

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДИМЕРНОГО МАКРОЦИКЛИЧЕСКОГО ТАНИНА

З.С. Шпрах¹, Е.В. Игнатьева¹, И.В. Ярцева¹, С.А. Сасов¹, О.Л. Орлова¹,
А.П. Полозкова¹, Д.А. Хоченков¹, А.М. Королев², Н.М. Малютина²

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»;

Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11

Контакты: Елена Владимировна Игнатьева chem_analysis@ronc.ru

Введение. В последнее время наблюдается устойчивый интерес к скринингу противоопухолевых и антиангиогенных веществ, блокирующих несколько механизмов активации ангиогенеза в опухоли. В качестве ингибиторов ангиогенеза большое внимание уделяется разработке эффективных и малотоксичных лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья. Настоящая статья посвящена стандартизации лекарственной формы димерного макроциклического танина (ДМТ), выделенного в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России из соцветий кипрея узколистного *Chamerion angustifolium* (L.) Holub и представляющего значительный интерес в качестве антиангиогенного средства.

Цель исследования — выбор критериев качества для стандартизации препарата «ДМТ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг».

Материалы и методы. В работе использованы лекарственная форма «ДМТ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг» и субстанция ДМТ. Методы исследования: спектрофотометрия, инфракрасная спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография, потенциометрия, поляриметрия.

Результаты. С учетом требований Государственной фармакопеи РФ XIII издания к препаратам для инъекций выбраны критерии качества лиофилизированной лекарственной формы ДМТ и разработаны методики их определения.

Выводы. Путем лабораторных исследований показано, что выбранные критерии качества и разработанные для их определения методики позволяют корректно контролировать качество лекарственной формы «ДМТ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг».

Ключевые слова: димерный макроциклический танин, физико-химические характеристики, стандартизация, количественный анализ

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-67-73

STANDARDIZATION OF LYOPHILIZED DOSAGE FORM OF DIMERIC MACROCYCLIC TANNIN

Z.S. Shprakh¹, E.V. Ignat'eva¹, I.V. Yartseva¹, S.A. Sasov¹, O.V. Orlova¹,
A.P. Polozkova¹, D.A. Hochenkov¹, A.M. Korolev², N.M. Malyutina²

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;

24 Kashyrskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

²G.F. Gause Institute of New Antibiotics; 11 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow 119435, Russia

Background. Over the last years the studies have increased interest in screening antitumor and anti-angiogenic substances that block several mechanisms of angiogenesis activation in tumors. A great attention is paid to development of effective and low toxic drugs as inhibitors of angiogenesis which are derived from herbal raw material. The article is devoted to the results of standardization of the dosage form of dimeric macrocyclic tannin (DMT) obtained from *Chamerion angustifolium* (L.) Holub in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, which has a great potential as an antiangiogenic agent.

Objective: to determine quality criteria for standardization of the drug “DMT, lyophilisate for preparation of solution for injections 100 mg”.

Materials and methods. The study used “DMT, lyophilisate for preparation of solution for injections 100 mg” and DMT substance. Methods: spectrophotometry, infrared spectroscopy, high performance liquid chromatography, potentiometry, polarimetry.

Results. Quality criteria for lyophilized DMT dosage form were determined with the account of Russian State Pharmacopoeia (XIII edn.) requirements to the drugs for injections and methods for their evaluation were defined.

Conclusions. Laboratory studies demonstrated that the determined quality criteria and the defined methods for their evaluation are feasible for adequate quality control of dosage form “DMT, lyophilisate for preparation of solution for injections 100 mg”.

Key words: dimeric macrocyclic tannin, physicochemical characteristics, standardization, quantitative analysis

Введение

В настоящее время активно разрабатываются новые подходы к лекарственному лечению злокачественных новообразований, такие как антиангиогенная терапия, основанная на подавлении роста в опухоли новых сосудов, и васкулярная терапия, направленная на уничтожение уже сформированных опухолевых микрососудов. Обнаружение молекулярных маркеров, дающих возможность адекватно оценивать активность ангиогенеза опухоли, и идентификация сигнальных систем, регулирующих неоангиогенез опухоли, способствуют выявлению новых молекулярных мишеней для разработки противоопухолевых лекарственных препаратов, нацеленных на подавление ангиогенной активности опухоли [1]. В последнее время наблюдается устойчивый интерес к скринингу противоопухолевых и антиангиогенных веществ, блокирующих несколько механизмов активации опухолевого ангиогенеза. В качестве ингибиторов ангиогенеза большое внимание уделяется разработке и внедрению в практику здравоохранения эффективных и малотоксичных лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья [2, 3]. Для получения достоверных результатов доклинических и клинических исследований необходимо, чтобы отобранные в результате скрининга соединения и разработанные на их основе лекарственные формы обладали определенными точно измеренными физическими и химическими параметрами, т. е. были стандартны.

Цель исследования — выбор критериев качества для стандартизации лекарственной формы (ЛФ) димерного макроциклического танина (ДМТ), выделенного в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» («НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина») Минздрава России из соцветий кипрея узколистного *Chamerion angustifolium* (L.) Holub [4] и представляющего значительный интерес в качестве антиангиогенного средства.

Материалы и методы

Препараты и реактивы. Субстанция-порошок ДМТ и ЛФ «ДМТ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг» (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России); железа (III) хлорид, ацетонитрил 99,9 % HPLC-gradient grade PAI-ACS для ультрафиолетовой спектроскопии при длине волны 210 нм, муравьиная

кислота 98 % PA-ACS (PanReac AppliChem, Испания); вода деионизированная (Milli-Q Water Purification System, США).

Приборы. Спектрофотометр Cary-100 (Varian, США), инфракрасный (ИК) Фурье-спектрометр Nicolet-iS10 (детектор DTGS, светоделиватель KBr) (Thermo Fisher Scientific, США), поляриметр Unipol L (Schmidt + Haensch GmbH & Co., Германия), жидкостный хроматограф LC-20 Prominence серии AD с фотодиодно-матричным детектором (Shimadzu Corporation, Япония), весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), pH-метр pH-211 (Hanna Instruments, Германия), электрошкаф сушильный ED 23 (Binder, Германия).

Методика определения содержания родственных примесей (метод высокoeffективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)). Для приготовления испытуемого раствора около 6,25 мг (точная навеска) ЛФ ДМТ помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в воде дистиллированной и доводили водой до метки. В качестве раствора стандартного образца (СО) использовали раствор субстанции ДМТ в том же разведении. Растворы использовали свежеприготовленными. Перед введением в петлю раствора разводили в 2 раза подвижной фазой А.

Определение содержания примесей проводили с использованием аналитического жидкостного хроматографа LC-20 Prominence серии AD с фотодиодно-матричным детектором. Хроматографирование проводили на колонке Kromasil (AkzoNobel, Швеция) C-18, 5 мкм, длина 250 мм, внутренний диаметр 4 мм. Градиент АВ: 100 % А (0 мин) — 0 % В (15 мин), 0 % А (15 мин) — 100 % В (25 мин). Подвижная фаза А — смесь вода—ацетонитрил—кислота муравьиная в соотношении 900: 99,96: 0,04 (по объему), подвижная фаза В — смесь вода—ацетонитрил—кислота муравьиная в соотношении 300: 699,72: 0,28 (по объему). Скорость потока элюента — 1,0 мл/мин, температура колонки — 25 °С; детектирование проводили при длине волны 263 нм. Объем анализируемой пробы составил 20 мкл, время хроматографирования — 25 мин, время удерживания основного пика ДМТ — $12,40 \pm 0,50$ мин.

Результаты анализа считали достоверными, если выполнялись требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы», который проводили, хроматографируя не менее 5 раз раствор СО.

Хроматографическую систему признавали пригодной, если выполнялись следующие условия:

- разрешение между пиком примеси с относительным временем удерживания около 1,59 и пиком основного вещества не менее 11,9 мин;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пик у основного вещества, не менее 5506 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение площади пика основного вещества не более 2 %;
- фактор асимметрии пика не более 1,4.

Содержание любой единичной примеси в препарате (X, %) рассчитывали по формуле

$$X = \frac{S_i}{S_1 + S_2 + \dots + S_i} \times 100,$$

где S_i — площадь пика любой единичной примеси на хроматограмме испытуемого раствора, $S_1 + S_2 + \dots + S_i$ — суммарная площадь пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

Методика количественного определения ДМТ в ЛФ (метод спектрофотометрии). Для приготовления испытуемого раствора содержимое флакона растворяли в дистиллированной воде, переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки водой, затем 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора до метки водой. В качестве раствора СО использовали раствор 100 мг ДМТ в том же разведении. Растворы использовали свежеприготовленными.

Измерение оптической плотности испытуемого раствора проводили параллельно с измерением оптической плотности раствора СО относительно воды в максимуме при длине волны 265 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание ДМТ (X, мг) во флаконе вычисляли по формуле

$$X = \frac{D_1 \times a_0 \times P}{D_0 \times 100},$$

где D_1 — оптическая плотность испытуемого раствора, D_0 — оптическая плотность раствора СО, a_0 — навеска СО (мг), P — содержание ДМТ в растворе СО (%).

Результаты и обсуждение

ДМТ, выделенный в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России из соцветий кипрея узколистного *Chamerion angustifolium* (L.) *Нолуб* [4], представляет собой комплекс макроциклических танинов, основной частью (около 90 %) которого является димерный танин со структурной формулой, представленной на рис. 1.

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработана ЛФ ДМТ в виде

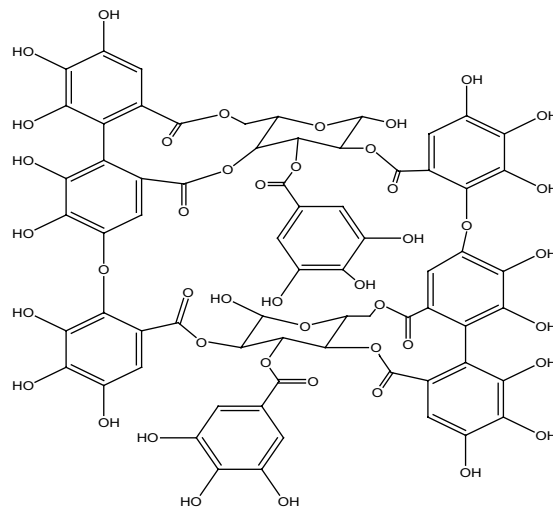


Рис. 1. Химическая структура ДМТ

лиофилизата для приготовления раствора для инъекций, не содержащая вспомогательных веществ.

Химико-фармацевтическое изучение ЛФ ДМТ выполняли с учетом требований нормативной документации к сухим ЛФ для инъекций [5–7]. Исследования проводили на 3 сериях препарата. Все образцы представляли собой сухую пористую массу белого цвета с желтоватым оттенком, без запаха. Средняя масса содержимого флакона составляла от 0,105 до 0,113 г, отклонение массы каждого флакона от средней массы флакона не превышало ± 10 %, что соответствует требованиям Государственной фармакопеи (ГФ) РФ XIII издания. Содержимое флакона образцов ЛФ ДМТ растворяли в 20 мл воды в течение 30 с [8]. Полученные растворы были прозрачны, интенсивность их окраски не превышала интенсивность окраски эталона Y_6 . При наблюдении в проходящем свете в испытуемых растворах не обнаруживались частицы вещества, а величина pH находилась в пределах от 3,5 до 3,6. Все серии ЛФ ДМТ прошли испытания на наличие механических включений [9].

ДМТ является полифенольным соединением (см. рис. 1), поэтому для подтверждения подлинности препарата использовали электронные спектры поглощения (ЭСП) [10], ИК-спектры [11] и цветную качественную реакцию на полифенолы [12]. ДМТ легко окисляется солями окисного железа, образуя окрашенные продукты (при добавлении к водному раствору ЛФ раствора железа (III) хлорида появляется темно-синее окрашивание).

Ароматические циклы, входящие в состав молекулы ДМТ, ответственны за поглощение излучения в ультрафиолетовом диапазоне длин волн. ЭСП 0,002 % водных растворов образцов ЛФ ДМТ в области от 200 до 350 нм имели максимумы поглощения при длинах волн 215 ± 2 и 265 ± 2 нм и полностью совпадали с ЭСП раствора субстанции ДМТ (рис. 2, 3).

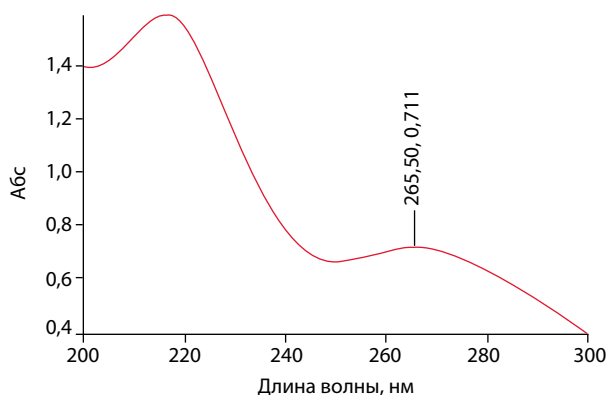


Рис. 2. ЭСП водного раствора субстанции ДМТ

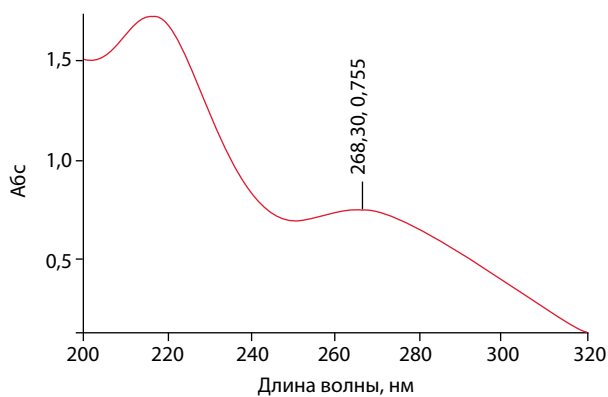


Рис. 3. ЭСП раствора ЛФ ДМТ серии 1

ИК-спектры образцов ЛФ ДМТ в области от 4000 до 400 см^{-1} содержат полосы поглощения, связанные с различными колебаниями связей замещенных бензольных циклов [1616, 1508, 1452, 870, 833, 745, 729 см^{-1}], полосы поглощения, связанные с углеводным циклом [1197, 1033, 600 см^{-1}] и указывающие на присутствие в молекуле пиранозного кольца в конформации C_1 [910, 765 см^{-1}]; в ИК-спектре ДМТ

имеются полосы, соответствующие валентным и деформационным колебаниям связи О—Н [3317, 1318, 1196, 1033 см^{-1}], а также валентным колебаниям карбонильной группы, характерным для альдегидов, карбоновых кислот и сложных эфиров [1729 см^{-1}].

ИК-спектры образцов ЛФ ДМТ (0,5 мг в 100 мг калия бромида) идентичны ИК-спектрам его субстанции, записанным в тех же условиях, имеют специфический рисунок и подтверждают структуру ДМТ (рис. 4).

ДМТ является оптически активным веществом. Величина угла оптического вращения может служить показателем подлинности и качества препарата. Результаты, полученные для исследуемых образцов ЛФ, в которых содержание основного действующего вещества составляло 87–90 % в пересчете на высушенное вещество, укладывались в интервал от $+300^\circ$ до $+315^\circ$.

ДМТ выделен из растительного сырья и даже при очень тщательной очистке содержит примеси полифенольной природы (галловую и валониюевую кислоты, их ангидриды и др.). Определение содержания примесей в ЛФ ДМТ проводили методом ВЭЖХ. На хроматограммах были обнаружены пики основного вещества — ДМТ — с временем удерживания (retention time, RT) $12,4 \pm 0,5$ мин, пик основной примеси с RT $19,5 \pm 0,5$ мин и несколько малоинтенсивных пиков с RT от 22 до 24 мин (рис. 5). Основная примесь к ДМТ была выделена с помощью ВЭЖХ. Пик на хроматограмме был уширенным, и его исследование методом масс-спектрометрии показало, что примесь неиндивидуальна и содержит 3 основных вещества с массами m/z 1699,7605; 1556,6610; 1394,5975 [M]⁺. Следует отметить, что, в отличие от ДМТ, вещества из этой смеси не образуют отрицательных ионов, т. е. не содержат карбоксильные группы.

Содержание единичной примеси в препарате рассчитывали методом внутренней нормализации.

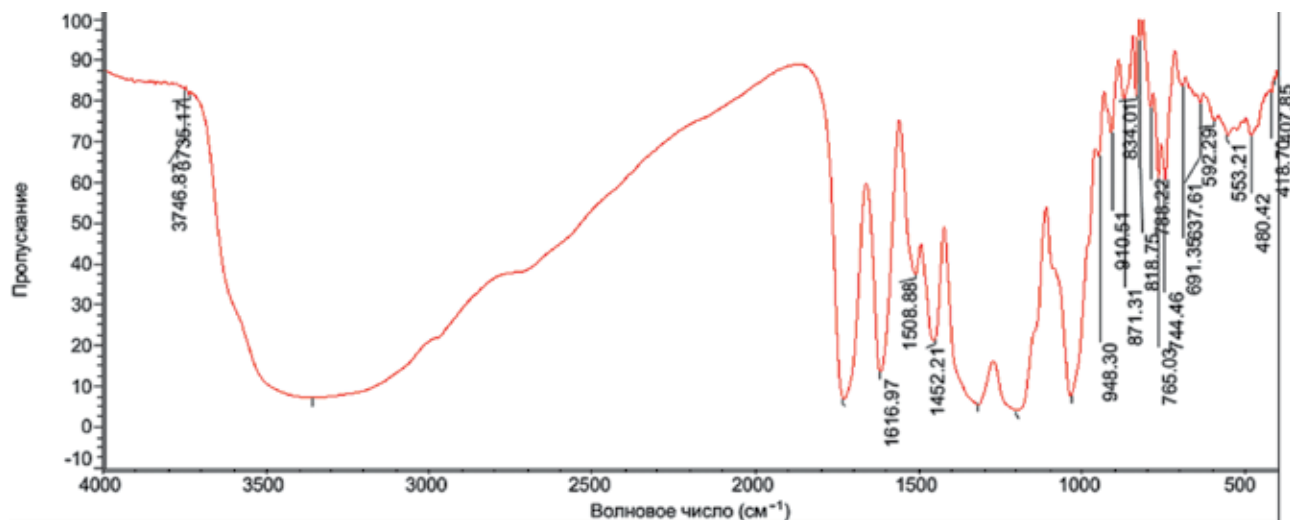


Рис. 4. ИК-спектр ЛФ ДМТ серии 2

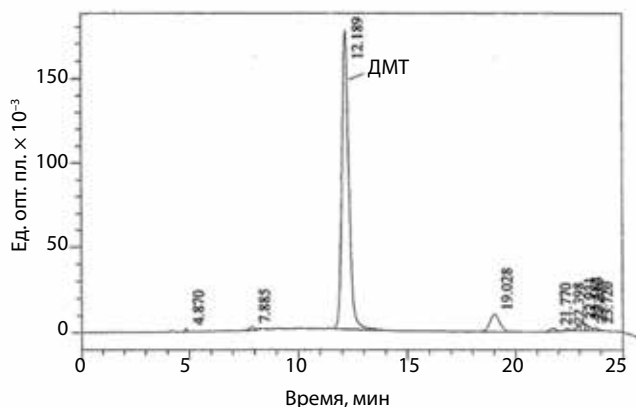


Рис. 5. ВЭЖХ-хроматограмма ЛФ ДМТ

Для всех представленных для анализа серий ЛФ содержание основной примеси с $RT\ 19,5 \pm 0,5$ мин находилось в пределах от 4 до 6 %, суммарное содержание примесей не превышало 12 %.

ДМТ содержит большое число гидроксильных и карбоксильных групп и способен образовывать с низкомолекулярными соединениями (водой, растворителями) вандерваальсовы и ковалентные связи. Изучение условий высушивания ДМТ показало, что в мягких условиях препарат очень медленно теряет массу (табл. 1), однако легко высушивается в течение 3 ч при нагревании при атмосферном давлении в сушильном шкафу при температуре $125\ ^\circ\text{C}$ (табл. 2). Потеря в массе для образцов ЛФ в этих условиях не превышала 3,5 % от массы исходной навески.

Вещество, высушенное таким образом, сохраняет характеристический ИК-спектр (см. рис. 4, 6). Высушивание при более высокой температуре приводит к окислительной деструкции препарата.

Для количественного определения основного действующего вещества в ЛФ ДМТ был выбран метод прямой спектрофотометрии, который прост в исполнении, требует незначительного количества

Таблица 1. Потеря в массе ЛФ ДМТ при высушивании до постоянной массы над P_2O_5 при комнатной температуре и остаточном давлении 7 мм рт. ст.

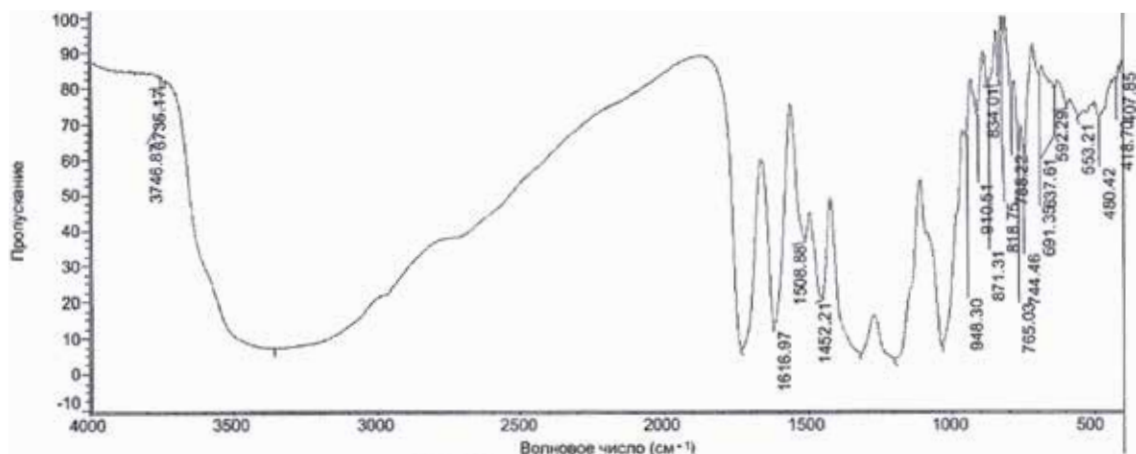
№ серии	Масса навески, г	Время высушивания, сут	Потеря в массе, %
Серия 1	0,11556	0	0
	0,11201	7	3,07
Серия 3	0,10879	0	0
	0,10502	7	3,46

Таблица 2. Потеря в массе ЛФ ДМТ при высушивании в течение 3 ч при нагревании и атмосферном давлении

№ серии	Потеря в массе, %			
	$60\ ^\circ\text{C}$	$80\ ^\circ\text{C}$	$105\ ^\circ\text{C}$	$125\ ^\circ\text{C}$
Серия 1	отсутствует	1,5	2,6	3,1
Серия 2	отсутствует	1,3	2,2	2,6
Серия 3	отсутствует	1,5	2,7	3,3

анализируемого вещества, отличается достаточной точностью (относительная ошибка не превышает $\pm 2\%$) и чувствительностью [10].

В ЭСП водного раствора субстанции ДМТ в области от 200 до 350 нм, как было указано выше, максимумы поглощения наблюдаются при длинах волн 215 ± 2 и 263 ± 2 нм и совпадают с максимумами в ЭСП ЛФ ДМТ (см. рис. 2, 3). Известно, что чем в более коротковолновой области спектра расположена полоса поглощения, тем сильнее (при прочих равных условиях) искажения из-за немонахроматичности излучения [12], поэтому в качестве аналитического сигнала выбран максимум при длине волны 265 нм.

Рис. 6. ИК-спектр ЛФ ДМТ серии 2 после нагревания при температуре $125\ ^\circ\text{C}$

Для проверки соблюдения закона Бугера—Ламберта—Бера при данном максимуме поглощения готовили растворы субстанции ДМТ в воде в диапазоне концентраций от 0,03 до 0,01 мг/мл. График зависимости оптической плотности от концентрации раствора представлен на рис. 7.

Из графика видно, что во всем исследуемом диапазоне концентраций наблюдается линейная зависимость оптической плотности от концентрации раствора, т. е. закон Бугера—Ламберта—Бера соблюдается при данном максимуме поглощения. Рабочей концентрацией раствора ДМТ выбрали концентрацию 0,006–0,008 мг/мл; при этом величина оптической плотности укладывалась в интервал, рекомендуемый ГФ РФ [6]. ЛФ ДМТ не содержит вспомогательных веществ, которые могли бы оказывать влияние на спектральные характеристики действующего вещества, поэтому в качестве раствора сравнения использовали воду. Для снижения систематических и случайных ошибок при определении действующего вещества в спектрофотометрическую методику ввели способ расчета по СО. В качестве

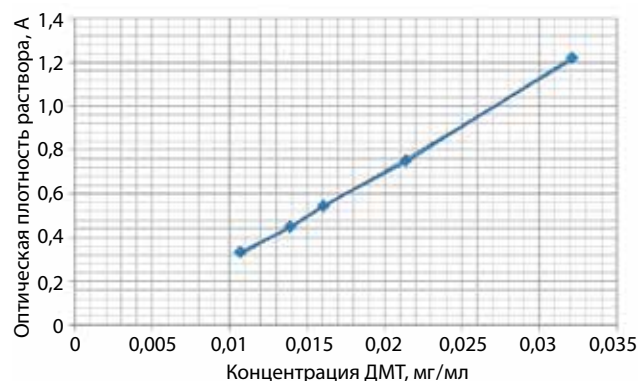


Рис. 7. Зависимость оптической плотности от концентрации раствора ДМТ

СО использовали субстанцию ДМТ, из которой произведены серии испытуемой ЛФ. Ошибка определения ДМТ в ЛФ по данной методике составила около 1 %, что указывает на достаточную точность разработанной методики анализа (табл. 3).

Экспериментальные данные, полученные в результате проведенной работы, представлены в табл. 4.

Таблица 3. Результаты количественного определения ДМТ в его ЛФ

Показатель	№ образца					
	1	2	3	4	5	6
Оптическая плотность	0,856	0,871	0,863	0,851	0,869	0,866
Содержание ДМТ в ЛФ, мг	99,6	101,4	100,5	99,0	101,1	100,8
Метрологические характеристики	$n = 6, f = 5, \bar{x} = 100,4, S^2 = 0,852, S = 0,92304, S_x = 0,37683, P = 95 \%, t_{p, f} = 2,57, \Delta \bar{x} = 0,969, \varepsilon = 0,96 \%$					

Примечание. Масса навески СО = 105,912 мг, содержание ДМТ в СО (Р) = 84,07 %, оптическая плотность СО = 0,765.

Таблица 4. Показатели качества ЛФ «ДМТ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг»

№ серии	Средняя масса во флаконе, г	Прозрачность раствора	Цветность раствора	pH	Родственные примеси (сумма), %*	Удельное вращение $[\alpha]^{20}_D$	Потеря в массе при высушивании, %	Количественное содержание ДМТ, мг
Серия 1	0,105	Раствор содержимого флакона в 20 мл воды прозрачен	Интенсивность окрашивания раствора, полученного в испытании на прозрачность, не превышает эталон Y_6	3,6	10,2	+307,0	3,1	97,2
Серия 2	0,110	То же	То же	3,5	9,6	+307,0	2,6	100,4
Серия 3	0,113	То же	То же	3,5	11,0	+305,0	3,3	98,2

* Данные ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе».

Выводы

Полученные в настоящей работе данные позволяют выбрать критерии качества лиофилизированной ЛФ ДМТ в соответствии с требованиями ГФ РФ к препаратам для инъекций. Разработана методика определения содержания примесей в ЛФ ДМТ методом ВЭЖХ. Для количественного анализа ЛФ ДМТ разработана спектрофотометрическая методика с использованием

СО, позволяющая с достаточно высокой точностью определять содержание действующего вещества в ЛФ.

Выбранные критерии дают возможность корректно контролировать качество ЛФ ДМТ. Полученный экспериментальный материал использован для составления спецификации и фармакопейной статьи предприятия ЛФ «ДМТ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг».

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Карамышева А.Ф. Антиангиогенная терапия: надежды и разочарования. Сигнальные системы, регулирующие ангиогенез опухоли, и их изменение при опухолевой прогрессии. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2013. 250 с.
2. Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Григорьева И.Н., Барышников А.Ю. Оценка антиангиогенной активности экстрактов растений и их фракций, произрастающих на территории России. Российский биотерапевтический журнал 2009;8(2):56.
3. Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Абрамов М.Е. и др. Ингибиторы ангиогенеза растительного происхождения: перспективы использования в клинической онкологии. Российский биотерапевтический журнал 2010;9(4):3.
4. Сасов С.А., Толкачев В.Н., Ярцева И.В., Толкачев О.Н. Макроциклические танины кипрея узколистного. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2010;10:24–9.
5. ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения».
6. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 1, 2. М., 2015.
7. Федеральный Закон № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» от 24 марта 2010 г.
8. Игнатьева Е.В., Ярцева И.В., Дмитричева Н.А. и др. Оценка качества лиофилизированной лекарственной формы ДМТ. Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(спецвыпуск):40–1.
9. ОФС 1.4.2.0005.15 «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».
10. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. 5-е изд., перераб. Л.: Химия, 1986. 431 с.
11. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976. С. 200–234.
12. Полюдек-Фабини Р., Бейрих Т. Органический анализ. Л.: Химия, 1981. С. 75.