

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ім. О.В. БОГАТСЬКОГО**

ФЕДОСЕНКО ГАННА ОЛЕКСАНДРІВНА



УДК 543.426: 546.650: 615.07

**ХРОМАТОГРАФІЧНІ ТА ОПТИЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ ДЛЯ
ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ДЕЯКИХ ЛІКАРСЬКИХ
ПРЕПАРАТІВ ПІСЛЯ ОЧИЩЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ОБЛАДНАННЯ**

02.00.02 – аналітична хімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата хімічних наук

Одеса – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі аналітичної хімії та фізико-хімії координаційних сполук Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України

Науковий керівник: доктор хімічних наук, професор
Єгорова Алла Володимирівна,
Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського
НАН України, м. Одеса, провідний науковий співробітник
відділу аналітичної хімії та фізико-хімії координаційних сполук

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, доцент
Сухарев Сергій Миколаєвич,
ДВНЗ «Ужгородський національний університет», м. Ужгород, професор
кафедри екології та охорони навколишнього середовища

кандидат хімічних наук, доцент
Малинка Олена Валентинівна,
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса,
доцент кафедри харчової хімії

Захист відбудеться **13 березня 2018 р. о 10⁰⁰ годині** на засіданні спеціалізованої вченої ради К. 41.219.01 Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України за адресою: 65080, м. Одеса, Люстдорфська дорога, 86.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України (м. Одеса, Люстдорфська дорога, 86).

Автореферат розісланий **“30” січня 2018 року.**

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради, к.х.н.



О.В. Снурнікова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. При виробництві ліків найважливішою вимогою належної виробничої практики (GMP) є очищення обладнання, яка проводиться для запобігання його перехресної контамінації при переході від одного лікарського препарату (ЛП) до іншого. Валідація аналітичної методики контролю залишкових кількостей препарату на обладнанні після процесу очищення, так само як і валідація будь-якої іншої методики аналізу, ґрунтується на встановленні її основної метрологічної характеристики – максимально допустимої невизначеності результату вимірювання $max(\Delta_x)$. При валідації методик контролю якості ЛП максимально допустима невизначеність результатів вимірювання встановлюється на підставі нормативного допуску вмісту активного фармацевтичного інгредієнту (АФІ) в препараті. Величина $max(\Delta_x)$ служить основою розрахунку критеріїв прийнятності, перш за все, лінійності градування. При валідації методик контролю залишкових кількостей ЛП після очищення фармацевтичного обладнання такий підхід неприйнятний, оскільки в кожному конкретному випадку необхідно попередньо встановлювати єдиний норматив – це деяке критичне значення залишків препарату X_{crit} на одиниці площі поверхні обладнання (найчастіше це – максимально допустимий вміст залишків попереднього препарату, що знаходиться на 100 см^2 поверхні фармацевтичного обладнання). Контроль якості очищення обладнання зводиться до того, щоб виявити та кількісно визначити масу препарату на певній одиниці поверхні обладнання. Умовою якісної очистки є вимога того, щоб знайдена, за допомогою даної методики, кількість препарату, не перевищувала значення X_{crit} , яке залежить від багатьох параметрів (площі поверхні обладнання, терапевтичної добової дози попереднього препарату, найменшого розміру серії подальшого препарату та ін.) та дуже сильно варіюється від препарату до препарату. Для визначення залишкових кількостей АФІ у фармацевтичній промисловості необхідні методи, що характеризуються селективністю по відношенню до аналіту та домішкам – продуктам деградації, що виникають у технологічному процесі та при відмиванні, а також високою чутливістю. До таких методів, як правило, відносяться вискоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), люмінесценція та УФ-спектроскопія.

Суттєво, що методичну базу визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання в Україні тільки починають створювати. У зв'язку з цим актуальність даної роботи полягає у науковому обґрунтуванні та створенні нових методик контролю чистоти обладнання фармацевтичного виробництва, системному дослідженні їх хіміко-аналітичних та метрологічних параметрів, науковому обґрунтуванні підходів до валідації методик визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання, що дозволить забезпечити конкурентну спроможність фармацевтичної продукції вітчизняних виробників. Обґрунтований вибір методик аналізу дозволить оптимізувати систему контролю якості фармацевтичного підприємства, досягти економічної ефективності використання контрольної-вимірювальної апаратури.

Зв'язок роботи з науковими темами, програмами, планами. Дисертаційна робота виконана у відділі аналітичної хімії та фізико-хімії координаційних сполук Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України у відповідності з відомчими темами «Біоаналітичне застосування люмінесцентних зондів на основі нових комплексних сполук лантанідів» (2013 – 2014 рр., номер держ. реєстрації 0113U000198); «Розробка, методичне та метрологічне обґрунтування способів контролю якості дозованих лікарських форм флупіртину малеату та розувастатину кальцію» (2015 – 2016 рр., номер держ. реєстрації 0115U001061); «Розробка та валідація методик визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання» (2017 – 2018 рр., номер держ. реєстрації 0217U000101).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у розробці теоретичного підходу до валідації методик визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання, а також у створенні комплексу високочутливих, специфічних та експресних способів хімічного контролю чистоти обладнання на прикладі ряду лікарських препаратів при використанні хроматографічних та оптичних методів аналізу.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- розробити підходи до валідації методик визначення залишкових кількостей лікарських препаратів (ЛП) при очищенні фармообладнання;
- розробити способи специфічної пробопідготовки для визначення аналітів при контролі якості очищення фармообладнання;
- розробити хроматографічні та оптичні методики аналізу для одно- та багатокомпонентних лікарських засобів, встановити фактори, що забезпечують чутливість та специфічність визначень аналітів в змивах з технологічного обладнання;
- встановити метрологічні характеристики розроблених методик для підтвердження їх відповідності встановленим критеріям та визначити сфери їх практичного застосування.

Об'єкт дослідження – контроль якості очищення фармацевтичного обладнання.

Предмет дослідження – теоретичні підходи встановлення критеріїв очищення фармацевтичного обладнання, розробка та валідація методик визначення залишкових кількостей деяких АФІ для контролю чистоти фармацевтичного обладнання.

Методи дослідження – ВЕРХ, високоефективна тонкошарова хроматографія (ВЕТШХ), люмінесценція, спектрофотометрія, атомно-емісійна спектрометрія з індуктивно-зв'язаною плазмою (АЕС-ІЗП) та поляриметрія.

Наукова новизна одержаних результатів. Методами математичної статистики з урахуванням вимог GMP розроблені підходи до валідації методик визначення залишкових кількостей ЛП при очищенні фармацевтичного обладнання та показана можливість їх практичного використання при розробці різних методик (хроматографічних, оптичних) визначення компонентів при виробництві одно- та багатокомпонентних лікарських засобів.

Розроблено та валідовано хроматографічні та оптичні методики визначення залишкових кількостей деяких АФІ на поверхнях фармацевтичного обладнання. Встановлено, що в разі багатокомпонентних лікарських засобів визначення залишкових кількостей АФІ в змивах після очищення фармацевтичного обладнання необхідно проводити по мажорним та важкорозчинним АФІ.

Вперше запропоновано для ВЕРХ кількісного визначення амінокислот (L-валіну, L-лейцину та L-ізолейцину) застосування предколонної дериватизації з реагентом, який широко використовується в органічному синтезі для захисту аміногруп – ди-трет-бутилдикарбонатом.

Вперше запропоновано методику визначення залишкових кількостей рослинної сировини – сухого екстракту листя гінкго білоба (за вмістом кверцетину) методом ВЕТШХ в змивах при очищенні фармацевтичного обладнання. Виявлено, що монотонна зміна інтенсивності абсорбції в залежності від часу перебування кверцетину на поверхні сорбенту пов'язана з його взаємодією з флуоресцентним індикатором UF 254 – силікатом цинку (II). Доведено позитивний вплив фосфорної кислоти, яка перешкоджає комплексоутворенню, що сприяє стабільності аналітичного сигналу.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблені експресні та високочутливі методики хроматографічного (ВЕРХ, ВЕТШХ) та оптичного (спектрофотометричного, люмінесцентного, поляриметричного, АЕС-ІСП) визначення ряду ЛП в змивах з технологічного

обладнання. Методики визначення левана, флупіртину малеату, розувастатину кальцію, фенібуту та парацетамолу впроваджені у практику роботи фармацевтичного підприємства ТДВ «ІНТЕРХІМ» (м. Одеса).

Особистий внесок здобувача. Аналіз літературних даних, основний об'єм експериментальних досліджень та обробка одержаних результатів виконані безпосередньо автором. Встановлення мети та завдань дослідження, аналіз отриманих результатів, а також формулювання загальних висновків проведено спільно з науковим керівником.

Автор вдячний за допомогу у виконанні експериментальної частини роботи співробітникам НДАЛ (ТДВ «ІНТЕРХІМ») – Сухоставській Н. М. (використання ВЕРХ з рефрактометричним детектором), Гончаренко І. П. (застосування атомно-емісійного спектрометра з індуктивно-зв'язаною плазмою), к.х.н. Ю. В. Скрипинець (люмінесцентні дослідження). Автор висловлює щире подяку Г. В. Мальцеву (ТДВ «ІНТЕРХІМ») за корисні рекомендації та критичні зауваження.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали дисертаційної роботи доповідалися на Київській конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції (Київ, 2014, 2015, 2016 та 2017), Всеукраїнській науковій конференції студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання» (Харків, 2015 та 2017), Международной научной конференции «Теоретическая и экспериментальная химия глазами молодежи – 2015» (Иркутск, Россия, 2015), 7th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (Varna, Bulgaria, 2015), X Науково-практичній конференції «Управління якістю в фармації» (Харків, 2016), XVII Конференции молодых учёных и студентов-химиков южного региона Украины с международным участием (Одесса, 2015), IXth International conference in chemistry Kyiv-Toulouse (Kyiv, 2017).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 7 статей у фахових періодичних наукових виданнях, 12 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій. Отримано 2 патенти України на корисні моделі.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з вступу, 4 розділів, висновків, списку цитованої літератури, що нараховує 128 найменувань, містить 46 рисунків, 12 таблиць та 3 додатки. Загальний обсяг дисертації складає 168 сторінки машинописного тексту.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність теми, сформульовано мету та завдання дослідження, зазначено наукову новизну та практичне значення одержаних результатів.

У першому розділі систематизовані та проаналізовані літературні дані о методах визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання. Показані можливості застосування для цих цілей ряду неспецифічних та специфічних аналітичних методів. На основі огляду літератури сформульовані мета та завдання дисертаційного дослідження.

У другому розділі описані вихідні речовини, охарактеризовано використане обладнання та апаратура. Для приготування рухомих фаз, розчинів порівняння випробовуваних АФІ та змивів застосовували метанол, ацетонітрил (кваліфікації для ВЕРХ, МЕРСК), воду для хроматографії та бідистильовану. В роботі використовували реактиви кваліфікації не нижче ч.д.а.

Спектри люмінесценції та збудження реєстрували за допомогою спектрофлуориметра Cary Eclipse “Varian” (Австралія) з ксеноновою лампою 150-W. Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі UV-2401 PC “Shimadzu” (Японія).

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі Agilent 1260 Infinity 2D LC System (США) з рефрактометричним детектором, УФ- та діодно-матричним детектором, а також мас-спектрометричним детектором (6530 Accurate Mass Q-TOF, Agilent Technologies, США, джерело іонізації – електроспрей (ESI))

Кут обертання площини поляризації розчину при температурі $(20 \pm 0,5)$ °C визначали на поляриметрі P8000 (Kruess, Німеччина).

У методі ВЕТШХ на лінію старту хроматографічної пластинки розчини наносили за допомогою напівавтоматичного аплікатора Linomat 5 (CAMAG, Швейцарія), хроматографічне розділення проводили у вертикальній камері (CAMAG, Швейцарія) та сканування здійснювали на хроматоденситометрі серії TLC SCANNER 4, фірми CAMAG, Швейцарія.

Вимірювання інтенсивності ліній калію (натрію) проводили на атомно-емісійному спектрометрі з індуктивно-зв'язаною плазмою (ICAP 7400 DUO; Thermo Fisher Scientific Inc, США).

Значення рН розчинів вимірювали за допомогою рН-метру Lab 850 "Schott Instruments GmbH" (Німеччина) із скляним електродом.

У третьому розділі наведена розробка підходів до встановлення критеріїв прийнятності для валідації аналітичної методики контролю якості очищення обладнання (теоретична частина). Валідація аналітичних методик контролю залишкових кількостей препарату на обладнанні після процесу очищення ґрунтується на встановленні вимог до її невизначеності. Головною відмінністю контролю якості лікарських засобів від контролю якості очищення фармообладнання є те, що для аналізу ЛП номінальні значення вмісту та допуски вже наперед задані, що і дозволяє в кінцевому підсумку розробити стандартизовані підходи до валідації та встановити стандартні критерії прийнятності. Завдання контролю якості очищення фармообладнання зводиться до того, щоб виявити та кількісно визначити масу препарату на деякій одиниці поверхні обладнання. Основною вимогою до якості очищення є вимога того, щоб знайдене за допомогою даної методики кількість препарату не перевищувало деякого критичного значення гранично допустимої концентрації (ГДК, мкг/мл), яке в свою чергу залежить від багатьох параметрів (в тому числі від площі поверхні обладнання) та дуже сильно варіюється від препарату до препарату.

Нехай проводиться вимірювання, при якому кожній концентрації аналіту x_i ставиться у відповідність відгук детектора (або аналітичний сигнал) y_i . При певному варіюванні концентрації аналіту ми отримуємо відповідне варіювання значень аналітичного сигналу. Далі приймається, що між величинами x та y існує деяка залежність. Оскільки в аналітичній практиці, як правило, використовується лінійне детектування, то відгук детектора налаштовується таким чином, щоб між величинами x та y зберігалася лінійна залежність: $y = \alpha + \beta \cdot x$ (генеральна математична модель). Лінійна функція $Y = a + b \cdot x$ (лінія регресії) є вибірковою оцінкою генеральної математичної моделі. Точність лінії регресії при цьому характеризується:

– залишковим стандартним відхиленням s_e :

$$s_e = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} [y_i - (a + b \cdot x_i)]^2}{n - 2}}, \quad 1$$

– стандартним відхиленням s_b для оцінки кутового коефіцієнта b :

$$s_b = \frac{s_e}{\sqrt{(n - 1) \cdot s_x^2}}, \quad 2$$

– стандартним відхиленням s_a для оцінки вільного члена a :

$$s_a = \frac{s_e}{\sqrt{n}} \sqrt{1 + \frac{n \cdot \bar{x}^2}{(n - 1) \cdot s_x^2}}, \quad 3$$

– довірчим інтервалом Δ_y аналітичного сигналу y_k , передбаченого лінією регресії, для цього значення $x = x_k$ вмісту аналіту:

$$\Delta_y = t(P, f) \cdot \frac{s_e}{\sqrt{n}} \cdot \sqrt{1 + \frac{n \cdot (x_k - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2}}, \quad 4$$

– коефіцієнтом детермінації (або мірою визначеності) R^2 , показує яка частка варіації аналітичного сигналу пояснюється зміною вмісту аналіту при обраній генеральній моделі:

$$R^2 = 1 - \frac{(n-2)}{(n-1)} \cdot \frac{s_e^2}{s_y^2}, \text{ де}$$

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \text{ – стандартне відхилення для діапазону вмісту аналіту,}$$

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (y_i - \bar{y})^2}{n-1}} \text{ – стандартне відхилення для аналітичних сигналів,}$$

$t(P, f)$ – двобічний квантиль розподілу Стьюдента, для довірчої ймовірності P та ступенів свободи $f = n - 2$.

Межею кількісного визначення методики (МКВ, x_{LQD}), що розраховується з градууювального графіка, називають величину, яка є десятикратним відношенням стандартного відхилення оцінки вільного члена градууювальної залежності до її кутового коефіцієнта:

$$x_{LQD} = \frac{10 \cdot s_a}{b} \text{ Скориставшись стандартним відхиленням } s_a \text{ для оцінки вільного члена } a \text{ (вираз 3),}$$

отримаємо:

$$x_{LQD} = \frac{10 \cdot s_e}{b \cdot \sqrt{n}} \cdot \sqrt{1 + \frac{n \cdot \bar{x}^2}{(n-1) \cdot s_x^2}}. \quad 5$$

Вміст аналіту x_k , дасть прогноз для значення аналітичного сигналу y_k , що лежить в інтервалі $y_k = a + b \cdot x_k \pm \Delta_y$, де Δ_y визначається формулою (4). Тоді аналітичний сигнал y_k дасть прогноз для вмісту аналіту x_k з довірчим інтервалом Δ_x :

$$\Delta_x = \frac{\Delta_y}{b} = t(P, f) \cdot \frac{s_e}{b \cdot \sqrt{n}} \cdot \sqrt{1 + \frac{n \cdot (x_k - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2}}. \quad 6$$

Комбінація виразів (5) і (6) дає залежність невизначеності вмісту аналіту Δ_x від МКВ:

$$\Delta_x = t(P, f) \cdot \frac{x_{LQD}}{10} \cdot \sqrt{\frac{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_k - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot \bar{x}^2}}. \quad 7$$

Ми формулюємо вимоги до МКВ наступним чином: *межа кількісного визначення є достатньою для аналізу за даною методикою та незначимо впливає на прийняття рішення про якість, якщо вона в свою чергу є незначною у порівнянні з граничним вмістом аналіту*. Відповідно до принципу незначущості, для цього достатньо, щоб МКВ не перевищувала 32% граничного значення вмісту аналіту x_{crit} , тобто

$$\max(x_{LQD}) = 0.32 \cdot x_{crit} \text{ або у відносних одиницях}$$

$$\max(X_{LQD})\% = \frac{\max(x_{LQD})}{x_{crit}} \cdot 100\% = 32\% \quad 8$$

Таким чином, з виразів (7) та (8), отримаємо остаточний вираз для відносної максимально допустимої невизначеності методики:

$$\max(\Delta_x)\% = 3.2 \cdot t(P, f) \cdot \sqrt{\frac{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_{crit} - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot \bar{x}^2}}. \quad 9$$

Далі нами були встановлені вирази критеріїв прийнятності для валідаційних характеристик лінійності: коефіцієнта кореляції; залишкового стандартного відхилення; вільного члена рівняння градувального графіка (критерії статистичної та практичної незначущості) та його кутового коефіцієнта в нормалізованих координатах (табл. 1).

Таблиця 1

Критерії прийнятності для валідаційних характеристик лінійності

Валідаційна характеристика	Статистичний критерій	Практичний критерій
Коефіцієнт кореляції		$r \geq r_{min} = \sqrt{1 - \frac{n \cdot (n-2) \cdot \max(\Delta_x)^2}{t^2(P, f) \cdot ((n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_{crit} - \bar{x})^2)}}$
Залишкове стандартне відхилення ($S_e\%$)		$S_e \leq \frac{s_x \cdot \max(\Delta_x)}{t(P, f)} \cdot \sqrt{\frac{n \cdot (n-1)}{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_{crit} - \bar{x})^2}}$
Вільний член регресії ($a\%$)	$ a < \Delta_a = t(P, f) \cdot S_a$	$\max a = \max(\Delta_a\%) = 3.2 \cdot t(P, f)$
Кутовий коефіцієнт ($b\%$)	$ 1 - b < \Delta_b = t(P, f) \cdot S_b$	
Межа кількісного визначення (МКВ)		не більше 32 % від ГДК

Визначення допустимого рівня забруднення за методом «найгіршого випадку»

При розрахунку межі вмісту АФІ на обладнанні після виробництва та очищення використовували підхід, який заснований на принципі «найгіршого випадку» з активності та на допущенні перенесення певної частки першого АФІ у наступне з урахуванням добових доз. Ця частка зменшується в залежності від т. з. фактора безпеки (допустимої частки попереднього АФІ від його терапевтичної дози в максимальній добовій дозі наступного), безрозмірної величини, який є фактором оцінки ризику. Для препаратів перорального застосування (таблетки, капсули, саше та ін.) використовують значення від 0,1% до 1,0%. У даній роботі значення фактора безпеки для різних препаратів варіювалося від 0,004 % до 1,0 %, в залежності від чутливості методу, так щоб забезпечити виконання вимоги до МКВ – не більше 32% від ГДК.

Гранично допустима маса попереднього продукту в максимальній добовій дозі наступного, D (мг) складе: $D = \frac{TD \cdot SF}{100}$, де: TD – терапевтична доза попереднього продукту, мг; SF – фактор

безпеки,%. Теоретичне гранично допустиме значення залишків попереднього продукту на всьому обладнанні після очищення E_T (мг): $E_T = \frac{D \cdot N_1}{m_0 \cdot N_2} \cdot 10^3$, де: N_1 – найменше завантаження таблетмаси наступного продукту, кг; N_2 – максимальне число дозованих форм в добовій дозі наступного продукту, шт; m_0 – маса однієї дозованої форми наступного продукту, г.

З урахуванням того, що на всій площі S_2 , яка контактує з продуктом, має знаходитись E_T мг попереднього продукту, в пробі, взятої з ділянки обладнання з поверхнею пробовідбору площею S_1 , має знаходитись теоретично гранично допустима кількість маси залишків попереднього продукту в пробі (в змиві з площі S_1) – МАСО (мкг/сваб): $MASO = \frac{E_T \cdot S_1}{S_2} \cdot 10^3$. Гранично допустима

концентрація вмісту аналіту – ГДК (x_{crit}) – розраховується з урахуванням обсягу розчинника, використовуваного для вилучення АФІ зі свабу.

Приклад. Для встановлення критеріїв прийнятності валідації аналітичної методики контролю якості очищення обладнання та визначення допустимого рівня забруднення за методом «найгіршого випадку» розглянута методика визначення АФІ деквалінію хлориду (ДХ) в змивах методом ВЕРХ. *Розрахунок ГДК залишків попереднього препарату:* для фактичного розрахунку *MACO* для ДХ був обраний наступний препарат з найбільшою максимальною добовою дозою, який виробляється на виробничій ділянці ТДВ «ІНТЕРХІМ» – а саме ТРАНКВІЛАР® ІС, таблетки по 0,5 г АФІ, максимальне число дозованих форм в добовій дозі якого становить $N_2 = 20$ шт, а найменше завантаження таблетмаси серії – $N_1 = 0,150$ кг, номінальна маса однієї таблетки $m_0 = 0,550$ г. Терапевтична доза попереднього препарату, що містить ДХ, становить 6 таблеток згідно з інструкцією до застосування. Вміст АФІ ДХ в 1 таблетці – 0,25 мг, таким чином, терапевтична доза ДХ дорівнює 1,5 мг. Загальна площа робочого обладнання, яка контактує з продуктом, становить $S_2 = 8165$ см². При факторі безпеки $SF = 1$ %, гранично допустиме значення маси залишків деквалінію хлориду в змиві з площі $S_1 = 100$ см² складе $MACO = 2,5$ мкг/сваб. Оскільки з одного свабу вилучення аналіту проводять 5,0 мл розчинника, то гранично допустима концентрація (ГДК) вмісту аналіту складає $x_{crit} = 0,5$ мкг/мл.

За отриманими хроматографічними результатами (рисунок 1) будують градувальний графік, відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій деквалінію хлориду, у відсотках від ГДК, а по осі ординат – нормалізовані значення площ піків (рисунок 2).

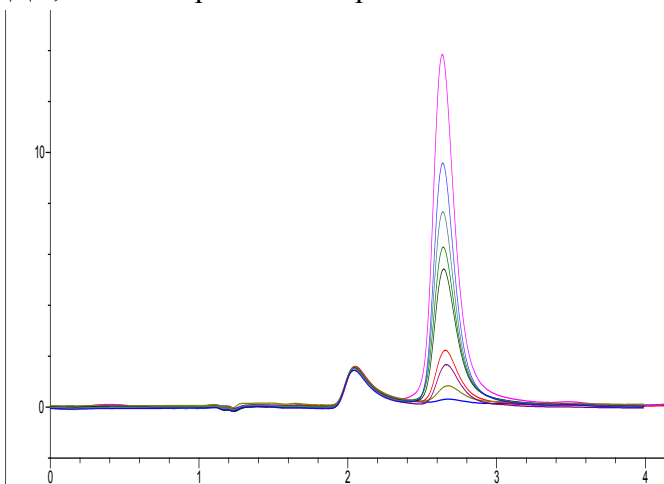


Рис. 1. Хроматограми розчинів деквалінію хлориду

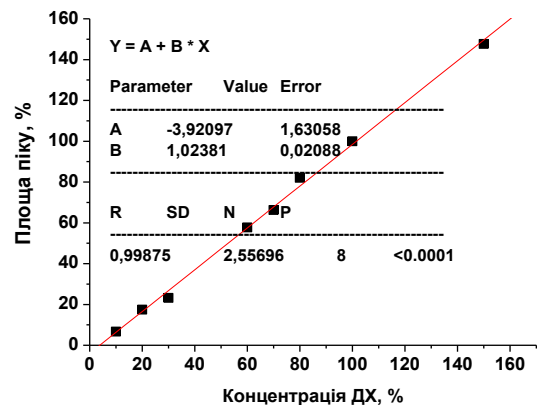


Рис. 2. Градувальний графік залежності площі піку ДХ від концентрації

МКВ методики склала 0,08 мкг/мл. Ця кількість складає 16% від $x_{crit} = 0,5$ мкг/мл та не перевищує його максимального допуску – 0,16 мкг/мл, тобто 32 % від гранично допустимого вмісту аналіту. Результати за розрахунком критеріїв прийнятності лінійної залежності для методики визначення залишкових кількостей деквалінію хлориду в змивах після очищення обладнання наведені в таблиці 2.

Як видно з представлених в таблиці даних, всі параметри лінійної залежності площ піків ДХ від концентрацій, побудованої у відносних координатах, витримують встановлені вимоги до валідаційних характеристик в умовах даної методики.

Таким чином, у результаті дослідження був розроблений теоретичний підхід для визначення основної метрологічної характеристики аналітичних методик контролю якості очищення обладнання – максимально допустимої невизначеності результату вимірювання. Встановлено критерії для перевірки лінійності градувальних залежностей, прецизійності та відтворюваності методик визначення залишків АФІ після очищення фармацевтичного обладнання.

Критерії прийнятності параметрів градуюваного графіка для визначення ДХ

Параметр лінійної залежності	Фактичне значення	Довірчий інтервал, Δt (95 %, 6) = 2,4469	Вимога	Висновок
коефіцієнт лінійної кореляції r	0,99876	–	не менше 0,99495	відповідає
кутовий коефіцієнт регресії b	1,0238	0,0511	$ 1 - b \leq \Delta_b$	відповідає
вільний член регресії a	- 3,92	3,99	$ a \leq \Delta_a$	відповідає
залишкове стандартне відхилення S_e	2,56	–	не більше 5,02	відповідає
МКВ	0,08 мкг/мл	–	не більше 0,16 мкг/мл (32 % від ГДК)	відповідає

У четвертому розділі наведено результати розробки методик визначення залишкових кількостей деяких АФІ в змивах з фармацевтичного обладнання. Приготування випробовуваних розчинів, визначення ступеня вилучення та обробку результатів для розроблених методик проводили за наведеними уніфікованим прописами та формулами. Концентрації аналітів визначали за градуювальними графіками.

Випробовуваний розчин. Аплікатор зі змивом з поверхні фармообладнання (площа змиву – 100 см²) поміщають у хімічну склянку місткістю 25 мл, додають 5,0 мл відповідного розчинника та проводять десорбцію протягом 10 хв. При необхідності розчин проби розбавляють до концентрації, яка знаходиться в інтервалі лінійності градуювального графіка.

Вміст аналіту (X), в мікрограмах в змиві, розраховують за формулою:

$$X = C \cdot V \cdot \frac{100}{k}$$

де: C – концентрація аналіту, отримана з градуювального графіка, в мкг/мл; V – об'єм розчинника, який використовується для вилучення АФІ зі свабу; k – ступінь вилучення.

Ступінь вилучення. У модельних дослідах в ході валідації методики робили змиви свабом, змоченим відповідним розчинником, з поверхні (100,0 см²), на яку штучно наносили розчини аналіту відомих концентрацій та висушували, далі проводили вилучення відповідним об'ємом розчинника протягом 10 хв (отримували розчини декількох концентрацій, які знаходяться в інтервалі лінійності градуювального графіка). Далі визначали вміст аналіту. Ступінь вилучення аналіту (k , %) розраховують за формулою:

$$k = \frac{\text{встановлена кількість речовини}}{\text{нанесена кількість речовини}} \cdot 100$$

Оптичні методи аналізу

Спектрофотометричне визначення. Для визначення тилорону, L-5-гідрокситриптофану, колагену, бензобіталу в змивах після очищення технологічного обладнання розроблені нові спектрофотометричні методики. Методики засновані на вимірюванні світлопоглинання розчинів даних АФІ в залежності від їх концентрацій.

Визначення колагену запропоновано проводити колориметричним методом Лоурі. У

лужному середовищі іони Cu^{2+} утворюють комплекс з пептидними зв'язками, переходячи в Cu^+ . Одновалентні іони міді реагують з реактивом Фоліна, утворюючи нестабільний продукт, що переходить у молібденову синь з максимумом адсорбції при 750 нм. Збільшення адсорбції при 750 нм пропорційно концентрації білка. Метод дуже чутливий до наявності в розчині сторонніх відновлювачей. Встановлено, що компоненти плацебо не заважають визначенню білку.

Визначення тилорону, L-5-гідрокситриптофану, бензобіталу проводили в УФ-області спектру.

Для прикладу на рисунку 3 представлені спектри поглинання тилорону з максимумом за довжини хвилі 270 нм (а) та градувальний графік (б) в інтервалі концентрацій 0,1 – 5,0 мкг/мл.

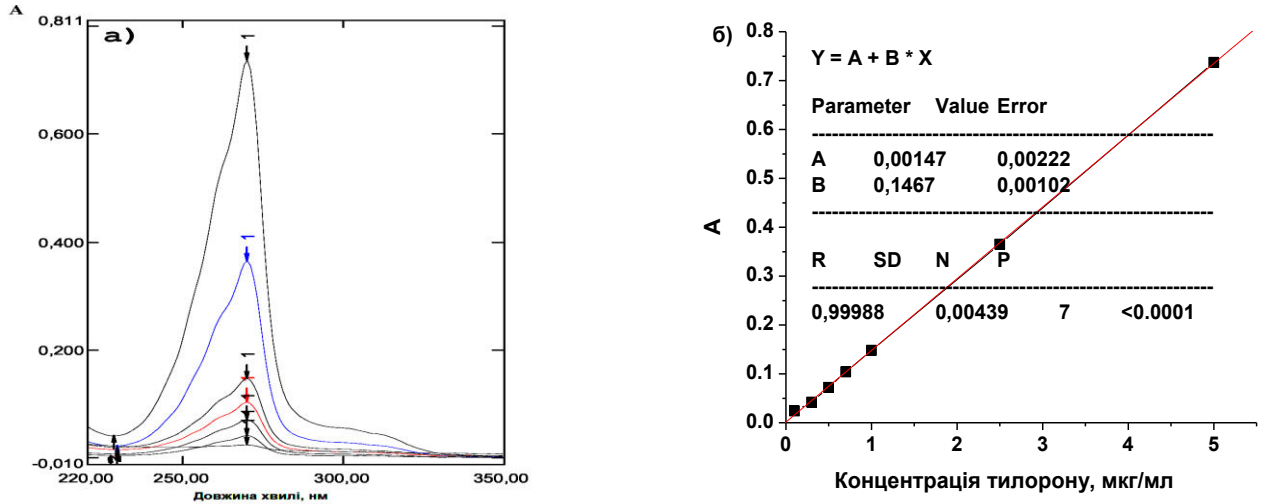


Рис. 3. Спектри поглинання розчинів тилорону (а) та градувальний графік (б) для його визначення

Люмінесцентне визначення. Для люмінесцентного визначення залишкових кількостей АФІ (розувастатину кальцію, флупіртину малеату, абіратерону ацетату, ривастигміну гідротартрату) на поверхнях фармацевтичного обладнання вивчено вплив на інтенсивність люмінесценції різних розчинників. Встановлено, що максимальна інтенсивність люмінесценції розувастатину кальцію спостерігається у метанолі, флупіртину малеату – у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти (рис. 4, а), абіратерону ацетату – у етанолі.

Для флупіртину малеату (ФМ) із збільшенням рН в ацетатно-аміачному буферному розчині спостерігається зменшення власної інтенсивності люмінесценції ФМ (в ~ 3 рази) (рис. 4, б). Для подальших досліджень вибрано розчинення субстанції в 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти, так як в цьому випадку $I_{\text{люм}}$ розчину ФМ максимальна.

Для прикладу на рис. 5 представлені спектри власної люмінесценції розчинів ФМ (а) та градувальний графік (б) для його люмінесцентного визначення.

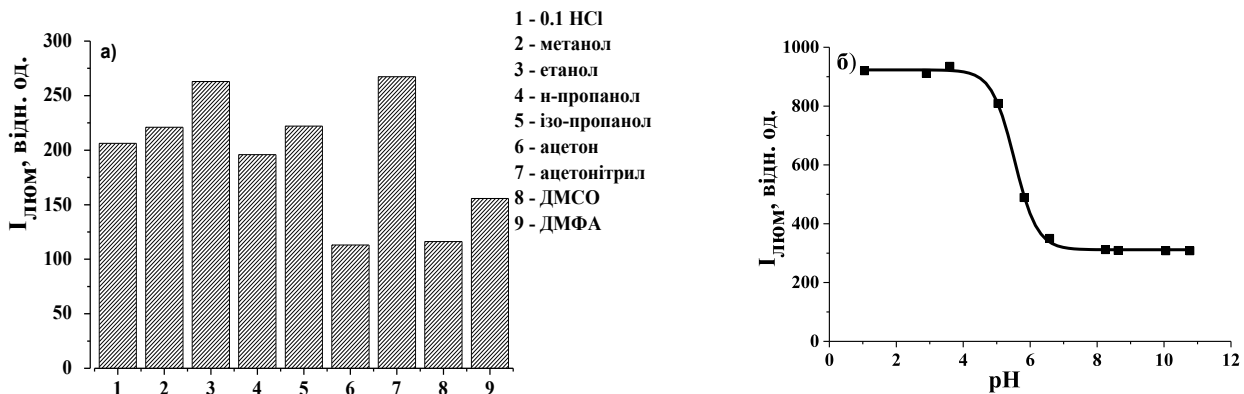


Рис. 4. Вплив органічних розчинників на інтенсивність люмінесценції розчину ФМ ($C_{\text{ФМ}}=0,1$ мкг/мл; $\lambda_{\text{збуд}} = 345$ нм; щілини 10-10; посилення 600) та залежність $I_{\text{люм}}$ ФМ (б) від рН ($\lambda_{\text{ем}}=427$ нм)

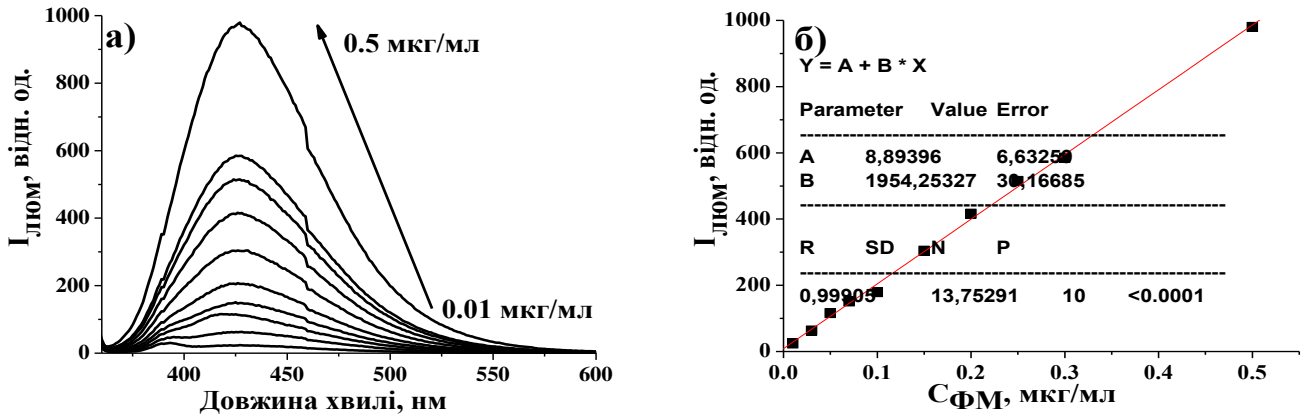


Рис. 5. Спектри власної люмінесценції розчинів ФМ (а) (щілини 10-10) ($\lambda_{збуд}$ =345 нм; посилення 600) та градувальний графік (б) для його люмінесцентного визначення

Поляриметричне визначення.

Розроблено та валідовано методику поляриметричного визначення залишкових кількостей АФІ глюкози на поверхнях фармацевтичного обладнання при виробництві лікарського препарату РЕГІСОЛ, порошок для орального розчину по 18,9 г у саше. Встановлена лінійна залежність кута обертання від вмісту глюкози (рис. 6) для її кількісного визначення. Градувальний графік лінійний в діапазоні концентрацій глюкози 0,5 – 12,0 мг/мл.

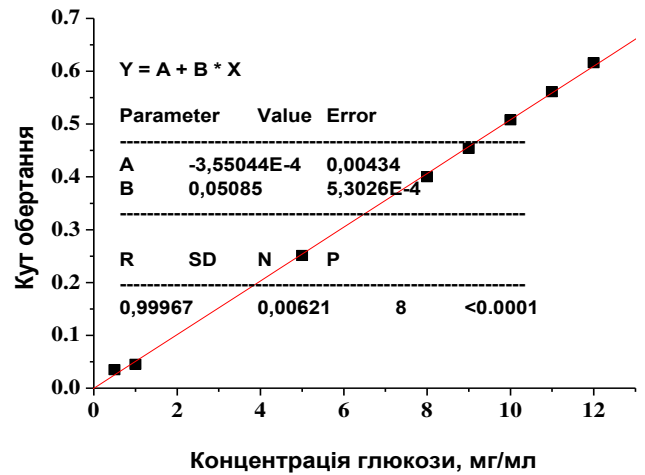


Рис. 6. Лінійна залежність кута обертання від концентрації глюкози

Атомно-емісійне визначення з індуктивно-зв'язаною плазмою. Вперше застосовано АЕС-ІЗП для визначення мікрокількостей калію та натрію при виробництві багатокомпонентного засобу РЕГІСОЛ® НЕО (саше), який містить натрію хлорид, калію хлорид, натрію цитрат. Вимірюють інтенсивності емісії (рис. 7) на атомно-емісійному спектрометрі з індуктивно-зв'язаною плазмою, використовуючи наступні параметри: аналітична лінія К – 766,490 нм; аналітична лінія Na – 818,326 нм; режим спостереження плазми – аксіальний; потужність плазми – 1150 Вт; час інтегрування сигналу – 60 с; допоміжний потік аргону – 0,5 л/хв.

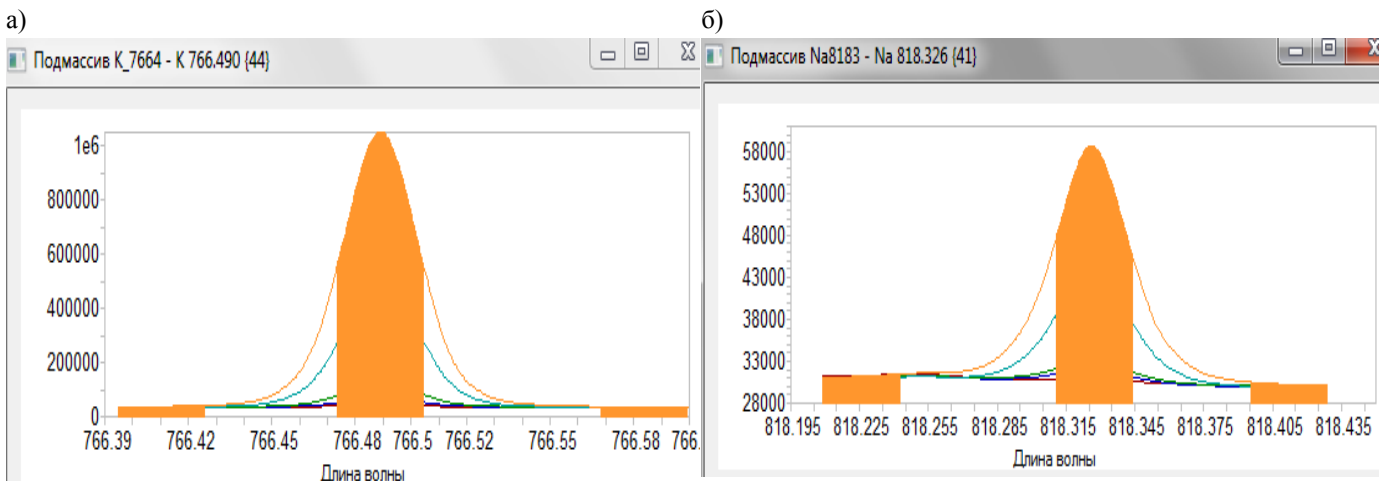


Рис. 7. Спектри емісії розчинів порівняння, одержаних при визначенні калію (а) та натрію (б)

Встановлена лінійна залежність емісії розчинів калію та натрію від концентрації в інтервалі 50 – 5000 мкг/л).

Хроматографічні методи аналізу

ВЕРХ- визначення. В роботі використана високоефективна рідинна хроматографія з різними детекторами – УФ-, рефрактометричним та мас-спектральним. Проведено оптимізацію умов аналізу (тип сорбенту, геометрія колонки, температура колонки, склад елюенту, діапазон концентрацій органічного модифікатора у рухомій фазі, довжина хвилі та інші) та запропоновані нові методики визначення залишків силденафілу цитрату, фенспіриду та клонідину гідрохлоридів, левана, розувастатину кальцію, ривастигміну гідротартрату, даклатасвіру дигідрохлориду, фенібуту методом ВЕРХ.

Для прикладу наведено умови хроматографування для визначення розувастатину кальцію (РК): рідинний хроматограф с УФ-детектором; колонка з нержавіючої сталі розміром 0,15 м x 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії типу Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ с розміром часток 5 мкм; рухома фаза: 0,2 % (об/об) розчин кислоти оцтової : ацетонітрил (50:50); швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв; температура колонки: 25 °С; температура автосамплера: 4 °С; час хроматографування: 6 хв; детектування за довжини хвилі: 248 нм; об'єм інжекції: 100 мкл; час утримування розувастатину: 3,0 хв. Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій РК 0,01 – 1,0 мкг/мл.

Також розроблена методика люмінесцентного визначення. Встановлено, що зі збільшенням концентрації метанольного розчину розувастатину кальцію спостерігається збільшення інтенсивності його власної люмінесценції. Концентраційний діапазон методики – 0,1 – 10,0 мкг/мл. Було встановлено, що кількісний витяг розувастатину кальцію в кінцевий розчин становить 93,2% – 97,1% (ВЕРХ) та 90,9% – 95,6% (люмінесценція) (табл. 3).

Таблиця 3

Порівняння ступенів вилучення РК, одержаних за ВЕРХ та люмінесцентним методами

№ проби	Ступінь вилучення розувастатину кальцію $k, \%$						Порівняння методів	
	ВЕРХ			Люмінесценція			$F_{ex} = \frac{S_{max}^2}{S_{min}^2}$	$F_{табл}(95 \%, 4, 4)$
	Знайдено	$k_{cp} \pm \Delta_k$	$S_r, \%$	Знайдено	$k_{cp} \pm \Delta_k$	$S_r, \%$		
1	93,25	95,55 $\pm 1,92$	1,62	90,94	93,40 $\pm 2,27$	1,96	1,396	6,388
2	95,30			95,62				
3	96,81			92,54				
4	97,14			93,23				
5	95,23			94,67				

Для порівняння двох методів застосували статистичний критерій F -розподілу. На підставі того, що $F_{екс} < F_{табл}$ можна зробити висновок, що розбіжність між дисперсіями для двох наборів даних можна визнати статистично незначущим з імовірністю 95%.

Отримані дані вказують на задовільну збіжність результатів, отриманих двома різними методами. Перевагою люмінесцентного методу є простота виконання аналізу та невелика витрата реагентів, однак, ВЕРХ метод дозволяє отримувати більш низьку межу виявлення (на порядок величини).

Для розроблених методик встановлені показники придатності хроматографічних систем при визначенні вивчених препаратів (фактор симетрії піку, число теоретичних тарілок, відносне стандартне відхилення часу утримування та площі піку). Оцінка ключових показників придатності хроматографічної системи виявила перспективу їх використання для контролю залишкових кількостей АФІ в змивах з технологічного обладнання фармацевтичного виробництва.

На відміну від відомого способу визначення амінокислот за допомогою методу ВЕРХ з попередньою процедурою їх предколонної дериватизації з використанням *o*-фталевого альдегіду в якості дериватизуючого агента, який потребує використання другого компонента – сульфурвмісного нуклеофілу та автосамплеру приладу, який дозволяє проводити дериватизацію в автоматичному режимі внесення, розведення і змішування та спеціальну колонку Zorbax Eclipse AAA, що приводить до високої вартості аналізу, нами вперше розроблено та валідовано методику визначення залишкових кількостей L-валіну, L-лейцину та L-ізолейцину (після виробництва дієтичної добавки «ВСАА смарт») в змивах методом обернено-фазової ВЕРХ з УФ-детектуванням (рис. 8) з використанням для предколонної дериватизації ди-трет-бутилдикарбонату (Coc_2O), що застосовується в органічному синтезі для захисту аміногруп.

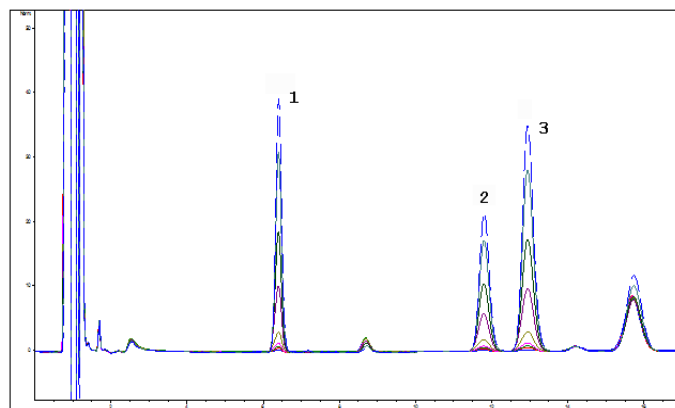
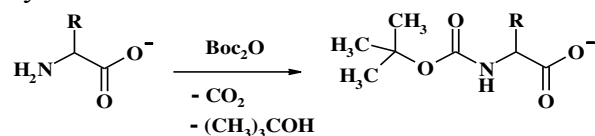


Рис. 8. Хроматограми розчинів РСЗ АК для градувальних графіків, де 1– L-валін, 2– L-ізолейцин, 3– L-лейцин)

В умовах розробленої методики пропонується проводити пробопідготовку в присутності 0,5 М розчину гідроксиду натрію. У лужному середовищі АК знаходяться в аніонній формі та реакція з Coc_2O протікає за наступною схемою:



Градувальні графіки лінійні в інтервалах концентрацій L-валіну 1,5 – 150,0 мкг/мл, L-ізолейцину 1,5 – 150,0 мкг/мл та L-лейцину 3,0 – 300,0 мкг/мл.

При одночасному визначенні декількох ЛП застосовували трьох- або навіть чотирьохкомпонентні рухомі фази, які склалися з метанолу, ацетонітрилу, буферу та алкіламінів, в ізократичному та градієнтному режимах елюювання. При розробці методик аналізу залишкових кількостей АФІ для багатокомпонентних препаратів (АМІЦТРОН[®], АМІЦТРОН[®] ПЛЮС від кашлю – саше; Теофедрин ІС[®], ПЕНТАЛГІН ІС[®], АМІЦТРОН[®] ЕКСТРАТАБ – таблетки), окремі сполуки яких можуть бути присутніми на поверхнях частин обладнання, оптимізацією умов хроматографування забезпечений вихід з колонки усіх компонентів, мінімізований час аналізу.

В якості визначаємого АФІ обрали мажорний компонент (парацетамол), у якого найгірша розчинність. У разі препаратів АМІЦТРОН[®] ПЛЮС від кашлю та Теофедрин ІС[®] додатково визначали другий мажорний компонент (гвайфенезин і теофілін).

На рисунку 9 представлені хроматограми, одержані за методикою для препарату Теофедрин ІС[®]. Градувальні графіки лінійні в інтервалах концентрацій парацетамолу 0,05 – 10,0 мкг/мл та теофіліну 0,05 – 10,0 мкг/мл.

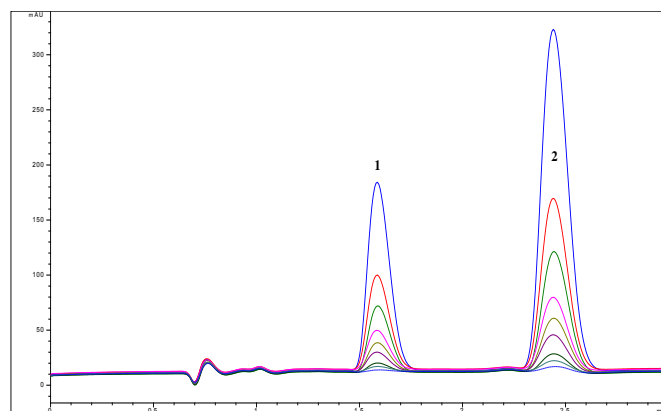


Рис. 9. Хроматограми модельних розчинів РСЗ парацетамолу та теофіліну (1 – парацетамол; 2 – теофілін)

Одним з методів детектування з більш високою чутливістю та специфічністю є мас-спектрометрія. Нами розроблена методика високочутливого визначення слідових кількостей цинхокаїну гідрохлориду (ЦГ) в змивах з поверхонь фармацевтичного обладнання після його очищення з використанням методу рідинної хромато-мас-спектрометрії. Детектування ЦГ проводили за сигналом молекулярного катіона основної речовини з 344 m/z (рис. 10). Встановлено, що запропонована методика характеризується задовільною лінійністю в діапазоні концентрацій від 0,006 мкг/мл до 0,114 мкг/мл (рис. 11).

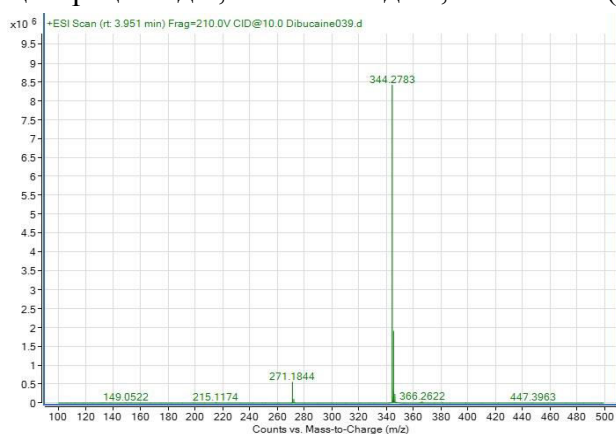


Рис. 10. MS- спектр піку цинхокаїну

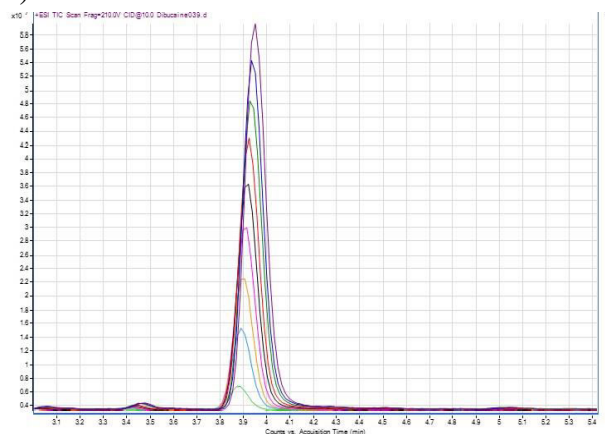
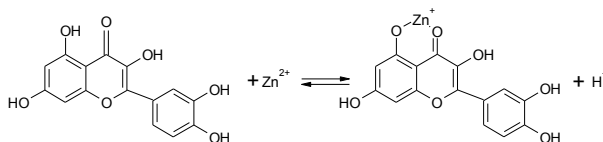


Рис.11. Хроматограми модельних розчинів ЦГ для градувального графіка

ВЕТШХ- визначення. ВЕТШХ застосована для визначення залишкових кількостей сухого екстракту листя гінкго білоба (за вмістом кверцетину) на поверхнях фармацевтичного обладнання. Було виявлено, що спостерігається зміна площі піку кверцетину залежно від часу знаходження речовини на пластинці. Це відбувається внаслідок комплексоутворення кверцетину з силікатом цинку (II) (компонентом флуоресцентного індикатора хроматографічної пластинки) за наступною схемою:



З наведеної схеми взаємодії випливає, що додавання протонної кислоти зміщує рівновагу вліво та перешкоджає комплексоутворенню. Було виявлено, що стабільність досягається при співвідношенні кверцетин – фосфорна кислота (ФК) = 1: 1 (рис. 12).

На рисунку 13 наведені 3D хроматограми за довжиною хвилі сканування 380 нм.

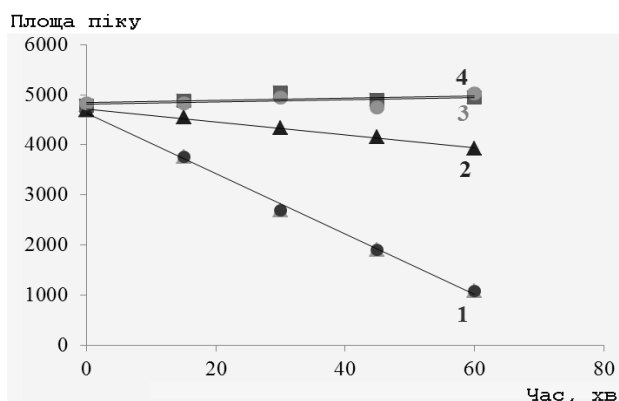


Рис. 12. Залежність площі піка кверцетину від часу знаходження на пластинці та кількості ФК: без кислоти (1), кверцетин : ФК – 2:1 (2), 1:1 (3), 1: 2(4)

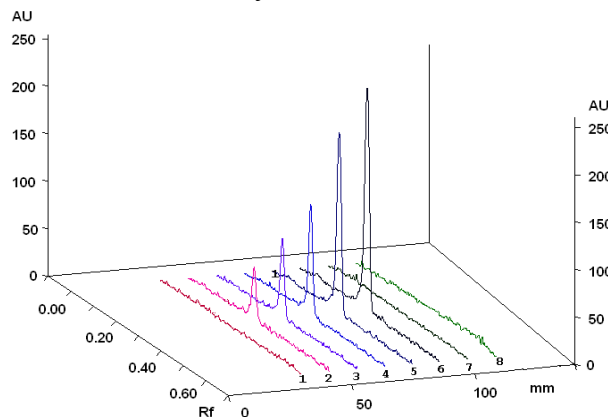


Рис.13. 3D хроматограми розчинів: 1 – з чистого аплікатору; 2 – 6 кверцетину (10, 20, 30, 40, 50 нг/пляму); 7,8 – після обробки свабів

Для розроблених методик встановлені аналітичні характеристики (діапазон лінійності методики, МКВ, ГДК), валідаційні характеристики та їх критерії прийнятності, а також ступені вилучення аналітів.

Аналіз свабів. З використанням розроблених методик проведено визначення залишкових кількостей деяких АФІ на поверхнях фармацевтичного обладнання при виробництві таблеток, саше, капсул, які містять даний АФІ, методом мазків (за допомогою свабів). На хроматограмах, спектрах поглинання та люмінесценції, отриманих при аналізі свабів, якими проводили вилучення залишкових кількостей АФІ з поверхні обладнання, часи утримування піків, максимуми поглинання та люмінесценції на хроматограмах та спектрах досліджуваних розчинів та модельних розчинів РСЗ для градувальних графіків збігаються. Це підтверджує специфічність визначення АФІ, присутніх в змивах та в розчинах РСЗ, а також відсутність в змивах продуктів їх деградації.

Результати визначення залишкових кількостей АФІ з поверхні технологічного обладнання виробничої дільниці ГЛЗ підприємства ТДВ «ІНТЕРХІМ» представлені в підсумковій таблиці 4.

З таблиці 4 можна зробити висновок, що всі результати визначення залишкових кількостей АФІ не перевищують гранично допустиме значення залишків в змивах, що свідчить про задовільну якість очищення відповідного обладнання.

Таблиця 4

Результати визначення залишкових кількостей деяких АФІ

АФІ	ГДК, мкг/мл	залишкові кількості АФІ (мкг/мл)			
		Гранулятор-сушарка	Таблет-прес	Машина для наповнення капсул	Машина для фасування порошку у саше
1	2	3	4	5	6
Тилорон	2,50	0,45	0,32		
L-5-гідрокситриптофан	20,0			0,68	0,72
Колаген	20,0			5,81	
Бензобітал	5,0	0,37	0,28		
Розувастатин кальцію (люм.)	4,0		0,10		
Ривастигміну гідротартрат (люм.)	7,0			1,68	
Глюкоза (поляриметрия)	10,0	0,95			1,04
Калій	2,5				0,63
Натрій	2,5				0,34
Силденафілу цитрат	8,0	0,11	0,08		
Фенспіриду гідрохлорид	10,0	1,45	1,30		
Левана	0,8	0,08	0,05		
Фенібут	2,0	0,25	0,27		
Парацетамол (АМІЦИТРОН [®] , саше)	5,0	0,18			0,29
Парацетамол (АМІЦИТРОН [®] ПЛЮС, саше)	2,5				0,15
Гвайфенезин	0,4				0,03
Парацетамол (ТЕОФЕДРИН ІС [®] , таблетки)	5,0	0,16	0,15		
Теофілін	2,0	0,14	0,13		

1	2	3	4	5	6
Парацетамол (АМЦИТРОН® ЕКСТРАТАБ, таблетки)	1,5	0,11	0,17		
Парацетамол (ПЕНТАЛГІН ІС®, таблетки)	5,0	0,18	0,23		
Деквалінію хлорид	0,5	0,14	0,08		
Цинхокаїну гідрохлорид	0,06	0,017	0,009		
Метамізол натрію	2,5	0,27	0,22		
L-лейцин	150,0		11,12		
L-валін	75,0		4,93		
L-ізолейцин	75,0		3,78		

ВИСНОВКИ

1. Методами математичної статистики з урахуванням вимог GMP розроблені підходи для визначення максимально допустимої невизначеності методик контролю якості очищення фармацевтичного обладнання та інших валідаційних критеріїв, які застосовані при створенні нових хроматографічних та оптичних методик аналізу для визначення залишкових кількостей ряду активних фармацевтичних інгредієнтів, необхідних для вітчизняного промислового випуску лікарських препаратів.

2. На прикладі АФІ деквалінію хлориду за методом «найгіршого випадку» запропановані критерії прийнятності валідації аналітичної методики контролю якості очищення обладнання та визначення рівня забруднення (максимальна невизначеність методики, лінійність градувального графіка, межа кількісного визначення, прецизійність та відтворюваність).

3. Розроблено та валідовано методики спектрофотометричного (тилорону, L-5-гідрокситриптофану, колагену, бензобіталу), поляриметричного (глюкози) та люмінесцентного (розувастатину кальцію, флупіртину малеату, абіратерону ацетату, ривастигміну гідротартрату) визначення залишкових кількостей АФІ на поверхнях фармацевтичного обладнання при виробництві відповідних лікарських препаратів.

4. Вперше застосовано атомно-емісійну спектрометрію з індуктивно зв'язаною плазмою для визначення мікрокількостей калію та натрію при виробництві багатокомпонентного засобу РЕГІСОЛ® НЕО, який містить натрію хлорид, калію хлорид, натрію цитрат.

5. Після оптимізації умов аналізу (тип сорбенту, геометрія колонки, температура колонки, склад елюенту, діапазон концентрацій органічного модифікатора у рухомій фазі, довжина хвилі та ін.) запропоновані нові методики визначення залишків силденафілу цитрату, фенспіриду гідрохлориду, клонідину гідрохлориду, левана, розувастатину кальцію, ривастигміну гідротартрату, даклатасвіру дигідрохлориду, фенібуту методом ВЕРХ.

6. Вперше розроблено та валідовано методику визначення залишкових кількостей L-валіну, L-лейцину та L-ізолейцину в змивах після очищення фармацевтичного обладнання методом обернено-фазової ВЕРХ з УФ-детектуванням з використанням для предколоночної дериватизації ди-трет-бутилдикарбонату, що застосовується в органічному синтезі для захисту аміногруп.

7. Високоєфективна тонкошарова хроматографія застосована для визначення залишкових кількостей сухого екстракту листя гінкго білоба (за вмістом кверцетину) на поверхнях фармацевтичного обладнання. Метод реалізован завдяки використанню фосфорної кислоти, яка перешкоджає комплексоутворенню кверцетину з силікатом цинку (II) (компонентом флуоресцентного індикатора хроматографічної пластинки).

8. Показано, що аналітичні та валідаційні характеристики розроблених методик

(діапазон лінійності методики, МКВ, ГДК) відповідають критеріям прийнятності визначення залишкових кількостей АФІ в змивах після очищення фармацевтичного обладнання. Для кожного препарату встановлено коефіцієнт ступеня вилучення (%).

9. Показана можливість експресного внутрішньовиробничого контролю очищення фармацевтичного обладнання при виробництві лікарських препаратів. Методики визначення левана, флупіртину малеату, розувастатину кальцію, фенібуту та парацетамолу впроваджені у практику роботи фармацевтичного підприємства ТДВ «ІНТЕРХІМ».

СПИСОК ОПУБЛКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Валидація методики ВЭЖХ определения остаточных количеств клофелина гидрохлорида с поверхностей фармоборудования / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Е. О. Витюкова, С. Н. Кашуцкий, Г. В. Мальцев // Вісник Одеського націон. ун-ту. Хімія. – 2014 – Т. 19, вип. 3(51). – С. 40 – 51. *Здобувачем розроблено та валідовано ВЕРХ-методику кількісного визначення залишкових кількостей клофеліну гідрохлориду.*

2. Валидація методик контролю качества очистки фармацевтического оборудования / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Аналітика и контроль. – 2015. – Т. 19, № 4. – С. 387 – 395. *Здобувачем запропановані критерії прийнятності валідації аналітичної методики контролю якості очищення обладнання.*

3. Определение остаточных количеств сухого экстракта листьев гинкго билоба на поверхностях фармацевтического оборудования методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, С. Н. Кашуцкий, В. П. Антонович // Methods and objects of chem. anal. – 2015. – Vol. 10, № 4. – P. 183 – 188. *Здобувачем розроблено та валідовано ВЕТШХ-методику кількісного визначення залишкових кількостей кверцетину.*

4. Визначення залишкових кількостей глюкози на поверхнях фармобладнання методами поляриметрії та ВЕРХ / **Г. О. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, І. І. Леоненко, А. В. Єгорова, С. М. Кашуцький, В. П. Антонович // Фармацевтичний журнал. – 2015. – № 5 – С. 83 – 89. *Здобувачем розроблено та валідовано поляриметричну методику кількісного визначення залишкових кількостей глюкози.*

5. Определение остаточных количеств розувастатина кальция на поверхностях фармацевтического оборудования методами ВЭЖХ и люминесценции / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, І. І. Леоненко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Журн. анал. химии – 2016. – Т. 71, № 1. – С. 129–135. *Здобувачем розроблено методики люмінесцентного та ВЕРХ визначення залишкових кількостей розувастатину кальцію.*

6. Определение остаточных количеств ривастигмина гидротартрата на поверхностях фармоборудования методами ВЭЖХ и люминесценции / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, І. І. Леоненко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Вісник Одеського націон. ун-ту. Хімія. – 2017 – Т. 22, вип. 1(61). – С. 67 – 78. *Здобувачем розроблено методики люмінесцентного та ВЕРХ визначення залишкових кількостей розувастатину кальцію.*

7. ВЭЖХ определение L-валина, L-лейцина и L-изолейцина с использованием предколонной дериватизации ди-трет-бутилдикарбонатом / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, С. Н. Кашуцкий, В. П. Антонович // Methods and objects of chem. anal. – 2017. – Vol. 12, № 2. – P. 91 – 98. *Здобувачем розроблено та валідовано методику визначення залишкових кількостей амінокислот в змивах після очищення фармацевтичного обладнання методом ВЕРХ.*

8. Пат. 108176 Україна МПК G01N33/15, G01N33/50 Спосіб кількісного визначення кверцетину / Єгорова А. В., **Федосенко Г. О.**, Мальцев Г. В., Кашуцький С. М., Антонович В. П.; заявник та патентовласник Одеса, ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України, – № u 2015 12228; заявл. 10.12.2015; опубл. 11.07.2016, Бюл. № 13. *Здобувачем розроблено ВЕТШХ-методику кількісного визначення залишкових кількостей кверцетину.*

9. Пат. 120119 Україна МПК G01N30/00, G01N30/02, G01N33/15, Спосіб кількісного визначення амінокислот / Єгорова А. В., **Федосенко Г. О.**, Мальцев Г. В., Кашуцький С. М., Антонович В. П.; заявник та патентовласник Одеса, ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України, –

№ У 2017 03754; заявл. 18.04.2017; опубл. 25.10.2017, Бюл. № 20. *Здобувачем розроблено методику визначення залишкових кількостей амінокислот в змивах.*

10. Валідація люмінесцентної методики визначення флупіртину малеату в змивах з поверхні фармообладнання / І. І. Леоненко, Ю. В. Скрипинець, Г. В. Анельчик, А. В. Єгорова, **Г. О. Федосенко** // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції. – Київ, 9 – 12 червня, 2014. – С. 187.

11. Определение левана методом ВЭЖХ в смывах с поверхностей фармооборудования / Е. О. Витюкова, А. В. Егорова, О. Д. Войтюк, **А. А. Федосенко** // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції. – Київ, 9 – 12 червня, 2014. – С. 193.

12. **Федосенко А. А.** Валидация методики ВЭЖХ определения остаточных количеств клофелина гидрохлорида с поверхностей фармооборудования / **А. А. Федосенко**, Е.О. Витюкова, Г.В. Мальцев // Тези доповідей VII Всеукраїнської наукової конференції студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2015» – Харків, 20 – 22 квітня, 2015. – С. 100-101.

13. Определение остаточных количеств розувастатина кальция на поверхностях фармооборудования методами ВЭЖХ и люминесценции / **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, И. И. Леоненко, Г. В. Мальцев // Теоретическая и экспериментальная химия глазами молодежи – 2015. Тезисы докладов Международной научной конференции, посвященной 70-летию Победы в Великой Отечественной войне. Иркутск, 18 – 22 мая, 2015. – С. 105–106.

14. Luminescence method for determination of abiraterone acetate residues on the surface of manufacturing equipment / **G. Fedosenko**, I. Leonenko, Yu. Scrypynets, A. Yegorova // Abstracts and programme of 7th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry. – Varna, Bulgaria, 10 – 15 september, 2015. – P. 103.

15. Валидация методик контроля качества очистки фармацевтического оборудования / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції – Київ, 7 – 9 жовтня, 2015. – С. 142 – 143.

16. Валидация методики определения остаточных количеств цинхокаина гидрохлорида методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Управління якістю в фармацевції: збірник наукових робіт X Науково-практичної конференції – Харків, 20 травня, 2016. – С. 170 – 173.

17. Валидация методик высокочувствительного определения остаточных количеств ряда лекарственных препаратов на поверхностях фармацевтического оборудования / **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, И. И. Леоненко, А. В. Анельчик // Тезисы докладов XVII Конференции молодых учёных и студентов-химиков южного региона Украины с международным участием. – Одесса, 28 – 30 апреля, 2015. – С. 28.

18. Контроль очистки поверхностей фармооборудования при производстве многокомпонентных препаратов / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, И. И. Леоненко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції – Київ, 18 – 22 жовтня, 2016. – С. 93 – 94.

19. Валидация ВЭЖХ и люминесцентной методик определения остаточных количеств ривастигмина гидротартрата на поверхностях фармооборудования / **А. А. Федосенко**, А. В. Егорова, Ю. В. Скрипинець, И. И. Леоненко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Тези доповідей IX Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання». – Харків, 18–20 квітня, 2017. – С. 83 – 84.

20. Determination of fenspiride hydrochloride residues on pharmaceutical manufacturing equipment surfaces by HPLC method / **G. Fedosenko**, A. Yegorova, Yu. Scrypynets, I. Leonenko, E. Vitukova // Abstracts of IXth International conference in chemistry Kyiv-Toulouse – Kyiv-Toulouse, 4 – 9 June, 2017. – P. 246.

21. Валідація АЕС-ІЗП методики визначення калію та натрію в змивах з поверхонь фармообладнання / А. В. Єгорова, **Г. О. Федосенко**, І. П. Гончаренко, В. П. Антонович // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції – Київ, 18 – 21 жовтня, 2017. – С. 164 – 165.

АНОТАЦІЯ

Федосенко Г. О. Хроматографічні та оптичні методи аналізу для визначення залишкових кількостей деяких лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.02 – аналітична хімія. – Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса, 2018.

Дисертаційна робота присвячена розробці хроматографічних та оптичних методик аналізу для визначення залишкових кількостей деяких лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання.

Вперше був розроблений теоретичний підхід для визначення основної метрологічної характеристики аналітичних методик контролю якості очищення обладнання – максимально допустимої невизначеності результату вимірювання. Запропановані критерії прийнятності (максимальна невизначеність методики, лінійність градууювального графіка, межа кількісного визначення, прецизійність та відтворюваність) валідації аналітичної методики контролю якості очищення обладнання та визначення рівня забруднення.

Розроблено та валідовано оптичні методики: спектрофотометричного (тилорону, L-5-гідрокситриптофану, колагену, бензобіталу), поляриметричного (глюкози), люмінесцентного (розувастатину кальцію, флупіртину малеату, абіратерону ацетату, ривастигміну гідротартрату) та атомно-емісійного з індуктивно зв'язаною плазмою (мікрокількостей калію та натрію) визначення залишкових кількостей АФІ на поверхнях фармацевтичного обладнання при виробництві відповідних лікарських препаратів.

Для ВЕРХ визначення АФІ оптимізовані умови аналізу (тип сорбенту, геометрія та температура колонки, склад елюенту, діапазон концентрацій органічного модифікатора у рухомій фазі, довжина хвилі та ін.). Вперше розроблено та валідовано методику визначення залишкових кількостей L-валіну, L-лейцину та L-ізолейцину в змивах після очищення фармацевтичного обладнання методом обернено-фазової ВЕРХ з УФ-детектуванням з використанням для предколонної дериватизації ди-трет-бутилдикарбонату, що застосовується в органічному синтезі для захисту аміногруп. ВЕТШХ застосована для визначення залишкових кількостей сухого екстракту листа гінкго білоба (за вмістом кверцетину). Метод реалізован завдяки використанню фосфорної кислоти, яка перешкоджає комплексоутворенню кверцетину з силікатом цинку (II) (компонентом флуоресцентного індикатора хроматографічної пластинки).

Показано, що аналітичні та валідаційні характеристики розроблених методик (діапазон лінійності методики, МКВ, ГДК) відповідають критеріям прийнятності визначення залишкових кількостей АФІ в змивах після очищення фармацевтичного обладнання.

Ключові слова: хроматографічні методи аналізу, оптичні методи аналізу, залишкові кількості лікарських препаратів, валідація, очищення фармацевтичного обладнання.

АННОТАЦИЯ

Федосенко А. А. Хроматографические и оптические методы анализа для определения остаточных количеств некоторых лекарственных препаратов после очистки фармацевтического оборудования. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия. – Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Одесса, 2018.

Диссертационная работа посвящена разработке хроматографических и оптических методик

анализа для определения остаточных количеств некоторых лекарственных препаратов после очистки фармацевтического оборудования.

Впервые был разработан теоретический подход для определения основной метрологической характеристики аналитических методик контроля качества очистки оборудования – максимально допустимой неопределенности результата измерения. Предложены критерии приемлемости (максимальная неопределенность методики, линейность градуировочного графика, предел количественного определения, прецизионность и воспроизводимость) валидации аналитической методики контроля качества очистки оборудования и определения уровня загрязнения.

Разработаны и валидированы оптические методики: спектрофотометрического (тилорона, L-5-гидрокситриптофана, коллагена, бензобитала), поляриметрического (глюкозы), люминесцентного (розувастатина кальция, флупиртина малеата, абиратерона ацетата, ривастигмина гидротартрата) и атомно-эмиссионного с индуктивно связанной плазмой (микроколичеств калия и натрия) определения остаточных количеств АФИ на поверхностях фармацевтического оборудования при производстве соответствующих лекарственных препаратов.

Для ВЭЖХ определения АФИ оптимизированы условия анализа (тип сорбента, геометрия и температура колонки, состав элюента, диапазон концентраций органического модификатора в подвижной фазе, длина волны и др.). Впервые разработана и валидирована методика определения остаточных количеств L-валина, L-лейцина и L-изолейцина в смывах после очистки фармацевтического оборудования методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием с использованием для предколоночной дериватизации ди-трет-бутилдикарбоната, который применяется в органическом синтезе для защиты аминогрупп. ВЭТСХ применена для определения остаточных количеств сухого экстракта листьев гинкго билоба (по содержанию кверцетина). Метод реализован благодаря использованию фосфорной кислоты, которая препятствует комплексообразованию кверцетина с силикатом цинка (II) (компонентом флуоресцентного индикатора хроматографической пластинки).

Показано, что аналитические и валидационные характеристики разработанных методик (диапазон линейности методики, ПКО, ПДК) соответствуют критериям приемлемости определения остаточных количеств АФИ в смывах после очистки фармацевтического оборудования.

Ключевые слова: хроматографические методы анализа, оптические методы анализа, остаточные количества лекарственных препаратов, валидация, очистка фармацевтического оборудования.

SAMMARY

Fedosenko G.O. Chromatographic and optical methods of analysis for the residual amounts determination of some drugs after the cleaning of pharmaceutical equipment. – As a manuscript.

The thesis for the candidate's degree of chemical sciences by the specialty 02.00.02 – analytical chemistry. – A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of NAS of Ukraine, Odessa, 2018.

The thesis is devoted to the development of chromatographic and optical methods of analysis for determination of the residual quantities of some drugs after cleaning of pharmaceutical equipment.

For the first time, the theoretical approach for determination of the main metrological characteristic of analytical methods for quality control of the cleaning of equipment, the maximum permissible measurement error, has been developed. The acceptance criteria (maximal uncertainty of the method, linearity of the calibration curve, limit of quantification, precision and reproducibility) of the validation of the analytical method for quality control of the cleaning of equipment and determination of contamination level are proposed.

Optical methods have been developed and validated: spectrophotometric (tilorone, L-5-hydroxytryptophan, collagen, benzobital), polarimetric (glucose), luminescent (rosuvastatin calcium, flupirtine maleate, abiraterone acetate, rivastigmine hydrotartrate) and atomic emission with inductively coupled plasma (microquantities of potassium and sodium) determination of residual amounts of APIs on surfaces of pharmaceutical equipment in the production of appropriate drugs.

The analytical conditions for the HPLC determination of the APIs are optimized (sorbent type, geometry and column temperature, eluent composition, concentration range of organic modifier in mobile phase, wavelength, etc.). The procedure for the determination of the residual amounts of L-valine, L-leucine and L-isoleucine in rinse after cleaning of the pharmaceutical equipment by the reversed-phase HPLC method with UV detection was developed and validated using di-tert-butylidicarbonate for pre-column derivatization, which is used in organic synthesis to protect the amino groups. HPTLC was used to determine the residual amounts of dry extract of the leaves of ginkgo biloba (by quercetin content). The method is realized due to the use of phosphoric acid, which prevents the complexation of quercetin with zinc silicate (II) (a component of the fluorescent indicator of the chromatographic plate).

It is shown that the analytical and validation characteristics of the developed methods (linearity range of the method, LOQ, MPC) correspond to the acceptance criteria of the determination of residual amounts of APIs in rinse after after cleaning of the pharmaceutical equipment.

Keywords: chromatographic methods of analysis, optical methods of analysis, residual quantities of drugs, validation, cleaning of the pharmaceutical equipment.