

Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний університет

БУРМАКА ОЛЕКСІЙ ВАСИЛЬОВИЧ



УДК 615.453.6:615.225.2:54.062:543.42.062

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ АКТИВНОГО
ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ІНГРЕДІЄНТА ТА ГОТОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ
ВНІСАМІУМУ ЙОДИДУ

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

Автореферат дисертації
на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Запоріжжя – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в АТ «Фармак».

Науковий керівник доктор медичних наук **Маргітч Віктор Михайлович**, АТ «Фармак», м. Київ, головний науковий консультант.

Офіційні опоненти

доктор фармацевтичних наук, професор **Каплаушенко Андрій Григорович**, Запорізький державний медичний університет, завідувач кафедри фізикоїдної хімії;

доктор фармацевтичних наук, доцент **Логойда Лілія Святославівна**, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, завідувач кафедри фармацевтичної хімії.

Захист відбудеться «16» квітня 2020 р. о 10-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 17.600.03 при Запорізькому державному медичному університеті (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Запорізького державного медичного університету (69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26).

Автореферат розісланий «16» березня 2020 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради



С. О. Васюк

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Грип – гостра респіраторна вірусна інфекція, що чинить ураження верхніх дихальних шляхів, в тому числі слизової носоглотки, бронхів, рідше – легенів. Значну небезпеку представляють ускладнення грипу: синусити, отити і пневмонія. Під час епідемії інфекція уражає приблизно 5-10 % дорослого і 20-30 % дитячого населення.

Вважається, що вакцини є важливим засобом для профілактики грипу, але їх ефективність, на жаль, не перевищує 50 %. До того ж, вакцинацію проти грипу проводить незначна частина населення. У зв'язку з цим існує нагальна необхідність застосування хіміотерапевтичних препаратів для лікування й профілактики грипу та інших ГРВІ.

Енісаміум йодид (Амізон) був вперше синтезований в ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» та запроваджений до індустриального виробництва на АТ «Фармак» як ненаркотичний анальгетик у 1997 р. Пізніше член-кор. НАН та АМН України, РАМН, професором, доктором медичних наук А. Ф. Фроловим було експериментально доведено протівірусну активність даного препарату по відношенню до вірусу грипу. Починаючи з 2007 року науковці АТ «Фармак» удосконалили технологію отримання активного фармацевтичного інгредієнта та розпочали міжнародні доклінічні та клінічні дослідження. На сьогодні в провідних лабораторіях США, Великої Британії і Німеччини одержано докази того, що штами вірусу грипу А (H1N1, H3N2, H5N1, H7N9) і В, а також коронавірусу NL63 та респіраторно-синцитіального вірусу чутливі до енісаміуму. Препарат з енісаміуму йодидом репозиціоновано як інгібітор вірусної РНК-полімерази штамів А і В, йому у 2019 році присвоєно відповідний код АТС/DDD ВООЗ J05AX17 (протівірусні засоби прямої дії).

Зважаючи на нові підходи щодо забезпечення якості АФІ та ГЛФ (вимоги ІСН, ДФУ, ЄФ), виникає необхідність створення аналітичних методик, які б відповідали діючим вимогам фармацевтичної регуляції України, країн ЄС, США та ін. в аспекті контролю якості, оскільки підходи, які були застосовані 10-15 років тому, наразі є дещо застарілими. Для забезпечення регуляторної відповідності виникає необхідність доопрацювання існуючих методик, а в деяких випадках і розробки нових. Наприклад, існуюча методика ТШХ не може забезпечити належну чутливість при визначенні супровідних домішок у рамках лімітів, які вимагаються діючими настановами.

Використання сучасних валідованих методик є однією з умов відповідності критеріям якості виведеного на ринки препарату, уможливаючи їх належне відтворення в лабораторіях з контролю якості ЛЗ. З огляду на необхідність забезпечення безпеки, ефективності та якості ЛЗ, очевидним є доцільність здійснення розробки та валідації аналітичних методик контролю АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду згідно діючих рекомендацій ІСН, ДФУ, ЄФ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт кафедри управління та економіки фармації з технологією ліків Тернопільського

національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України (номери державної реєстрації 0111U003756; 0115U001530). Дисертантом особисто розроблено та валідовано методики контролю якості активного фармацевтичного інгредієнта та готових лікарських форм енісаміуму йодиду.

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційного дослідження була розробка та валідація аналітичних методик контролю якості АФІ, таблеток та капсул енісаміуму йодиду відповідно до ІСН, ДФУ та ЄФ.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

– проаналізувати сучасні підходи до забезпечення контролю якості АФІ та ГЛФ, провести критичний аналіз оригінальних наукових публікацій щодо контролю якості енісаміуму йодиду, оцінити переваги та недоліки існуючих аналітичних методик;

– запропонувати нормування супровідних домішок у відповідності до діючих регуляторних вимог;

– розробити методики контролю якості АФІ енісаміуму йодиду за показниками «Супровідні домішки» та «Кількісне визначення»;

– встановити розчинність АФІ енісаміуму йодиду у відповідності до БСК із застосуванням буферних розчинів у діапазоні рН від 1,2 до 7,5;

– розробити методики контролю якості твердих лікарських форм енісаміуму йодиду (таблеток та капсул) за показниками «Кількісне визначення», «Супровідні домішки» та «Розчинення»;

– розробити методику вивчення профілів розчинення таблеток та капсул енісаміуму йодиду;

– провести валідацію всіх розроблених аналітичних методик;

– запровадити розроблені валідовані аналітичні методики у лабораторії АТ «Фармак» та подати відповідні зміни до нормативної документації на АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду.

Об'єкт дослідження. Методологічні підходи до розробки та валідації хроматографічних та спектрофотометричних методик контролю якості АФІ, таблеток та капсул енісаміуму йодиду.

Предмет дослідження. АФІ, таблетки та капсули енісаміуму йодиду.

Методи дослідження. Під час вирішення поставлених у роботі завдань було застосовано вискоєфективну рідинну хроматографію та абсорбційну спектрофотометрію в ультрафіолетовій та видимій областях. Застосовано діючі вимоги ІСН, ДФУ та ЄФ щодо встановлення лімітів домішок, нормування кількісного вмісту, проведення валідації аналітичних методик. Обробку результатів проводили методами математичної статистики у відповідності до рекомендацій ЄФ та ДФУ.

Наукова новизна отриманих результатів. Автором продемонстровано новітні підходи до розробки та валідації чутливих та експресних аналітичних методик контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду. Розроблені хроматографічні та спектрофотометричні методики стали на заміну методикам, що використовувалися на ранніх етапах життєвого циклу АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду.

В процесі виконання дисертаційної роботи вперше запропоновано нормування вмісту супровідних домішок в АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду, що відповідає вимогам ІСН, ДФУ та ЄФ.

Вперше розроблено чутливу, просту у виконанні ВЕРХ-методику одночасного визначення таких домішок, як бензиламін, бензиламід ізонікотинової кислоти, ізонікотинова кислоти та інших неідентифікованих домішок в АФІ та ГЛФ (таблетках та капсулах) енісаміуму йодиду.

Вперше в процесі виконання дисертації для АФІ енісаміуму йодиду із застосуванням аналітичної методики ВЕРХ вивчено розчинність в буферних розчинах з рН 1,2; 4,5; 6,8 та 7,5.

Для твердих ГЛФ енісаміуму йодиду розроблено такі показники якості, як «Кількісне визначення», «Супровідні домішки», «Розчинення», «Профілі розчинення», розроблено відповідні спектрофотометричні, хроматографічні методики аналізу та проведено валідацію за всіма характеристиками, відповідно до вимог ІСН, ДФУ, ЄФ.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблені ВЕРХ та СФ методики запроваджені до МКЯ на АФІ енісаміуму йодиду (номер РП UA/15007/01/01), до МКЯ на таблетки 0,125 г та 0,25 г (РП UA/6493/01/02, РП UA/6493/01/01) та МКЯ на капсули енісаміуму йодиду 500 мг (РП UA/12415/01/01) (акт впровадження АТ «Фармак» від 21.02.2020).

Методики контролю якості АФІ енісаміуму йодиду, а також методики контролю якості таблеток та капсул апробовано в Центральній лабораторії фармацевтичної розробки АТ «Фармак» (акти впровадження від 04.03.2019).

Розроблені методики ВЕРХ та СФ застосовуються на АТ «Фармак» для контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду, відслідковування/управління процесом синтезу АФІ, вивчення стабільності АФІ та ГЛФ, вивчення впливу змін на ГЛФ при запровадженні нових виробників допоміжних речовин, при зміні технології виготовлення, зміні складу препарату та інших процесах життєвого циклу АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду.

Розроблені аналітичні методики контролю якості впроваджені в навчальний процес кафедри фармацевтичної, органічної і біологічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (акт впровадження від 11.03.2019), кафедри фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця (акт впровадження від 06.03.2019 р.), кафедри фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету (акт впровадження від 01.03.2019), кафедри фармацевтичної хімії Одеського національного медичного університету (акт впровадження від 20.02.2019), кафедри фармації Івано-Франківського національного медичного університету (акт впровадження від 25.02.2019), кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету (акт впровадження від 19.02.2019) та кафедри фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (акт впровадження від 14.03.2019).

Особистий внесок здобувача. Автором особисто:

– проаналізовано сучасні підходи до забезпечення контролю якості АФІ та ГЛФ. Проведено критичний аналіз оригінальних наукових публікацій щодо контролю якості енісаміуму йодиду, обґрунтовано доцільність розробки нових аналітичних методик та їх валідації;

– розроблено чутливу, просту у виконанні ВЕРХ-методику одночасного визначення таких домішок: бензиламін, бензиламід ізонікотинової кислоти, ізонікотинової кислоти та інших неідентифікованих домішок в АФІ та ГЛФ (таблетках та капсулах) енісаміуму йодиду. Розроблено ВЕРХ методику контролю якості АФІ за показником «Кількісне визначення».

– встановлено розчинність АФІ енісаміуму йодиду відповідно до БСК із застосуванням буферних розчинів в діапазоні рН від 1,2 до 7,5;

– розроблено методики контролю якості твердих лікарських форм енісаміуму йодиду (таблеток та капсул) за показниками «Кількісне визначення» та «Розчинення»;

– розроблено методику вивчення профілів розчинення таблеток та капсул енісаміуму йодиду;

– проведено валідацію всіх розроблених аналітичних методик у відповідності до вимог ІСН, ДФУ та ЄФ.

Особистий внесок дисертанта, щодо публікацій у співавторстві, зазначено у тексті дисертаційної роботи, в авторефераті та у списку опублікованих праць.

Результати експериментальних досліджень висвітлено у наукових працях, опублікованих у співавторстві з науковим керівником та науковцями, спільно з якими проведено дослідження.

Усі наукові узагальнення, положення, результати, висновки та рекомендації, викладені у дисертації, виконані автором особисто.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи викладено та обговорено на II Міжнародній науково практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 2015), VIII Національному 24 з'їзді фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (Харків, 2016), VI науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2016), XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Students (Kharkiv, 2017), VII науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2018).

Апробацію дисертаційної роботи проведено на спільному засіданні кафедр управління та економіки фармації з технологією ліків; фармації ННІ ПО, фармакогнозії з медичною ботанікою, фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України 27 травня 2019 року, а також на спільному засіданні професорсько-викладацького

складу кафедр фармацевтичного профілю Запорізького державного медичного університету 31 січня 2020 року.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 11 наукових праць, у тому числі 6 статей у наукових фахових виданнях, що входять до наукометричних баз (із них 1 стаття у виданні іноземної держави та 1 стаття у наукометричній базі Web of Scitnce), 5 тез доповідей.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 235 сторінках машинописного тексту, складається з анотації, вступу, огляду літератури, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел та 7 додатків. Обсяг основного тексту складає 126 сторінок. Робота проілюстрована 74 таблицями та 46 рисунками. Список використаних джерел містить 174 найменування, з них 45 кирилицею та 129 латиною.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Противірусні препарати, що застосовуються при грипі. Підходи до забезпечення контролю якості активних фармацевтичних інгредієнтів та готових лікарських форм (огляд літератури)

Розглянуто сучасний стан розробки противірусних препаратів, що застосовуються при грипі. Встановлено, що в Україні наявні лише дві молекули у комерційному доступі, які визнані FDA як противірусні засоби, що застосовують при грипі. Це озельтамівір та занамівір (представники блокаторів нейрамінідази).

Проаналізовано та систематизовано дані літературних джерел щодо методів контролю якості АФІ та ГЛФ у вигляді таблеток та капсул. Опрацьовано та узагальнено підходи до валідації аналітичних методик контролю якості.

Проведено критичний аналіз оригінальних наукових публікацій щодо об'єктів досліджень: АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду. Встановлено, що методики контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду недостатньо описані. Серед хроматографічних методик контролю описана лише методика ТШХ. В літературних джерелах наявна методика кислотно-основного титрування АФІ енісаміуму йодиду.

На основі опрацьованих даних підтверджена актуальність розробки та валідації методик контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду для забезпечення належного контролю якості АФІ та ГЛФ у відповідності до діючих регуляторних вимог.

Об'єкти та методи дослідження

Наведено фізико-хімічні властивості енісаміуму йодиду та якісний склад ГЛФ (таблеток та капсул). Представлена структурна формула енісаміуму йодиду (N-метил-4-бензилкарбамідопіридинію йодид) (рис. 1).

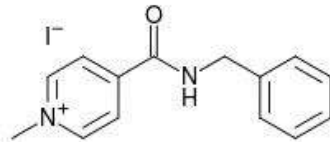


Рис. 1. Структурна формула енісаміуму йодиду

Наведено перелік обладнання та реактивів, що були застосовані під час розробки та валідації аналітичних методик.

Відповідно до алгоритму, наведеному на рис. 2, в першу чергу було розроблено методику визначення супровідних домішок в АФІ. Розробка ВЕРХ-методики контролю супровідних домішок зайняла тривалий час, але в подальшому цю методику було адаптовано для визначення супровідних домішок в ГЛФ (таблетках та капсулах).

Розроблена методика дозволяє визначати такі основні домішки, як бензиламін, бензиламід ізонікотинової кислоти, ізонікотинову кислоту, а також неідентифіковані домішки. Підтверджена селективність аналітичної методики, в тому числі даними, що отримані в процесі проведення стресових випробувань.

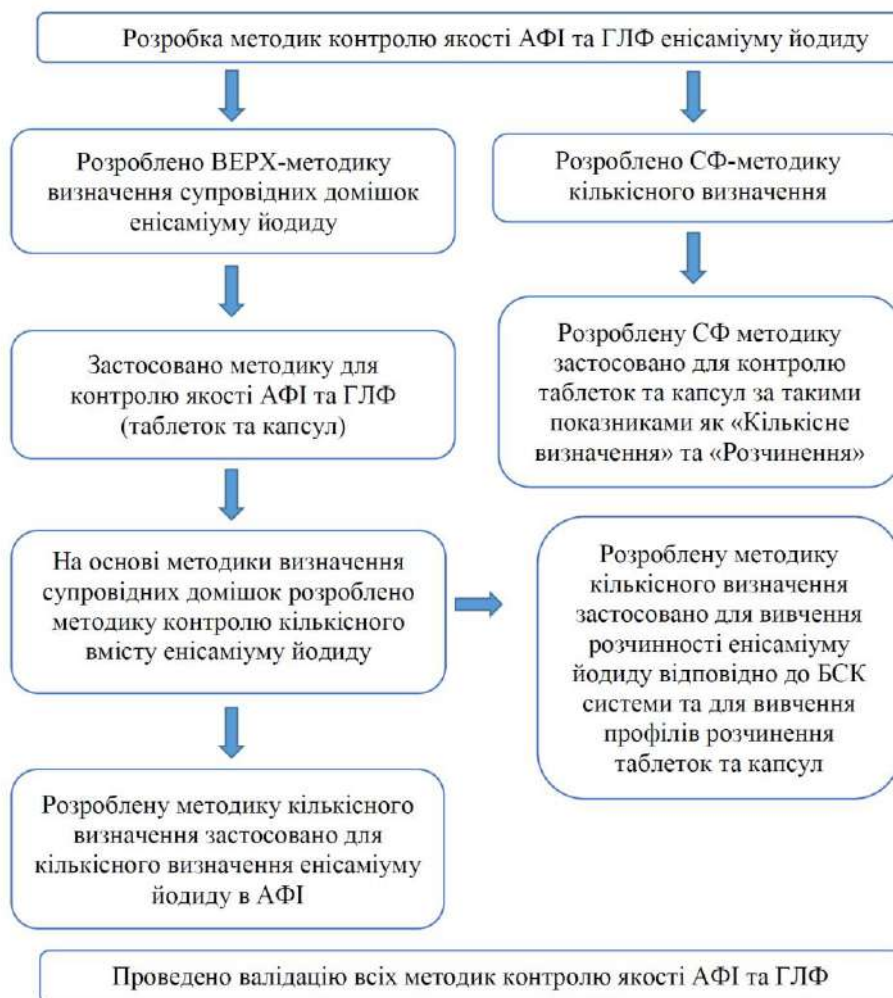


Рис. 2. Алгоритм експериментальних досліджень з розробки аналітичних методик контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду

Детально описано методики контролю АФІ та ГЛФ за такими показниками як «Супровідні домішки», «Кількісне визначення», «Розчинення», «Профілі розчинення» із застосуванням УФ спектрофотометрії (ДФУ 2.2.25) та ВЕРХ (ДФУ 2.2.29).

Після завершення розробки кожної методики було проведено їх валідацію. Підтверджено придатність всіх розроблених аналітичних методик для їх застосування при контролі АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду.

Розробка та валідація методик контролю якості АФІ енісаміуму йодиду

Наведено інформацію щодо ходу розробки методики контролю супровідних домішок АФІ. Керуючись даними щодо максимальної добової дози та рекомендаціями ІСН Q3А було встановлено, що основними домішками можуть бути: бензиламін, ізонікотинова кислота, бензиламід ізонікотинової кислоти та будь-яка неідентифікована домішка, а вміст кожної окремої домішки має бути не більше 0,05 %.

Для можливості забезпечення хроматографічного розділення домішок та основного компоненту було застосовано іон-парний реагент натрію 1-октансульфонат моногідрат. Динатрію гідрогенфосфат безводний був використаний як буферний реагент.

Для вибору оптимального значення рН буферної системи було приготовлено буферні розчини з рН від 2,0 до 7,0. Оптимальне значення рН буферного розчину встановлено на рівні рН 2,5, а органічною складовою елюенту вибрано ацетонітрил.

Хроматограми, отримані за оптимальних умов хроматографування, наведені на рис. 3.

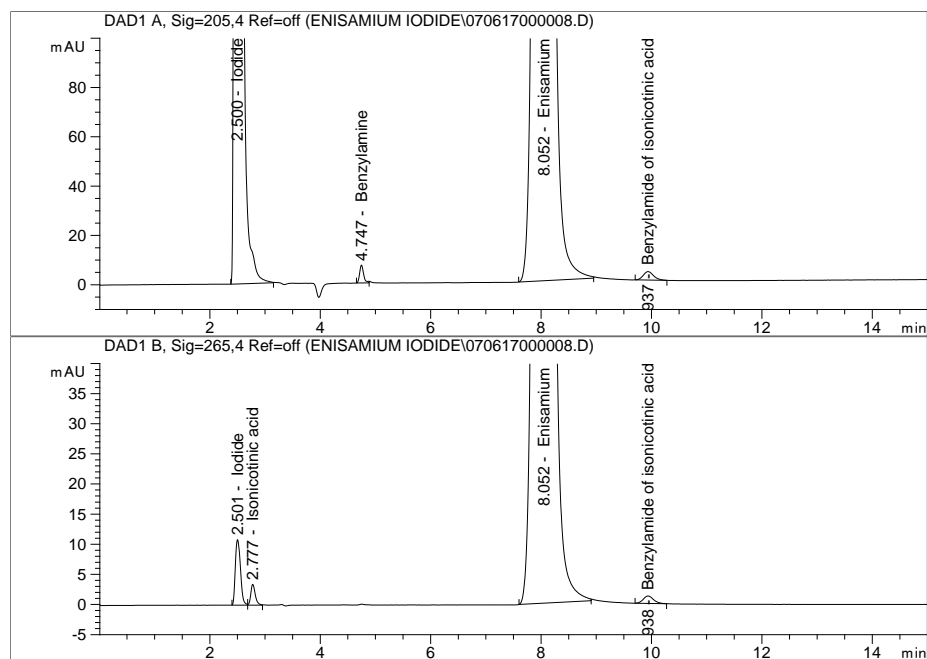


Рис. 3. Хроматограми розчину порівняння, отримані за оптимальних умов хроматографування

При зниженні значення рН буферного розчину до рН 2,0 погіршувалося розділення піків енісаміуму з піком бензиламід ізонікотинової кислоти (рис. 4), а при підвищенні рН більше 2,5 погіршувалося розділення піку йодид-йону з ізонікотиною кислотою (рис. 5).

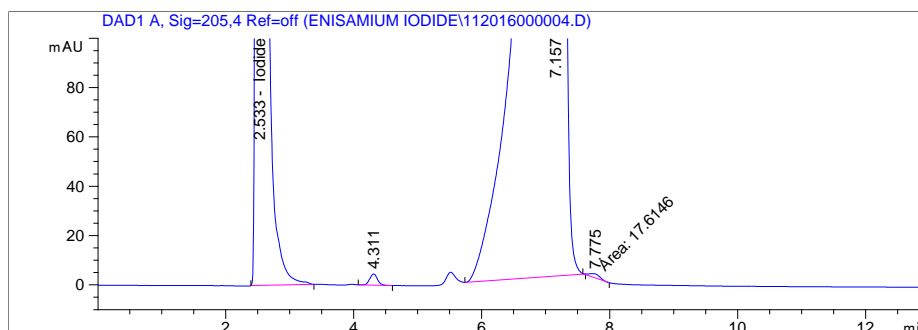


Рис. 4. Хроматограма розчину порівняння, отримана із застосуванням буферного розчину із значенням рН 2,0 (часи утримування піків: йодид-йон – 2,5 хв, бензиламін – 4,3 хв, енісаміум – 7,2 хв, бензиламід ізонікотинової кислоти – 7,8 хв)

Із хроматограми на рис. 4 видно, що немає достатнього розділення піка енісаміуму (час утримування 7,157 хв) з піком бензиламід ізонікотинової кислоти (час утримування 7,775 хв).

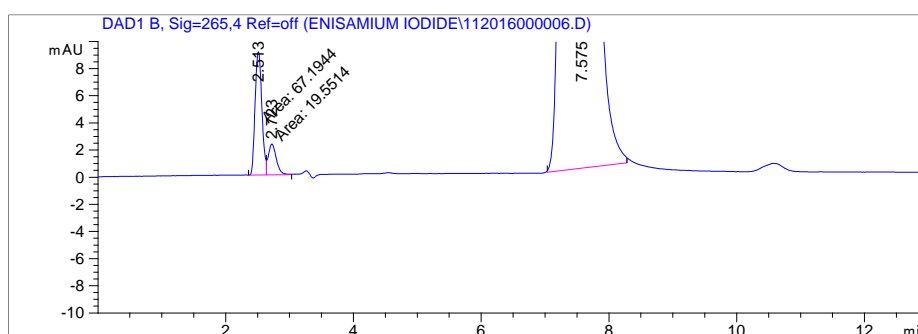


Рис. 5. Хроматограма розчину порівняння, отримана із застосуванням буферного розчину із значенням рН 3,0 (часи утримування піків: йодид-йон – 2,5 хв, ізонікотинова кислота – 2,7 хв, енісаміум – 7,6 хв)

Із хроматограми рис. 5 видно, що немає достатнього розділення піка йодид-йону (час утримування 2,513 хв) з піком ізонікотинової кислоти (час утримування 2,723 хв).

Експериментально встановлено, що октадецильна хроматографічна колонка розміром 150 мм x 4,6 мм з розміром часток 5 мкм є оптимальною, оскільки при її застосуванні забезпечується розділення піків, при цьому час хроматографування одного зразка складає не більше 15 хв. Швидкість рухомої фази – 0,5 мл/хв. В процесі розробки методики була підтверджена необхідність застосування розчинника рухомої фази, що сприяє покращенню чутливості системи, збільшуючи співвідношення сигнал/шум.

Вибрана оптимальна концентрація випробовуваного розчину – 0,4 мг/мл,

оскільки за більш високої концентрації, наприклад, при 1 мг/мл, спостерігається погіршення симетрії піку енісаміуму до рівня, що призводить до втрати селективності по відношенню до визначення бензиламіну та невідомих домішок.

Для коректного встановлення довжини хвилі детектування визначені максимуми поглинання досліджуваних речовин в ультрафіолетовому та видимому діапазонах світла. В рамках ВЕРХ-методики визначення супровідних домішок запроваджено довжину хвилі детектування 205 нм для визначення бензиламіну, бензиламиду ізонікотинової кислоти та неідентифікованих домішок та 265 нм для визначення вмісту ізонікотинової кислоти.

Розробленою аналітичною методикою було проаналізовано зразки АФІ енісаміуму йодиду, які навмисно піддавалися впливу підвищеної температури, впливу окисника, кислотному та лужному гідролізу, впливу світла (стресові дослідження). В результаті стресових досліджень підтверджено, що основними продуктами розкладу є бензиламін та ізонікотинова кислота.

Приклади хроматограм зразка АФІ, який піддавали стресовим випробуванням, наведено на рис. 6-7.

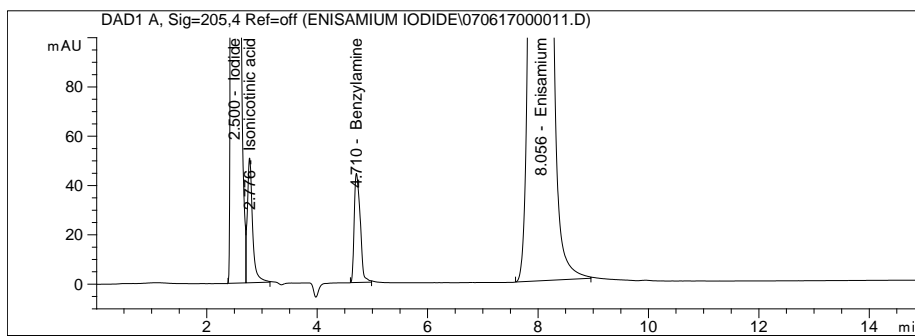


Рис. 6. Хроматограма випробовуваного розчину (зразок АФІ, який піддавали стресовим випробуванням), отримана за довжини хвилі 205 нм

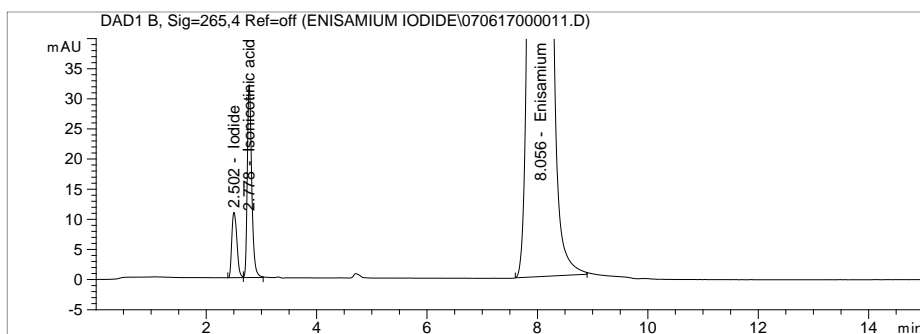


Рис. 7. Хроматограма випробовуваного розчину (зразок АФІ, який піддавали стресовим випробуванням), отримана за довжини хвилі 265 нм

Також проведена оцінка потенційних домішок в УФ-діапазоні, що відрізняється від довжин хвиль 205 та 265 нм, у результаті чого було підтверджено відсутність додаткових неідентифікованих домішок, які б мали абсорбцію в іншому діапазоні детектування. Така оцінка проводилася після отримання хроматограм з використанням діодно-матричного детектора. ВЕРХ-спектр випробовуваного розчину, після впливу стресових умов, наведено

на рис. 8.

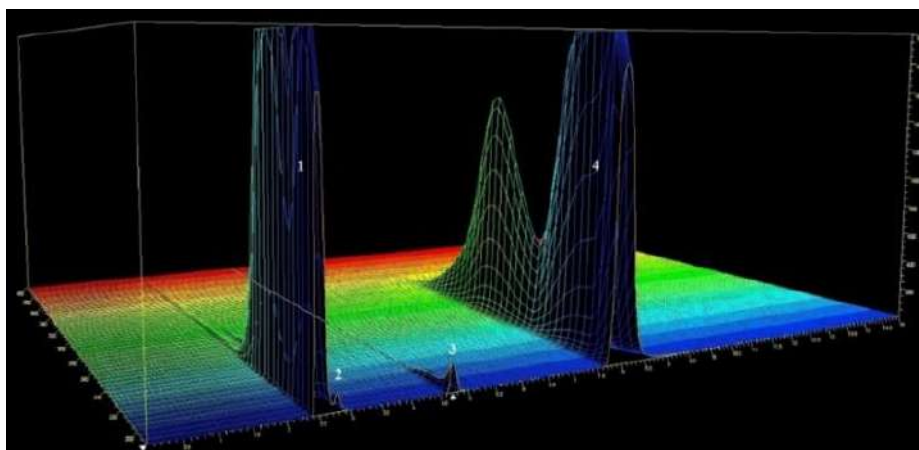


Рис. 8. ВЕРХ спектр випробовуваного розчину, після впливу стресових випробувань на субстанцію енісаміуму йодиду (1 – спектр першого піку енісаміуму йодиду (йодид); 2 – спектр ізонікотинової кислоти; 3 – спектр бензиламіну; 4 – спектр другого піка енісаміуму йодиду (енісаміум))

Проведено валідацію методики контролю супровідних домішок. Для оцінки придатності хроматографічної системи готували розчин з вмістом основних домішок на рівні 0,03 % по відношенню до концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині. Встановлені межі детектування та межі кількісного визначення ідентифікованих та неідентифікованих домішок (табл. 1).

Таблиця 1

МВ та МКВ домішок при їх визначенні в АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ

Домішка	Межа виявлення, %	Межа кількісного визначення, %
Бензиламін	0,001	0,003
Ізонікотинова кислота	0,001	0,004
Бензиламід ізонікотинової кислоти	0,003	0,008
Неідентифіковані домішки	0,001	0,003

Підтверджено такі валідаційні характеристики, як специфічність, правильність, прецизійність, діапазон застосування, робасність, внутрішньо-лабораторна прецизійність. Підтверджена лінійність у діапазоні концентрацій 0,01-0,06 % для кожної домішки. Коефіцієнт кореляції лінійної залежності сигналу від концентрації (r) між введеними та знайденими значеннями для кожної із визначуваних домішок становив більше 0,990, а відносні довірчі інтервали (Δz) знаходилися на рівні не більше 5,0 %. Підтверджена стабільність випробовуваного розчину, розчину порівняння та розчину для перевірки придатності хроматографічної системи при їх зберіганні за кімнатної температури протягом 48 год. Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом

найменших квадратів. Отримані дані наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Метрологічні характеристики лінійності методики визначення супровідних домішок в АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ

Величина	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Отримані значення			
		Бензиламін	Ізонікотинова кислота	БАІНК	Енісаміум
b	—	1,02571	1,00286	0,99429	1,02571
s_b	—	0,007	0,01082	0,02163	0,007
$ a $	$\leq 5,0$	0,00040	0,00007	0,00053	0,00040
s_a	—	0,00027	0,00042	0,00084	0,00027
s_0	—	0,00029	0,00045	0,00091	0,00029
s_0/b	—	0,00028	0,00045	0,00092	0,00028
$ r $	$\geq 0,990$	0,99991	0,99977	0,99905	0,99991

Графіки лінійної залежності площ піків від концентрації компонентів наведені на рис. 9-10.

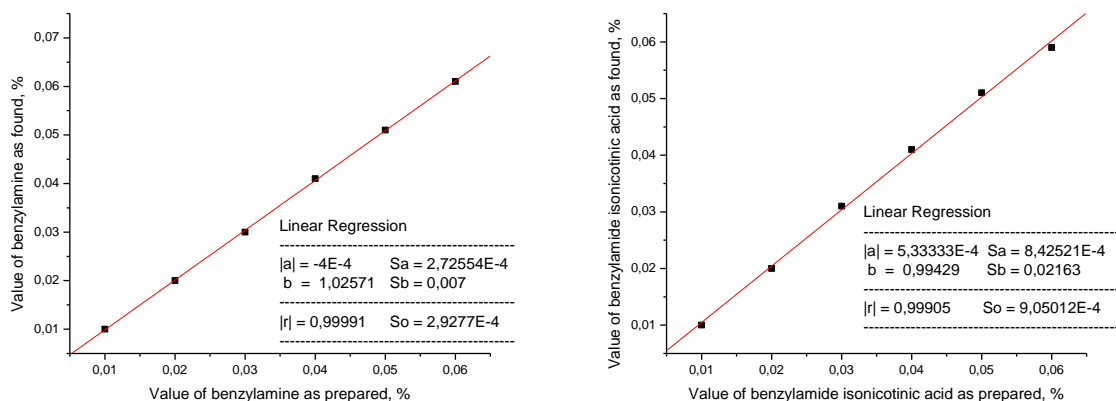


Рис. 9. Графіки лінійної залежності (БА, БАІНК)

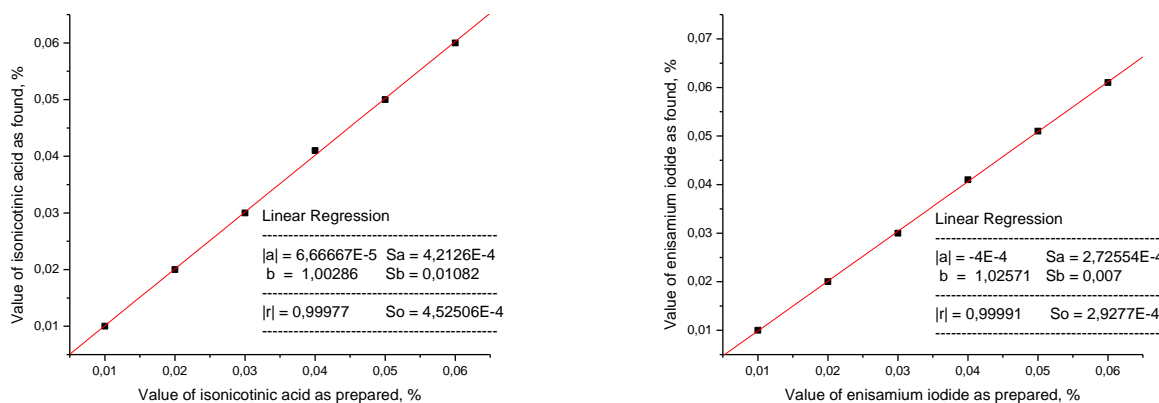


Рис. 10. Графіки лінійної залежності (ІНК, ЕЙ)

Розроблено та валідовано ВЕРХ-методику кількісного визначення АФІ енісаміуму йодиду. При цьому за основу використано методику, розроблену в рамках контролю супровідних домішок. Для покращення симетрії піка, концентрацію випробовуваного розчину та розчину порівняння було знижено з 0,4 мг/мл до 0,3 мг/мл. Запроваджено довжину хвилі детектування 225 нм. Встановлено вимоги щодо відносного стандартного відхилення, симетрії та числа теоретичних тарілок піків енісаміуму йодиду. Підтверджені валідаційні характеристики методики, що рекомендовані ІСН та ДФУ. Коефіцієнт кореляції лінійної залежності (r) між введеним та знайденим значеннями для енісаміуму йодиду становив 0,99995.

Типові хроматограми розчину порівняння та випробовуваного розчину наведені на рис. 11-12.

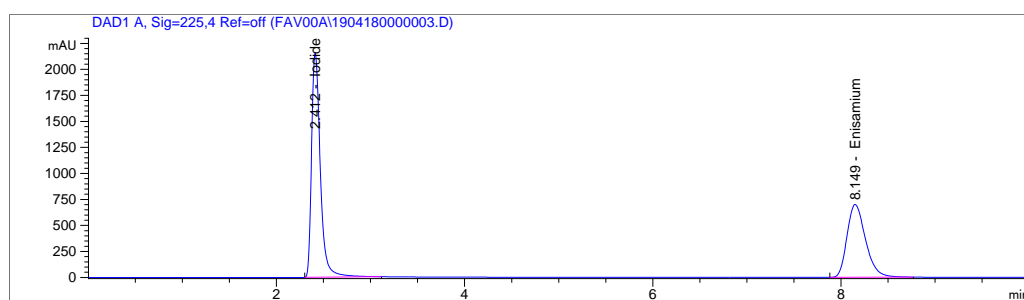


Рис. 11. Типова хроматограма розчину порівняння, отримана в умовах кількісного визначення АФІ енісаміуму йодиду

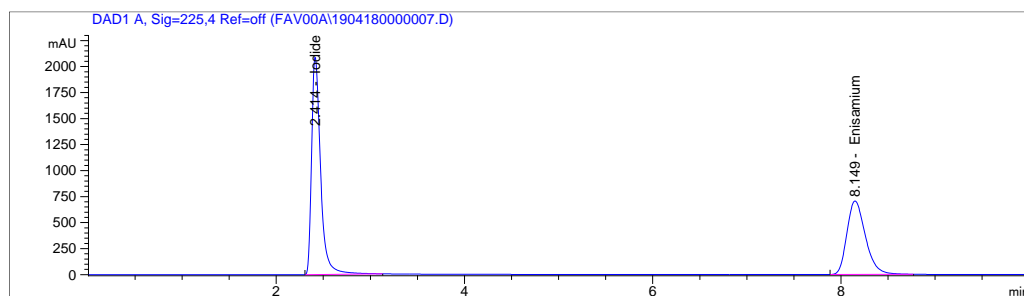


Рис. 12. Типова хроматограма випробовуваного розчину, отримана в умовах кількісного визначення АФІ енісаміуму йодиду

Для можливості класифікації енісаміуму йодиду відповідно до БСК була вивчена розчинність субстанції в буферних розчинах в діапазоні рН від 1,2 до 7,5. Розчинність вивчена за температури 25 °С та 37 °С. Для визначення концентрації розчиненого енісаміуму йодиду застосовано методику ВЕРХ. Було виявлено, що розчинність енісаміуму йодиду при 25 °С становила близько 60 мг/мл у всіх чотирьох буферних розчинах, а при 37 °С – від 125 мг/мл до 155 мг/мл, в залежності від значення рН буферного розчину.

Графічне зображення розчинності субстанції енісаміуму йодиду наведено на рис. 13.

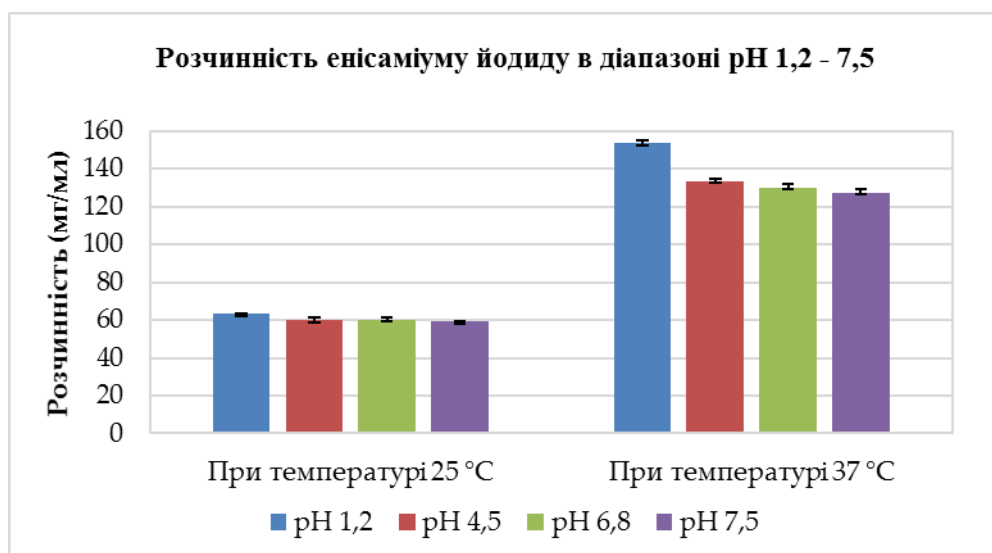


Рис. 13. Середні значення розчинності енісаміуму йодиду в різних буферних розчинах за різних температур

Отже, розроблено ВЕРХ-методику визначення енісаміуму йодиду в буферних розчинах, що застосовуються для вивчення розчинності у відповідності до БСК. Із застосуванням ВЕРХ-методики підтверджено, що енісаміум йодид має високу розчинність відповідно до БСК.

Розробка та валідація методик контролю якості таблеток енісаміуму йодиду

Розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках. Значення δ noise становило 0,16 % та не перевищувало критерій прийнятності «не більше 0,5 %». Підтверджено лінійність для концентрації енісаміуму йодиду в діапазоні концентрацій від 80 % до 120 % (0,016-0,024 мг/мл) відносно номінальної концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині (0,2 мг/мл). Коефіцієнт кореляції між введеним та знайденим значеннями для енісаміуму йодиду становив 0,99995, що відповідає критерію прийнятності лінійної залежності ($\geq 0,99981$). Значення $|a|$ (вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої) становив 0,11222 (при критерію прийнятності $\leq 2,6$). Результати аналізу модельних сумішей енісаміуму йодиду та їх статистична обробка наведена в табл. 3.

Довірчий інтервал збіжності результатів ($\Delta_z\%$) становив 0,24 %, що відповідає критичному значенню для збіжності результатів $\Delta_z\% \leq \Delta_{As}$ ($\Delta_{As} = 1,6\%$). Систематична похибка $\delta = |Z - 100|$ становила 0,11 при критерію незначущості систематичної похибки ($\delta \leq 0,32 \times \Delta_{As}$) не більше 0,51.

Відносне стандартне відхилення (RSD) для внутрішньолабораторної прецизійності становило 0,31 %, а відносна різниця середніх значень результатів – 0,15 %. Правильність аналітичної методики знаходилася в межах критерію 98,0-102,0 %.

Результати аналізу модельних сумішей та їх статистична обробка в умовах кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках методом СФ

Номер зразка	Концентрація енісаміуму йодиду		
	введено, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100$	знайдено, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 100$	розраховано, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$
1	80,00	79,87	99,84
2	85,00	85,03	100,04
3	90,00	89,84	99,83
4	95,00	95,00	100,00
5	100,00	99,81	99,81
6	105,00	104,60	99,62
7	110,00	109,93	99,93
8	115,00	114,85	99,87
9	120,00	120,06	100,05
відносне стандартне відхилення, RSD_z %			0,13
$\Delta_z \% = t(95\%, 8) \times RSD_z = 1,8595 \times 0,13 =$			0,24
$\Delta_z \% \leq \Delta_{As} (\Delta_{As} = 1,6 \%)$			(0,24 < 1,60)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 / \delta \leq 0,32 \times \Delta_{As}$			0,11 / (0,11 < 0,51)

Експериментально встановлено, що випробовувані розчини стабільні протягом 48 год при їх зберіганні за кімнатної температури. Також встановлено, що зміна довжини хвилі детектування (від 265 нм до 269 нм) та концентрації компенсаційного розчину (0,09 та 0,11 М розчин хлористоводневої кислоти) практично не впливає на результати аналізу. Відхилення співвідношень абсорбції розчину порівняння та випробовуваного розчину у всіх експериментах щодо робастності не перевищувало 1,0 %. Загальна невизначеність аналізу (Δ_{As}) становила 1,6 %.

На основі методики, яка розроблена в рамках контролю якості АФІ, розроблено та проведено валідацію методики визначення супровідних домішок в таблетках енісаміуму йодиду. Для методики встановлено ліміти детектування (бензиламін – 0,003 %, ізонікотинова кислота – 0,004 %, бензиламід ізонікотинової кислоти – 0,004 %, неідентифіковані домішки – 0,006 %) та ліміти кількісного визначення (бензиламін – 0,010 %, ізонікотинова кислота – 0,013 %, бензиламід ізонікотинової кислоти – 0,011 %, неідентифіковані домішки – 0,018 %). Продемонстровано специфічність аналітичної методики, де забезпечено розділення домішок між собою та піками основного компонента. Коефіцієнти кореляції лінійної залежності (r) між введеними та знайденими значеннями для визначуваних домішок становили: для бензиламіну – 0,99978, для бензиламіду ізонікотинової кислоти – 0,99988, для ізонікотинової кислоти – 0,99959, для неідентифікованих домішок – 0,99994. Підтверджені такі валідаційні

характеристики як правильність, прецизійність, робасність. Підтверджено стабільність випробовуваного розчину, розчину порівняння. Результати вивчення стабільності розчинів наведено в табл. 4.

Таблиця 4

Результати вивчення стабільності розчинів, що застосовуються при визначенні супровідних домішок у таблетках енісаміуму йодиду методом ВЕРХ

Часова точка, в год	Кінцевий розчин порівняння			
	площі піків, mAU×min			
	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміум
0	33,2	20,1	38,2	38509
6	32,5	20,5	38,0	38485
12	32,8	20,4	37,6	38410
24	32,7	20,0	37,4	38425
48	32,0	19,9	38,2	38490
RSD, %	1,35	1,28	0,96	0,11

В табл. 5 наведено дані щодо вивчення робасності аналітичної методики.

Варіабельність площ піків аналітів для кожної із умов у порівнянні до початкових умов становить не більше 5 %. Таким чином, аналітичну методику можна вважати робасною.

Таблиця 5

Результати вивчення робасності методики визначення супровідних домішок у таблетках енісаміуму йодиду методом ВЕРХ

Умови, що змінюються		Результати вмісту домішок у модельній суміші			Вміст енісаміуму
		БА	ІНК	БАІНК	
1		2	3	4	5
Швидкість потоку рухомої фази, в мл/хв	0,45	0,098	0,102	0,097	0,101
	0,50	0,101	0,098	0,101	0,099
	0,55	0,102	0,101	0,100	0,102
	RSD, %	2,07	2,07	2,10	1,52
Температура термостату колонки, в °C	25	0,101	0,103	0,099	0,102
	30	0,101	0,098	0,101	0,099
	35	0,099	0,101	0,102	0,101
	RSD, %	1,15	2,50	1,52	1,52
Склад рухомої фази: буферний розчин рН 2,5:вода:ацетонітрил (об/об/об)	28:44:28	0,100	0,099	0,097	0,098
	30:44:26	0,101	0,098	0,101	0,099
	32:44:24	0,101	0,098	0,102	0,102
	RSD, %	0,57	0,59	2,65	2,09

Продовж. табл. 5

1	2	3	4	5	6
рН буферного розчину	рН 2,4	0,100	0,103	0,101	0,102
	рН 2,5	0,101	0,098	0,101	0,099
	рН 2,6	0,103	0,100	0,099	0,100
	RSD, %	1,51	2,51	1,15	1,52
Серійний номер хроматографічної колонки	B16099	0,099	0,100	0,099	0,100
	USYT001 583	0,101	0,098	0,101	0,099
	RSD, %	1,41	1,43	1,41	0,71

Розроблено та проведено валідацію методики контролю таблеток за показником «Розчинення» із застосуванням спектрофотометричної методики.

Розроблено методику кількісного визначення енісаміуму йодиду методом ВЕРХ, придатну для дослідження профілів розчинення таблеток енісаміуму йодиду. Підтверджено специфічність аналітичної методики. Коефіцієнт кореляції лінійної залежності (r) між введеним та знайденим значенням для енісаміуму йодиду становив $> 0,995$. Підтверджена правильність, прецизійність та робасність аналітичної методики, підтверджено стабільність випробовуваних розчинів та розчинів порівняння. Час хроматографування одного зразка становив не більше 5 хв.

Підтверджено, що запропоновані умови хроматографування забезпечують селективність та достатньо короткий час хроматографування. При хроматографуванні розчину порівняння та випробовуваного розчину час утримування першого піка енісаміуму йодиду (йодид-йон) становить близько 2,6 хв, другого піка енісаміуму йодиду (енісаміум) близько 3,8 хв. Типова хроматограма розчину порівняння наведена на рис. 14.

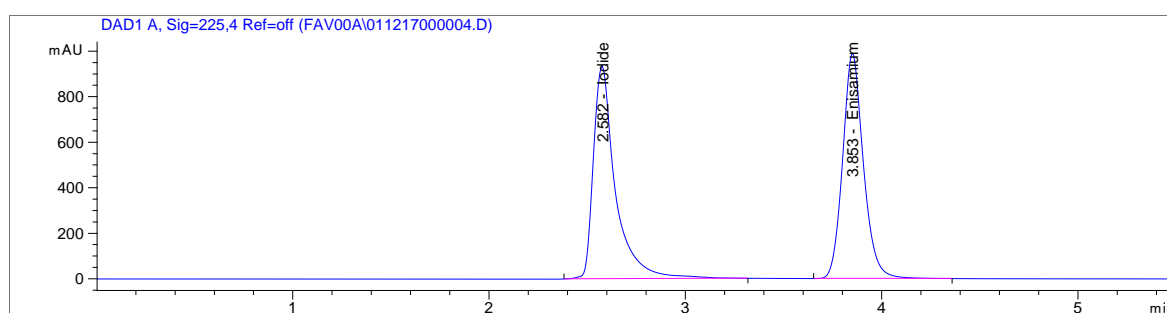


Рис. 14. Типова хроматограма розчину порівняння

Експериментально досліджено профілі вивільнення АФІ із таблеток енісаміуму йодиду в трьох стандартних фармакопейних буферних розчинах з рН 1,2; 4,5 та 6,8. Експериментальні дані вивчення профілів вивільнення енісаміуму йодиду із таблеток наведено на рис. 15.

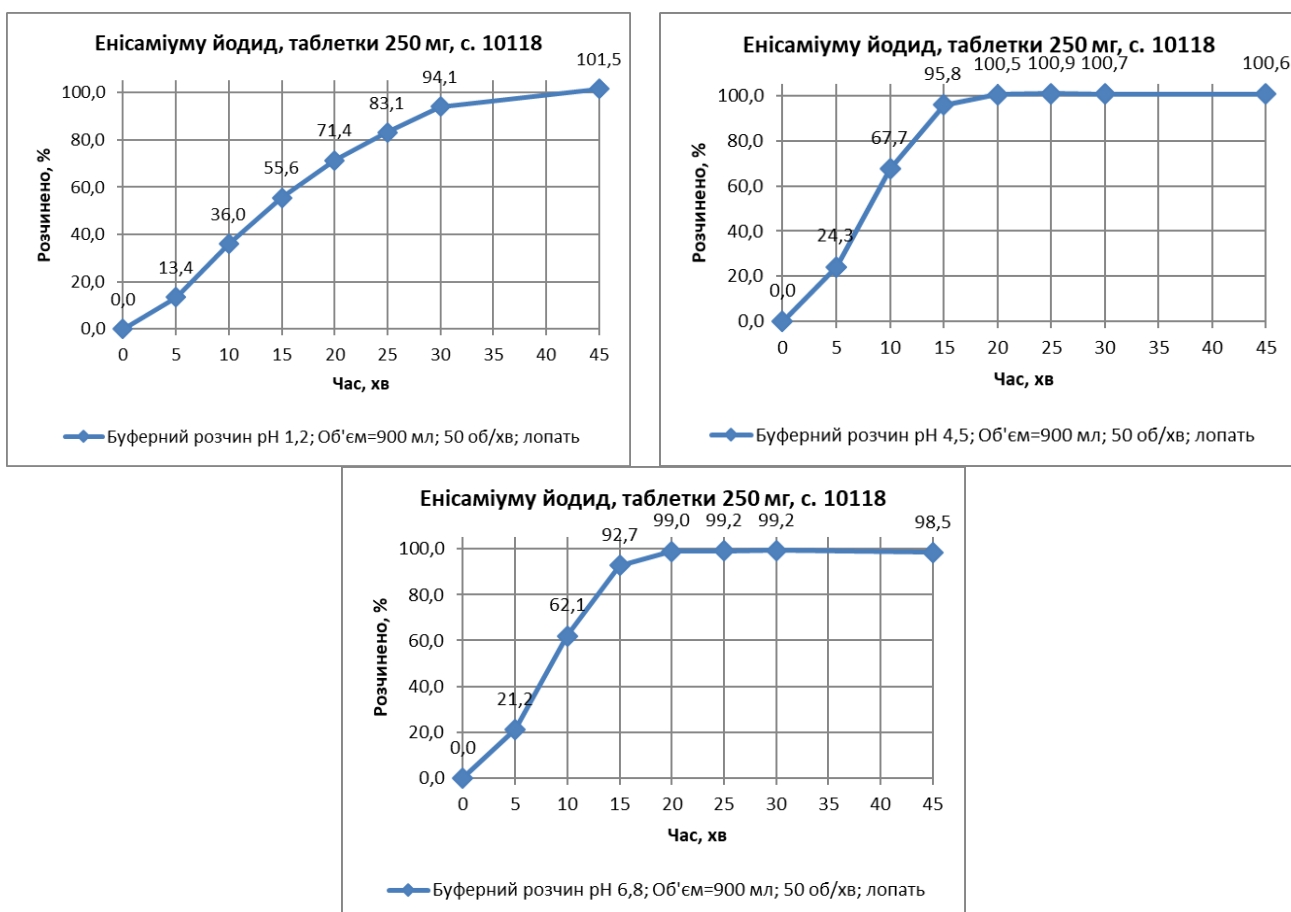


Рис. 15. Профілі вивільнення енісаміуму йодиду із таблеток в буферних розчинах з рН 1,2; 4,6 та 6,8

Із профілів вивільнення можна зробити висновки, що таблетки енісаміуму йодиду не можна віднести до таких, що є «дуже швидко розчинними», оскільки в буферному розчині з рН 1,2 85 % вивільнення АФІ досягається лише після 25 хв.

Розробка та валідація методик контролю капсул енісаміуму йодиду

Розроблено методику кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах методом спектрофотометрії.

Встановлено, що енісаміум йодид має два максимуми поглинання: за довжини хвиль 223 та 267 нм. Ультрафіолетовий спектр поглинання розчину енісаміуму йодиду наведено на рис. 16.

Продемонстровано, що оптимальна довжина хвилі становила 267 нм. Вивчено валідаційні характеристики методики в діапазоні концентрацій 0,016-0,024 мг/мл (80-120 %) на предмет специфічності, правильності, прецизійності, лінійності, діапазону застосування, робастності, внутрішньо-лабораторної прецизійності відповідно до рекомендацій ІСН, ДФУ та ЄФ.

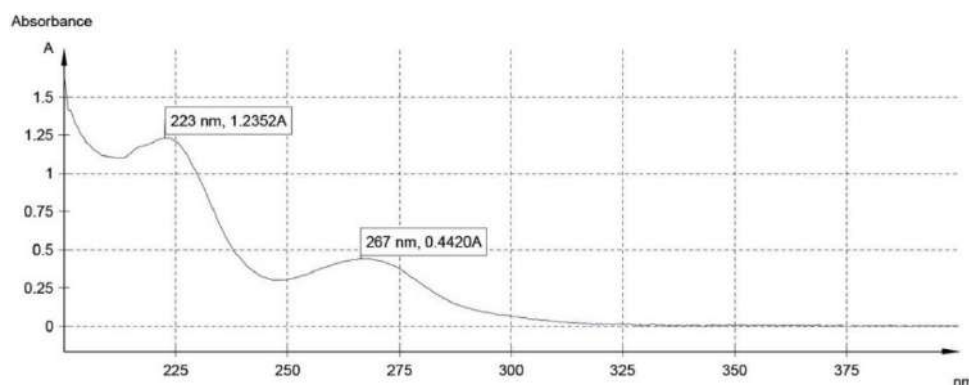


Рис. 16. УФ-спектр енісаміуму йодиду

Результати перевірки точності аналітичної методики наведено в табл. 6. Як видно із табл. 6, відносне стандартне відхилення для отриманих результатів для першого та другого аналітика, а також відносна різниця середніх значень результатів не перевищує 2,0 %, що свідчить про належну повторюваність результатів.

Таблиця 6

Результати перевірки точності методики визначення енісаміуму йодиду в капсулах методом СФ

Номер зразка	Знайдений вміст енісаміуму йодиду (X), % від заявленого вмісту	
	1-й аналітик	2-й аналітик
1	99,9	100,4
2	99,1	99,5
3	98,8	99,6
4	99,9	99,6
5	100,0	99,2
6	99,6	100,0
середнє	99,6	99,7
RSD _x , %	0,5	0,4
RSD внутрішньолабораторна прецизійність, %	0,4	
відносна різниця середніх значень, %	0,14	

Правильність оцінювали аналізуючи 9 модельних розчинів, які готували шляхом розчинення АФІ енісаміуму йодиду з концентраціями 80 %, 100 % та 120 % відносно номінальної концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині з додаванням плацебо (у трьох паралелях для кожного концентраційного рівня). Відносне стандартне відхилення між результатами для одного концентраційного рівня становить не більше 2,0 %. Правильність аналітичної методики знаходиться в межах критерію 98,0-102,0 %. Коефіцієнт кореляції (r) між введеним та знайденим значенням для енісаміуму йодиду становив 0,99996, а

відносний довірчий інтервал (Δ_z) – 0,23 %. Підтверджено стабільність розчинів при їх зберіганні при кімнатній температурі протягом 48 год.

Вперше в процесі виконання дисертаційної роботи запропоновано нормування вмісту супровідних домішок в АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду, що відповідає вимогам ІСН та іншим вимогам фармацевтичної регуляції. Запроваджено ВЕРХ методику одночасного визначення таких домішок як: бензиламін, бензиламід ізонікотинової кислоти, ізонікотинова кислота та інші неідентифіковані домішки в АФІ та ГЛФ. Для твердих ГЛФ енісаміуму йодиду розроблено методики для контролю таких показників якості як «Кількісне визначення», «Супровідні домішки», «Розчинення», «Профілі розчинення». Вперше, в процесі виконання дисертації для АФІ енісаміум йодид, вивчено його розчинність в буферних розчинах з рН 1,2; 4,5; 6,8 та рН 7,5 із застосуванням аналітичної методики ВЕРХ.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі використано сучасні підходи до розробки та валідації чутливих експресних аналітичних методик контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду. Розроблені методики стали на заміну тим, що використовувалися на ранніх етапах життєвого циклу АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду. Методика ВЕРХ замінила ТШХ, чутливість якої була недостатня для забезпечення контролю якості у відповідності до діючих регуляторних вимог. Розроблені ВЕРХ та СФ методики запроваджені до реєстраційних матеріалів АФІ енісаміуму йодиду (МКЯ, номер реєстраційного посвідчення UA/15007/01/01) до МКЯ на таблетки 0,125 г та 0,25 г (РП UA/6493/01/02, РП UA/6493/01/01) та МКЯ на капсули енісаміуму йодиду 500 мг (РП UA/12415/01/01).

1. На підставі аналізу переваг та недоліків існуючих аналітичних методик, що застосовувалися для контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду, обґрунтовано, розроблено та валідовано нові чутливі експресні методики для контролю якості енісаміуму йодиду.

2. Беручи до уваги схему синтезу АФІ, фактичні результати стресових випробувань щодо предикторів домішок та рекомендації настанови ІСН Q3A та Q3B, вперше запропоновано нове нормування вмісту супровідних домішок в АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду, а саме бензиламіну, бензиламиду ізонікотинової кислоти, ізонікотинової кислоти та неідентифікованих домішок, що можуть потенційно бути присутніми.

3. Вперше запропоновано чутливу, просту у виконанні методику ВЕРХ одночасного визначення бензиламіну, бензиламиду ізонікотинової кислоти, ізонікотинової кислоти та інших неідентифікованих домішок в АФІ та ГЛФ (таблетках та капсулах) енісаміуму йодиду на підставі вивчення максимуму поглинання ідентифікованих домішок із використанням УФ спектрофотометрії; та відповідно підібраними складом рухомої фази з йон-парним реагентом натрію октансульфонату, а також з використанням колонки з сорбентом C18 150 мм x 4,6 мм, з розміром часток 5 мкм, дві довжини хвилі детектування 205 і 265 нм.

4. Методику визначення супровідних домішок було адаптовано для визначення кількісного вмісту АФІ. Для покращення симетрії піка концентрацію випробовуваного розчину та розчину порівняння було знижено з 0,4 мг/мл до 0,3 мг/мл, а об'єм інжекції проб із 20 мкл до 10 мкл.

5. Вперше в процесі виконання дисертаційної роботи вивчено розчинність енісаміуму йодиду у відповідності до БСК із застосуванням аналітичної методики ВЕРХ. Підтверджено, що енісаміум йодид має високу розчинність.

6. Для таблеток та капсул енісаміуму йодиду розроблено методику спектрофотометричного визначення, яка застосовується для контролю показників «Кількісне визначення» та «Розчинення». Для контролю супровідних домішок в ГЛФ застосовано таку саму методику контролю домішок, як і в АФІ. Розроблено ВЕРХ-методику вивчення профілів розчинення, де час виходу основного піка становить менше 3-х хв, а при дослідженні не вимагається додаткового розведення випробовуваного розчину (експресність методики).

7. Результати валідації розроблених аналітичних методик підтверджують їх відповідність вимогам ДФУ, ЄФ, ІСН за всіма валідаційними характеристиками: специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, діапазон застосування, робасність.

8. Розроблені та запроваджені в лабораторіях АТ «Фармак» методики ВЕРХ та СФ застосовуються для відслідковування/управління процесом індустріального синтезу АФІ, вивчення стабільності АФІ та ГЛФ, вивчення впливу змін на ГЛФ при запровадженні нових виробників ДР чи зміні технології виготовлення. Вперше при виконанні дисертаційної роботи систематизовано дані по аналітичних методиках контролю енісаміуму йодиду, які розроблено та валідовано у відповідності до вимог ІСН, ДФУ, ЄФ.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Бурмака О. В., Гуреєва С. М., Маргітич В. М. Розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах. *Фармацевтичний часопис*. 2017. № 2 (42). С. 64–71. (Дисертант брав участь у плануванні експерименту, провів експеримент, узагальнив результати та підготував статтю).

2. Бурмака А. В., Гуреєва С. Н., Маргітич В. М. Разработка методики контроля сопутствующих примесей субстанции энисамиума йодида. *Фармаком*. 2017. № 3. С. 17–25. (Дисертант провів експеримент, узагальнив результати та підготував статтю до друку).

3. Бурмака О. В. Розробка та валідація методики визначення енісаміуму йодиду для вивчення профілів розчинення протівірусного засобу. *Фармацевтичний журнал*. 2018. № 3–4. С. 38–46.

4. Бурмака О. В., Гуреєва С. М., Маргітич В. М. Валідація методики визначення супровідних домішок в активній речовині протівірусного засобу енісаміуму йодиду. *Запорожский медицинский журнал*. 2018. Т. 20, № 5 (110).

С. 708–716. (Дисертант провів експеримент, узагальнив результати та підготував статтю до друку).

5. Бурмака О. В. Валідація ВЕРХ-методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в активному фармацевтичному інгредієнті. *Фармацевтичний часопис*. 2019. № 1. С. 71–78.

6. In Vitro Bioavailability Study of an Antiviral Compound Enisamium iodide / E. Haltner-Ukomadu, S. Gureyeva, O. Burmaka, A. Goy, L. Mueller, G. Kostyuk, V. Margitich. *Stientia Pharmaceutica*. 2018. Vol. 86, № 1. С. 1–10. (Дисертант брав участь у плануванні та проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті по частині вивчення розчинності енісаміуму йодиду).

7. Бурмака О. В., Маргітич В. М. Забезпечення якості оригінальних активних фармацевтичних інгредієнтів. *Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії* : матеріали II Міжнародної наук.-практ. інтернет-конф., 12–13 листоп. 2015 р. Х. : Вид-во НФаУ, 2015. С. 57–58. (Дисертант провів експеримент, узагальнив результати та підготував статтю до друку).

8. Бурмака О. В., Гуреєва С. М., Маргітич В. М. Стресові дослідження як важлива складова розробки методики контролю. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи* : матеріали VIII Національного з'їзду фармацевтів України, 13–16 верес. 2016 р. Х. : Вид-во НФаУ, 2016. Т. 1. С. 170–171. (Дисертант провів експеримент, узагальнив результати та підготував статтю до друку).

9. Бурмака О. В., Гуреєва С. М., Маргітич В. М. Оптимізація методик високоефективної рідинної хроматографії. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VI наук.-практ. конф. з міжнародною участю, 10–11 листоп. 2016 р. Т. : Укрмедкнига, 2016. С. 176–177. (Дисертант провів експеримент, узагальнив результати та підготував статтю до друку).

10. Burmaka O. V., Gureyeva S. M., Margitich V. M. Elemental impurities in the light of ICH Q3D requirements. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів* : тези доп. XXIV Міжнарод. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів, 20–21 квіт. 2017 р. Х. : Вид-во НФаУ, 2017. Т. 1. С. 161–162. (Дисертант провів експеримент, узагальнив результати та підготував статтю до друку).

11. Бурмака О. В. Розробка методики контролю якості таблеток енісаміуму йодиду за показником «Кількісне визначення» із застосуванням методу УФ-спектрофотометрії. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VII наук.-практ. конф. з міжнародною участю, 27–28 верес. 2018 р. Т. : Укрмедкнига, 2018. С. 149–150.

АНОТАЦІЯ

Бурмака О. В. Розробка та валідація методик контролю якості активного фармацевтичного інгредієнта та готових лікарських форм енісаміуму йодиду. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія (226 – Фармація, промислова фармація). – Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, 2020.

Дисертаційна робота присвячена розробці та валідації методик контролю якості активного фармацевтичного інгредієнта та готових лікарських форм енісаміуму йодиду.

Вперше розроблено та проведено валідацію методики високоефективної рідинної хроматографії та методики абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області, які можуть забезпечити контроль якості активного фармацевтичного інгредієнту та готових лікарських форм енісаміуму йодиду (таблетки та капсули).

Вперше в процесі виконання дисертаційної роботи запропоновано нормування вмісту супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті та готових лікарських формах енісаміуму йодиду, що відповідає вимогам Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів для людини (ICH).

Для твердих ГЛФ енісаміуму йодиду розроблено такі показники якості як «Кількісне визначення», «Супровідні домішки», «Розчинення», «Профілі розчинення», розроблено відповідні спектрофотометричні, хроматографічні методики аналізу та проведено валідацію за відповідними характеристиками.

Розроблені методики запроваджені на АТ «Фармак» для контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду.

Ключові слова: енісаміум йодид, АФІ, кількісне визначення, супровідні домішки, розчинність, розчинення, профілі розчинення, ВЕРХ, СФ, валідація.

АННОТАЦИЯ

Бурмака А. В. Разработка и валидация методик контроля качества активного фармацевтического ингредиента и готовых лекарственных форм энисамиума йодида. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – (226 – Фармация, промышленная фармация). – Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье, 2020.

Впервые разработано и проведено валидацию методики высокоэффективной жидкостной хроматографии и методики абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой области, которые могут обеспечить

контроль качества активного фармацевтического ингредиента и готовых лекарственных форм энисамиума йодида (таблетки и капсулы).

Впервые в процессе выполнения диссертационной работы предложено нормирования содержания сопутствующих примесей в активном фармацевтическом ингредиенте и готовых лекарственных формах энисамиума йодида, которое соответствует требованиям Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для человека (ICH).

Для твердых ГЛФ энисамиума йодида разработаны такие показатели качества, как «Количественное определение», «Сопутствующие примеси», «Растворение», «Профили растворения», разработаны соответствующие спектрофотометрические, хроматографические методики анализа и проведено валидацию по соответствующим характеристикам.

Разработанные методики внедрены на АО «Фармак» для контроля качества АФИ и ГЛФ энисамиума йодида.

Ключевые слова: энисамиум йодид, АФИ, количественное определение, сопутствующие примеси, растворимость, растворение, профили растворения, ВЭЖХ, СФ, валидация.

ANNOTATION

Burmaka O. V. Development and validation of methods for quality control of the active pharmaceutical ingredient and finished dosage forms of enisamium iodide. – Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

Dissertation for the degree of a candidate of pharmaceutical sciences in specialty 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy (226 – Pharmacy, industrial pharmacy). – Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia, 2020.

In virtue of the analysis of available literature data regarding the quality control of the active pharmaceutical ingredient enisamium iodide and its finished pharmaceutical forms, it was concluded that the control methods are not sufficiently described.

The method of control of the related substances of the API has been developed. During the development of the method of control of the related substances the synthesis chart, as well as the results of the forced degradation study were taken into account. The list of potential impurities of enisamium iodide, which includes benzylamine, isonicotinic acid and isonicotinic acid benzylamide, was defined.

For the possibility of providing a chromatographic separation of peaks of impurities and peaks of the main component, an ion-pair reagent sodium octanesulfonate was used. Chromatographic column with sorbent silica gel modified by octadecyl groups, 150 mm x 4.6 mm in size with a particles size of 5 μm was estimated as optimal.

Two waves of detection have been introduced: 205 nm (for the determination of benzylamine, isonicotinic acid benzylamide and unidentified impurities) and 265 nm

(for determination of isonicotinic acid). The optimum pH value of the buffer solution was set at pH 2.5. Acetonitrile was chosen as an organic part of the mobile phase.

It has been established that the concentration of 0.4 mg per ml of enisamium iodide in the mobile phase was optimal. The forced degradation studies have been conducted. The follow exposure factors were used: temperature, hydrogen peroxide, hydrochloric acid, sodium hydroxide, light.

The validation of the method of related substances control was performed. Detection limits and limits of quantification for identified and unidentified impurities have been determined. Validation characteristics such as specificity, accuracy, precision, range of use, robustness, intermediate precision have been confirmed. The linearity has been confirmed within the range of 0.01-0.06 % for each of the impurities. The correlation coefficients of linear regression (r) between the entered and found values for each of the determined impurities were greater than 0.990 and the relative confidence intervals (Δz) were at the level not more than 5.0 %. Stability of the test solution, reference solution and solution for system suitability test upon storage at room temperature for 48 hours have been confirmed.

The method of quantitative determination of API by the HPLC was developed and validated. The developed method for control of the related substances in the API was used as a base for development of the Assay test of enisamium iodide in the API. The necessary corrections (to improve characteristics of the main peak) of analytical method were performed.

The solubility study in the pH range from 1.2 to 7.5 has been performed for possibility to classify of enisamium iodide according to the Biopharmaceutics Classification System (BCS).

The spectrophotometric method of quantitative determination as well as method of control of the related substances of enisamium iodide in tablets and capsules were developed. All validation characteristics were proved.

The development and validation of the method for the control of tablets and capsules by parameter «Dissolution» using spectrophotometric method were carried out.

The method of the quantitative determination of enisamium iodide by the HPLC was developed. The method was suitable for study of dissolution profiles of enisamium iodide in tablets and capsules.

The dissolution profiles of enisamium iodide in tablets and capsules using three standard pharmacopoeia buffer solutions with pH of 1.2, 4.5 and 6.8 have been experimentally investigated.

The quality control methods of tablets and capsules such as «Assay», "Related substances" and «Dissolution profiles» were developed.

The novelties of the proposed research work are as follows. The author for the first time developed and validated HPLC methods and methods of ultraviolet absorption spectrophotometry for quality control API and finished drug products of enisamium iodide.

The developed methods of quality control are implemented at Farmak JSC. The validation results of analytical methods are used during preparing the registration

materials intended for registration/renewal procedures in Ukraine and other countries of the world.

Key words: enisamium iodide, API, assay, related substances, solubility, dissolution, dissolution profiles, HPLC, UV spectrophotometry, validation.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ	–	активний фармацевтичний інгредієнт;
АТ	–	акціонерне товариство;
БА	–	бензиламін;
БАІНК	–	бензиламід ізоніотинової кислоти;
БСК	–	Біофармацевтична система класифікації;
ВЕРХ	–	високоєфективна рідинна хроматографія;
ВООЗ	–	Всесвітня Організація Охорони Здоров'я;
ГЛФ	–	готова лікарська форма;
ГЛЗ	–	готовий лікарський засіб;
ДФУ	–	Державна Фармакопея України;
ЕЙ	–	енісаміум йодид;
ЄФ	–	європейська фармакопея;
ІНК	–	ізоніотинова кислота;
ЛЗ	–	лікарський засіб;
МВ	–	межа виявлення;
МКВ	–	межа кількісного визначення;
РП	–	реєстраційне посвідчення;
СФ	–	спектрофотометрія;
ТШХ	–	тонкошарова хроматографія;
УФ	–	ультрафіолетова(ий) ;
АТС	–	Anatomical Therapeutic Chemical;
FDA	–	Food and Drug Administration;
ICH	–	Міжнародна конференція з гармонізації технічних вимог до лікарських засобів для людини;
RSD	–	відносне стандартне відхилення.