Надосадочную жидкость отбирали в ампулу для ЯМР диаметром 5 мм. Для обеспечения статистической обработки результатов готовили три образца.

Регистрацию спектра ^{1}H ЯМР выполняли с помощью спектрометра модели JNM-ECA 600 (JEOL, Япония) с рабочей частотой для ядер ^{1}H 600 МГц. Использовали следующие условия регистрации спектров: импульс 90°, развертка 18 м.д. с установкой несущей частоты 7,0 м.д., задержка между импульсами 30 с, 8 накоплений, 32 тыс. точек на спектр. Обработку спектров проводили с помощью программного обеспечения Delta IV (JEOL, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируемые таблетки ЛС "Бисептол" обладают антибактериальным действием и относятся к группе сульфаниламидов. Каждая таблетка препарата весом около 660 мг содержит, согласно спецификации, 400 мг сульфаметоксазола (I) и 80 мг триметоприма (II) (рис.1). Помимо них, в состав лекарственного входят вспомогательные вещества: картофельный крахмал, тальк, стеарат магния, поливиниловый спирт, пропиленгликоль, метил-п-гидроксибензоат и пропил-п-гидроксибензоат.

Масс-спектр ДАРТ порошка "Бисептол" и его интерпретация представлены на рис.2 [23]. Помимо сигналов соединений I и II, в нем присутствуют сигналы других низкомолекулярных компонентов. Высокомолекулярные или неорганические составляющие матрицы в источнике ДАРТ не ионизируются и поэтому не усложняют общую картину. Используемый масс-спектрометр AccuTOF имеет максимальное разрешение 6000 при точности определения масс 0,02 Да.

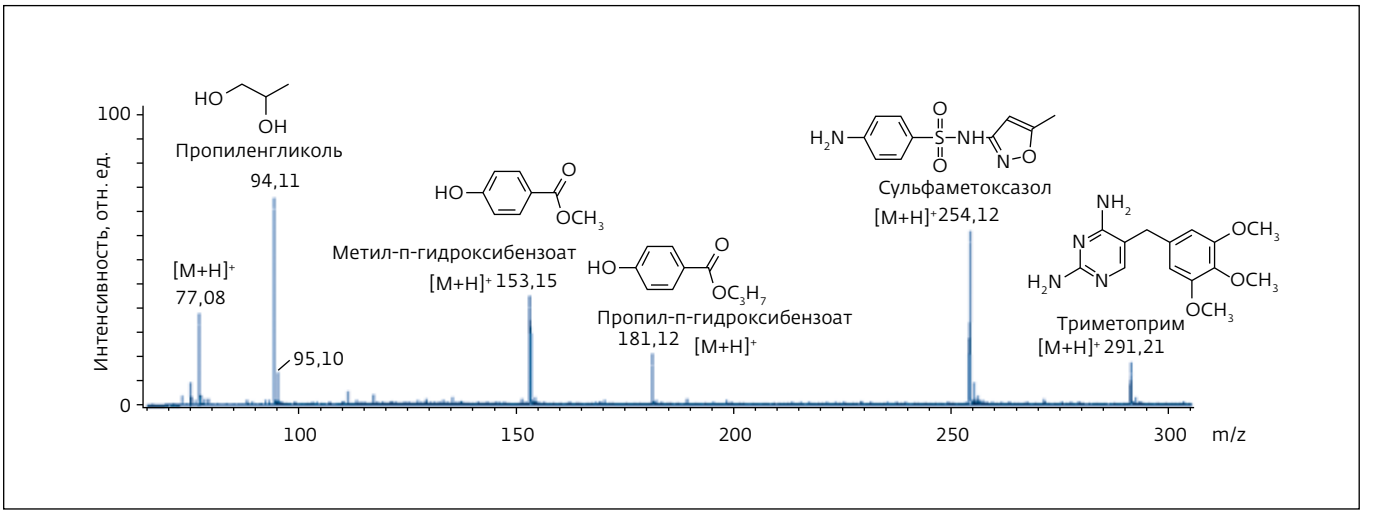

Рис.2. *Масс-спектр ДАРТ таблетки "Бисептол"*

Это позволяет исключить возможный сдвиг масс и считать присутствие в аналите соединений, идентифицированных на спектре, достоверно подтвержденным.

Хотя качественный анализ методом МС ДАРТ свидетельствует о наличии в порошке "Бисептол" действующих веществ I и II, но совпадение их точных молекулярных масс с ожидаемыми не исключает возможности присутствия изомерных или иных изобарных наложений. Поэтому этот этап идентификации следует считать предварительным. В каких случаях он наиболее целесообразен? Во-первых, при проведении мониторинга аутентичности серии одинаковых ЛС, когда полный аналитический цикл целесообразно использовать лишь для выборочных образцов. Во-вторых, при быстрой "отбраковке", когда сигналы молекулярных ионов в полученных спектрах МС ДАРТ не соответствуют ожидаемым. Эта ситуация потребует последующего проведения анализа в полном соответствии с ГФ.

Спектр ЯМР ^{1}H раствора ЛС "Бисептол" в ДМСО-d6 представлен на рис.3. Он содержит все сигналы протонов сульфаметоксазола (I) и триметоприма (II) (обозначены на спектре). Сигналы протонов лекарственных субстанций (указаны значения химических сдвигов в м.д., мультиплетность, отнесение и КССВ в Гц) I: 2,27 (с, 3H, CH_3); 6,04 (уш. сигнал, 2H, NH_2); 6,08 (с, $1H_{аром}$); 6,58 (д, $2H_{аром}$, J=8,6); 7,47 (д, $2H_{аром}$, J=8.6), 11,00 (широкий сигнал, 1H, NH). Для II: 3,55 (с, 2H, CH_2); 3,61 (с, 3H, -OCH_3); 3,72 (с, 6H, 2x-OCH_3); 6,02 (с, 2H, NH_2); 6,40 (уш. сигнал, 2H, NH_2); 6,56 (с, $2H_{аром}$); 7,54 (с, $1H_{аром}$). Положение пиков и их мультиплетность полностью соответствуют химическим формулам с учетом возможной изомерии и известным литературным данным [24, 25].

Сигналы некоторых вспомогательных веществ представлены над спектром. Наиболее очевидные пики пропиленгликоля, метил-п-гидроксибензоата и пропил-п-гидроксибензоата обозначены как, соответственно, III, IV и V. Для фрагментов CH_2 (3,1–3,3 м.д.) и CH_3 (0,96 м.д.) пропиленгликоля интенсивность сигналов увеличена в 20 раз, а для протонов ароматического кольца бензоатов – в 100 раз.

Содержание лекарственных субстанций в навеске определялось сравнением интегральной интенсивности сигнала трех алифатических протонов I при 2,27 м.д. и сигнала двух алифатических протонов II при 3,55 м.д. с сигналом остаточных протонов раствори-

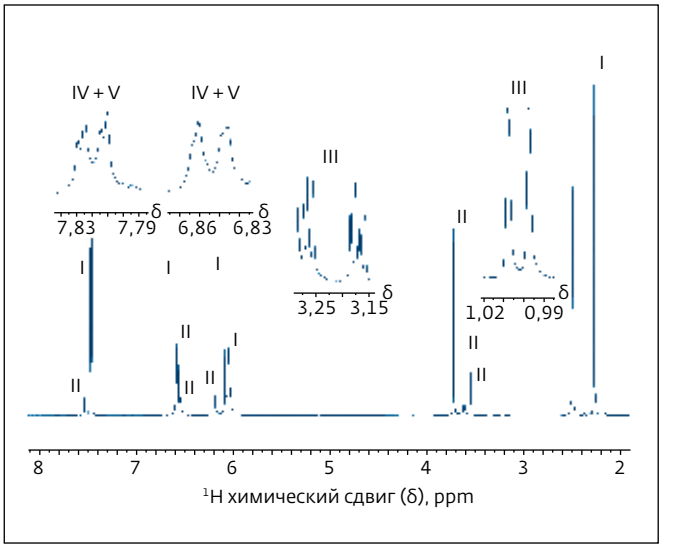

Рис.3. *Спектр ЯМР ^{1}H препарата "Бисептол"*

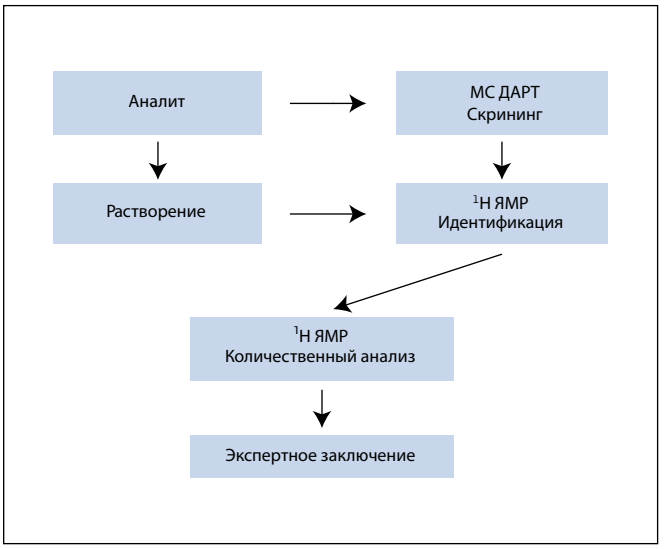

Рис.4. *Схема экспертизы подлинности и качества ЛС сочетанием методов ЯМР и МС*

теля ДМСО-d6 (2,50 м.д.). Расчет производился по формуле, предлагаемой в ОФС 1.2.1.1.0007.15 для сухих веществ:

$$X, \% \text{ масс} = 100 \times (S'/S'_0) \times (M \times a_0/M_0 \times a),$$

где X, % масс – процентное содержание фармацевтической субстанции в испытуемом образце, S' – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала определяемого вещества, S'_0 – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала стандарта, M – молекулярная масса определяемого вещества, M_0 – молекулярная масса стандарта, a – навеска испытуемого образца, a_0 – навеска вещества стандарта.

В навеске массой 52,60 мг содержание сульфаметоксазола составило 32,26 мг, а триметоприма 6,31 мг, или 408,71 и 79,94 мг, соответственно, в пересчете на массу таблетки "Бисептола" (666,40 мг). Это соответствует данным, представленным производителем (400 и 80 мг, соответственно). Полученные результаты для двух других навесок различались не более чем на 2%.

Затраты времени на проведение подобной экспертизы минимальны. За исключением этапа измельчения и растворения таблетки, все процедуры в целом занимают порядка 10 мин. На регистрацию спектра МС ДАРТ требуется менее 1 мин, спектра ¹Н ЯМР – 6 мин (при условии наличия готового к анализу раствора). Еще несколько минут нужно на идентификацию и расчет содержания компонент.

Валидационная процедура для масс-спектрометрии не требуется. Этот метод используется на этапе "скрининга", для которого характерны преимущественно качественная, а не количественная оценка, простота или отсутствие пробоподготовки, быстрота, немедленное принятие решения [26]. Алгоритм валидации методики количественного ЯМР подробно изложен в [27]. В работе [28] на примере метамфетамина показано, что линейность зависимости интегральной интенсивности сигналов от концентрации вещества в диапазоне 0,1–70 мг/мл превышает 0,9999. Содержание лекарственных субстанций в приведенном примере соответствует данному интервалу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Общая схема проведения экспертизы подлинности ЛС сочетанием методов ЯМР и МС показана на рис.4. Главные достоинства подхода – прецизионность, быстрота, универсальность, отсутствие необходимости использовать СО. Он перспективен для фармацевтического анализа возможностью как создавать валидированные методики анализа ЛС и парафармацевтиков, так и тиражировать их в аккредитованных лабораториях. Для этого достаточно, чтобы они располагали доступными и простыми в эксплуатации спектрометрами ЯМР с рабочими частотами 60–80 МГц и источниками ионизации ДАРТ к любым хромато-масс-спектрометрам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Некондиционная/поддельная/ложно маркированная/фальсифицированная/контрафактная (НПЛФК) медицинская продукция. Информационный бюллетень ВОЗ, январь 2016 г. URL: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs275/ru
2. О внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации в части противодействия обороту фальсифицированных, контрафактных, недоброкачественных и незарегистрированных лекарственных средств, медицинских изделий и фальсифицированных биологически активных добавок: федер. закон РФ от 31 декабря 2014 года № 532-ФЗ: принят Гос. Думой Федер. Собр. РФ 19 декабря 2014 года: одобр. Советом Федерации Федер. Собр. РФ 25 декабря 2014 года // Рос. Газ. 2015. 12 января.
3. **Jancke H.** NMR Spectroscopy as a Primary Analytical Method. Document 98/02 to the 4th Session of the CCQM, Sèvres 1998.
4. **Holzgrabe U.** Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications // Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. 2010. V. 57. P. 229–240.

5. **Van Duynhoven J., Van Velzen E., Jacobs D.M.** Quantification of complex mixtures by NMR // Annual Reports on NMR Spectroscopy. 2013. V. 80. P. 181–236.
6. **Jones C.** NMR assays for carbohydrate-based vaccines // J. Pharm. Biomed. Anal. 2005. V. 38. P. 840–850.
7. **Kaiser K.A.** Metabolic profiling. In: **Holzgrabe U., Wawer I., Diehl B.** editor. NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis. Amsterdam: Elsevier. 2008. P. 233–267.
8. **Pauli G.F., Gödecke T., Jaki B.U., Lankin D.C.** Quantitative ^{1}H NMR. Development and potential of an analytical method: an update // Journal of Natyral Products. 2012. V. 75. P. 834–851.
9. **Simmler C., Napolitano J.G., McAlpine J.B., Chen S.-N., Pauli G.F.** Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples // Current Opinion in Biotechnology. 2014. V. 25. P. 51–59.
10. **Садыков Б.Р.** Разработка экологически предпочтительных методов контроля безопасности и качества природного органического сырья и продуктов его переработки с помощью количественной спектроскопии ЯМР: дис. ... канд. хим. наук: 03.02.08: [Место защиты: Российский государственный университет нефти и газа им. И.М. Губкина]. М., 2014. 136 с.
11. **Pagès G., Gerdova A., Williamson D., Gilard V., Martino R., Malet-Martino M.** Evaluation of a benchtop cryogen-free low-field ^{1}H NMR spectrometer for the analysis of sexual enhancement and weight loss dietary supplements adulterated with pharmaceutical substances // Anal. Chem. 2014. V. 86. P. 1897–1904.
12. **Klampf C.W., Himmelsbach M.** Direct spray methods in mass-spectrometry: an overview // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 890. P. 44–59.
13. **Калабин Г.А., Чернецова Е.С.** Обобщенные критерии выбора анализа в масс-спектрометрии DART // Аналитика и контроль. 2014. Т. 18. № 3. С. 251–265.
14. **Bingol K., Bruschweiler-Li L., Yu C., Somogyi A., Zhang F., Brüschweiler R.** Metabolomics beyond spectroscopic databases: a combined MS/NMR strategy for the rapid identification of new metabolites in complex mixtures // Anal. Chem. 2015. V. 87. P. 3864–3870.
15. **Brkljača R., Urban S.** HPLC-NMR and HPLC-MS profiling and bioassay-guided identification of secondary metabolites from the australian plant Haemodorum spicatum // J. Nat. Prod. 2015. V. 78 (7). P. 1486–494.
16. **Wubshet S.G., Schmidt J.S., Wiese S., Staerk D.** High-resolution screening combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of potential health-promoting constituents in sea aster and searocket new nordic food ingredients // J. Agric. Food Chem. 2013. V. 61. P. 8616–8623.
17. **Ravu R.R., Jacob M.R., Jeffries C., Tu Y., Khan S.I., Agarwal A.K., Guy R.K., Walker L.A., Clark A.M., Li X.C.** LC-MS- and ^{1}H NMR spectroscopy-guided identification of antifungal diterpenoids from Sagittaria latifolia // J. Nat. Prod. 2015. V. 78 (9). P. 2255–2259.
18. **Абрамович Р.А., Ковалева С.А., Горяинов С.В., Воробьев А.Н., Калабин Г.А.** Экспресс-анализ суппозиториев методом количественной спектроскопии ЯМР ^{1}H // Антибиотики и химиотерапия. 2012. 57. № 5–6. С. 3–6.
19. **Горяинов С.В., Лабзиуи З., Алиев А.М., Суслина С.Н., Вандышев В.В., Калабин Г.А.** Сравнительное исследование образцов масла семян ARGANIA SPINOSA, полученных разными способами, методами ЯМР ^{1}H спектроскопии и масс-спектрометрии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. Т. 11. № 4. С. 10–15.
20. **Ивлев В.А, Обидченко Ю.А., Прокопьев А.С., Абрамович Р.А., Горяинов С.В., Калабин Г.А.** Идентификация и контроль качества синтетических олигопептидных фармпрепаратов методом количественной спектроскопии ЯМР ^{1}H и масс-спектрометрии // Биофармацевтический журнал. 2015. Т. 7. № 3. С. 36–44.
21. **Калабин Г.А., Горяинов С.В., Ивлев В.А., Нифтуллаев Ф.Ю., Абрамович Р.А.** Идентификация и количественное определение лекарственных субстанций в суппозиториях комбинацией методов спектроскопии ЯМР ^{1}H и десорбционной масс-спектрометрии // Известия Академии наук. Сер. химическая. 2014. № 8. С. 1848–1855.
22. **Ивлев В.А., Калабин Г.А., Масленников И.А.** Количественный анализ состава препарата Перфторан методом ЯМР спектроскопии // Химико-фармацевтический журнал. 2016. Т. 50. № 4. С. 52–55.
23. **Чернецова Е.С., Бочков П.О., Овчаров М.В., Затонский Г.Б., Абрамович Р.А.** Сверхбыстрая идентификация низкомолекулярных компонентов лекарственных препаратов методом масс-спектрометрии DART // Масс-спектрометрия. 2010. Т. 7. № 2. С. 147–149.
24. **Florey K.** Analytical profiles of drug substances. V. 2. New York: Academic Press, 1973. P. 572.
25. **Florey K.** Analytical profiles of drug substances. V. 7. New York: Academic Press, 1978. P. 503.
26. **Varcarcel M., Caerdenas S., Gallego M.** Sample screening systems in analytical chemistry // Trends Anal. Chem. 1999. V. 18. № 11. P. 685–694.
27. **Godecke T., Napolitano J.G., Rodriguez-Drasco M.F., Chen S.-N., Jaki B.U., Lankin D.C., Pauli G.F.** Validation of a generic quantitative ^{1}H NMR method for natural products analysis // Phytochemical Analysis. 2013. V. 24 (6). P. 581–597.
28. **Hays P.A.** Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) methods for determining the purity of reference drug standards and illicit drug seizures // J. Forensic Sci. 2005. V. 50. № 6. P. 1–19.