

АТ «Фармак»  
Міністерство охорони здоров'я України  
Запорізький державний медичний університет

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

БУРМАКА ОЛЕКСІЙ ВАСИЛЬОВИЧ

УДК 615.453.6:615.225.2:54.062:543.42.062

### ДИСЕРТАЦІЯ

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

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія  
22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело  
\_\_\_\_\_ О. В. Бурмака

Науковий керівник Маргітич Віктор Михайлович, доктор медичних наук

Київ – 2020

## 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). – АТ «Фармак», Київ, 2020, Запорізький державний медичний університет, МОЗ України, Запоріжжя, 2020.

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

На основі аналізу доступних даних літератури щодо контролю якості АФІ енісаміуму йодиду та його ГЛФ зроблено висновок, що методики контролю недостатньо описані. Наявні методики не можна кваліфікувати такими, що відповідають рекомендаціям Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів для людини (ICH). У зв'язку з цим в рамках виконання дисертаційної роботи було поставлено завдання: розробити та провести валідацію методик контролю якості АФІ та ГЛФ за основними показниками якості з підходами ICH.

Розроблено методику контролю якості супровідних домішок АФІ. При розробці методики контролю супровідних домішок було взято до уваги схему синтезу енісаміуму йодиду та результати стресових випробувань. Визначено перелік потенційних супровідних домішок енісаміуму йодиду, до якого належать бензиламін, ізонікотинова кислота та бензиламід ізонікотинової кислоти. На основі рекомендацій ICH розраховано цільові ліміти детектування та ліміти кількісного визначення домішок. Враховуючи необхідність контролю домішок на рівні «не більше 0,05 % кожної домішки», було застосовано метод високоефективної рідинної хроматографії. Для можливості забезпечення хроматографічного розділення піків домішок та піків основного компонента

було застосовано йон-парний реагент натрію октансульфонат. Хроматографічну колонку з сорбентом силікагель модифікований октадецильними групами, розміром 150 мм x 4,6 мм, з розміром часток 5 мкм, визначено як оптимальну. Для можливості встановлення довжини хвилі детектування досліджено максимуми поглинання кожної домішки із використанням УФ спектрофотометрії. Встановлено дві хвилі детектування: 205 нм (для визначення бензиламіну, бензиламід у ізонікотинової кислоти та неідентифікованих домішок) та 265 нм (для визначення ізонікотинової кислоти). Оптимальне значення рН буферного розчину становило 2,5. При зниженні рН погіршувалося розділення піка бензиламід у ізонікотинової кислоти з піком органічної частини енісаміуму йодиду, а при підвищенні рН погіршувалося розділення піка ізонікотинової кислоти з піком йодид-йону. Ацетонітрил вибрано як органічну частину рухомої фази. Оптимізовано концентрацію випробовуваного розчину, з урахуванням необхідності високої чутливості методики та збереження достатніх характеристик піків домішок та піків основного компонента. Підтверджено, що концентрація 0,4 мг/мл енісаміуму йодиду в рухомій фазі є оптимальною. Проведено стресові дослідження із застосуванням таких факторів впливу: температура, перекис водню, хлористоводнева кислота, натрію гідроксид, світло. Визначено, що основними можливими домішками є бензиламін та ізонікотинова кислота. В умовах стресових випробувань підтверджено специфічність аналітичної методики. Встановлено вимоги до хроматографічної системи за такими характеристиками як симетрія піка, число теоретичних тарілок, співвідношення пік/западина, відносне стандартне відхилення.

Проведено валідацію методики контролю супровідних домішок. Встановлені ЛД та ЛКВ ідентифікованих та неідентифікованих домішок. Підтверджено такі валідаційні характеристики як специфічність, правильність, прецизійність, діапазон застосування, робасність, внутрішньо-лабораторна прецизійність. Підтверджена лінійність в 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 ( $\Delta z$ ) 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.

Розроблено та проведено валідацію методики кількісного визначення АФІ методом ВЕРХ. Методика, що розроблена для контролю супровідних домішок, була основою для розробки методики кількісного визначення АФІ енісаміуму йодиду. Для покращення симетрії піка концентрацію випробовуваного розчину та розчину порівняння було знижено з 0,4 мг/мл до 0,3 мг/мл. Довжина 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 Державною Фармакопеею України. Коефіцієнт кореляції лінійної залежності ( $r$ ) між введеним та знайденим значеннями для енісаміуму йодиду становив 0,99995.

Для можливості класифікації енісаміуму йодиду у відповідності до Біофармацевтичної системи класифікації (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. Встановлено, що розчинність енісаміуму йодиду при 25 °С становила близько 60 мг/мл у всіх чотирьох буферних розчинах, а при 37 °С – від 130 мг/мл до 150 мг/мл, в залежності від значення рН буферного розчину (висока розчинність).

Розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках. Значення  $\delta$  noise становило 0,16 %, та не перевищує критерію прийнятності «не більше 0,5 %». Підтверджена лінійність для 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 критерії прийнятності  $\leq 2,6$ ). 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. RSD для ВЛП становило 0,31 %, а відносна різниця середніх значень результатів – 0,15 %. Правильність аналітичної методики знаходилася в межах критерію 98,0 – 102,0 %. Експериментально встановлено, що випробовувані розчини стабільні протягом 48 годин при їх зберіганні за кімнатної температури. Встановлено, що зміна довжини хвилі детектування (від 265 нм до 269 нм) та зміна концентрації компенсаційного розчину (0,09 та 0,11 М розчин хлористоводневої кислоти) не має значного впливу на результати аналізу. Відхилення співвідношень абсорбції розчину порівняння та випробовуваного розчину у всіх експериментах щодо робастності не перевищувало 1,0 %. Загальна невизначеність аналізу ( $\Delta_{As}$ ) становила 1,6 %.

На основі методики контролю якості АФІ розроблено та проведено валідацію методики визначення супровідних домішок в таблетках енісаміуму йодиду. Для методики встановлено ЛД (бензиламін – 0,003 %, ізонікотинова кислота – 0,004 %, бензиламід ізонікотинової кислоти – 0,004 %, неідентифіковані домішки – 0,006 %) та ЛКВ (бензиламін – 0,010 %, ізонікотинова кислота – 0,013 %, бензиламід ізонікотинової кислоти – 0,011 %, неідентифіковані домішки – 0,018 %). Забезпечена специфічність аналітичної методики. Досягнуто розділення визначуваних домішок та піків енісаміуму йодиду. 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 та робасність. Підтверджено стабільність досліджуваних розчинів.

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

Розроблено методику ВЕРХ для кількісного визначення енісаміуму йодиду. Методику застосовано для дослідження профілів розчинення таблеток. Підтверджено специфічність аналітичної методики. Коефіцієнт кореляції лінійної залежності ( $r$ ) між введеним та знайденим значеннями для енісаміуму йодиду становив  $> 0,995$ . Підтверджена правильність, прецизійність та робасність аналітичної методики. Підтверджена стабільність випробовуваних розчинів та розчинів порівняння. Час хроматографування одного зразка становив не більше 5 хв. Експериментально досліджено профілі вивільнення АФІ із таблеток енісаміуму йодиду в трьох стандартних фармакопейних буферних розчинах з рН 1,2; 4,5 та 6,8.

Розроблено методику кількісного визначення енісаміуму йодиду методом спектрофотометрії в капсулах. Продемонстровано, що оптимальна довжина хвилі становила 267 нм. В діапазоні концентрацій 0,016–0,024 мг/мл (80 % – 120 %) вивчено такі валідаційні характеристики методики: специфічність, правильність, прецизійність, лінійність, діапазон застосування, робасність, ВЛП у відповідності до рекомендацій ІСН. Коефіцієнт кореляції ( $r$ ) між введеним та знайденим значеннями для енісаміуму йодиду становив 0,99996, а відносний довірчий інтервал – ( $\Delta_z$ ) 0,23 %. Підтверджено стабільність розчинів при їх зберіганні за кімнатної температури протягом 48 год.

При розробці методик контролю капсул енісаміуму йодиду за показниками «Кількісне визначення», «Супровідні домішки» та «Профілі розчинення» за основу було використано методики контролю якості таблеток. Для методик контролю капсул проведено валідацію.

Новизна роботи полягає в тому, що автором вперше розроблено та валідовано ВЕРХ та СФ-методику контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду.

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. Розроблено 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 енісаміуму йодиду вивчено його розчинність в буферних розчинах з рН 1,2; 4,5; 6,8 та 7,5 із застосуванням аналітичної методики ВЕРХ.

Розроблені методики контролю якості впроваджені на АТ «Фармак», а результати валідації аналітичних методик застосовуються при формуванні реєстраційних матеріалів, що подаються на реєстрацію/перереєстрацію в Україні та інших країнах світу.

Розроблені ВЕРХ та СФ-методики застосовуються в АТ «Фармак» 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.

*Ключові слова:* енісаміум йодид, таблетки, капсули, кількісне визначення, супровідні домішки, ВЕРХ, СФ, валідація.

## ANNOTATION

*Burmaka O. V.* Development and validation of methods for quality control of the active pharmaceutical ingredient and finished dosage forms of enisamium iodide. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for a candidate degree in pharmaceutical science in speciality 15.00.02 «Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy» (226 – Pharmacy, industrial pharmacy). – JSC «Farmak», Kyiv, 2020, Zaporizhzhia State Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Zaporizhzhia, 2020.

The dissertation is devoted to the development and validation of methods for quality control of the active pharmaceutical ingredient (API) and the finished dosage forms (FDF) of enisamium iodide.

In virtue of the analysis of available literature data regarding the quality control of the API enisamium iodide and its FDF, it was concluded that the control methods are not sufficiently described. The available methods cannot be qualified as such which are in compliance with the recommendations of the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Medicinal Products for Human Use (ICH). In this regard, in the framework of the implementation of the dissertation, the task was follow: develop and validate the methods of quality control of API and FDF by the main quality attributes with the ICH approaches.

The method of quality 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. Based on ICH recommendations, target detection limits and limits for quantitative determination of impurities were concluded. Taking into account the necessity the control of impurities at the level of «not more than 0.05 % of each impurity», the method of the high-performance liquid chromatography (HPLC) was used. 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  $\mu\text{m}$  was estimated as optimal. To establish the wavelength of the detection, maxima of absorption of each impurity



using UV spectrophotometry were investigated. 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 with pH 2.5. In a case of reducing of pH, the separation of the peak of isonicotinic acid benzylamide with the peak of the organic part of the enisamium iodide was impaired. In a case of increasing of pH value, the separation of the peak of the isonicotinic acid with the iodine ion peak was impaired. Acetonitrile was chosen as an organic part of the mobile phase. The concentration of the test solution was optimized. It was taken into account the necessity the high sensitivity of the method and maintaining sufficient characteristics of the peaks of impurities and peaks of the main component. It has been confirmed 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. It has been determined that the main possible impurities were benzylamine and isonicotinic acid. In the conditions of forced degradation study the specificity of the analytical method was confirmed. The requirements for a chromatographic system by such characteristics as symmetry peak, number of theoretical plates, peak valley ratio, and relative standard deviation were established.

The validation of the method of related substances control was performed. Detection limits as well as limits of quantification of identified and unidentified impurities have been counted. Specificity, accuracy, precision, range of use, robustness, intermediate precision of analytical method has been confirmed. The linearity for each impurity is approved in the range of concentrations 0.01–0.06 %. The correlation coefficients of linear regression ( $r$ ) between the entered and found values for each of the determined impurities were greater than 0.990. The levels «not more than 5.0 %» of  $\Delta z$  (relative confidence intervals) were assigned. Stability of the solutions have been confirmed (during storage at room temperature for 48 hours).

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 for development of the Assay test of enisamium iodide in the API. The concentration of the test solution and the reference solution was reduced from 0.4 mg per ml to 0.3 mg per ml to improve the peak symmetry. The wavelength of detection was 225 nm. Such requirements as relative standard deviation, symmetry and number of theoretical plates of the peaks of enisamium iodide were established. The validation characteristics of the method which was recommend by the ICH and the State Pharmacopoeia of Ukraine was prove. The correlation coefficient of the linear dependence ( $r$ ) between the entered and found values for enisamium iodide was 0.99995.

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 solubility was studied at 25 °C and 37 °C. The HPLC method was used to establish the concentration of dissolved enisamium iodide. It has been found out that the solubility of enisamium iodide at 25 °C was about 60 mg per ml in four buffer solutions and from 130 mg per ml to 150 mg per ml at 37 °C, depending on the pH of the buffer solution (high solubility).

The spectrophotometric method of quantitative determination of enisamium iodide in tablets was developed.  $\delta$  noise was 0.16 % – value did not exceed the acceptance criterion of «no more than 0.5 %». The linearity for enisamium iodide in the range of concentrations from 80 % to 120 % (0.016 – 0.024 mg per ml) has been confirmed relatively to the nominal concentration of enisamium iodide in the test solution (0.2 mg per ml). The correlation coefficient between entered and found values for enisamium iodide was 0.99995. It was corresponded to the acceptance criterion for linear dependence ( $\geq 0.99981$ ). The value  $|a|$  (Y-intercept of linear dependence for the calculated regression line) was 0.11222 (with the acceptance criterion  $\leq 2.6$ ). The confidence interval of the precision of results ( $\Delta_z$  %) was 0.24 %, which corresponds to the critical value for the precision of results  $\Delta_z \% \leq \Delta_{As}$  ( $\Delta_{As} = 1.6$  %). The systematic error  $\delta = |Z - 100|$  was 0.11 at the criterion of the

insignificance of the systematic error ( $\delta \leq 0.32 \times \Delta_{As}$ ) of no more than 0.51. The RSD for intra-laboratory precision was 0.31 %, and the relative difference between the average values of the results was 0.15 %. Accuracy of the analytical method was within the criterion of 98.0–102.0 %. It has been experimentally determined that the solutions to be tested were stable for 48 hours at room temperature. It has also been established that the change in the wavelength of detection (from 265 nm to 269 nm) and changed compensation solution (used 0.09 and 0.11 M hydrochloric acid) did not have a significant impact on the results of the analysis. The deviation of the absorbance ratios of the reference solution and test solution in all experiments on the robustness did not exceed 1.0 %. The total uncertainty of the analysis ( $\Delta_{As}$ ) was 1.6 %.

The development and validation of the method of determination of the related impurities in enisamium iodide tablets was performed.

The method of related substances control in API was used for development of the same test for tablets. Detection limits (benzylamine – 0.003 %, isonicotinic acid – 0.004 %, isonicotinic acid benzylamide – 0.004 %, unidentified impurities – 0.006 %) and limits of quantitative determination (benzylamine – 0.010%, isonicotinic acid – 0.013%, isonicotinic acid benzylamide – 0.011%, unidentified impurities – 0.018%) of the method was indicated. The specificity of the analytical method was demonstrated. The separation of impurities against each other and against the peaks of the main component was ensured. The correlation coefficients of linear regression ( $r$ ) between the entered and found values for each of the determined impurities were: benzylamine – 0.99978, isonicotinic acid benzylamide – 0.99988, isonicotinic acid – 0.99959, unidentified impurities – 0.99994. Validation characteristics such as accuracy, precision and robustness have been confirmed. Stability of the solutions intended to be used have been confirmed.

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

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

enisamium iodide tablets. The specificity of the analytical method has been confirmed. The correlation coefficient of linear regression ( $r$ ) between the entered and found values for enisamium iodide was  $> 0.995$ . Accuracy, precision and robustness of analytical method have been confirmed. Stability of the test solution and reference solution have been confirmed. The time of chromatography of one sample was not more than 5 minutes. The dissolution profiles of enisamium iodide tablets using three standard pharmacopoeia buffer solutions with pH of 1.2, 4.5 and 6.8 have been experimentally investigated.

The method of quantitative determination of enisamium iodide in capsules using spectrophotometry method was developed. The optimal wavelength for detection was found to be 267 nm. The method validation characteristics such as specificity, accuracy, precision, linearity, range of use, robustness, intermediate precision in the range of concentrations 0.016–0.024 mg per ml (80–120 %) were studied in accordance with ICH recommendations. The correlation coefficient ( $r$ ) between the entered and found values for enisamium iodide was 0.99996, at the same time the relative confidence interval ( $\Delta_z$ ) was at the level 0.23 %. Solutions were confirmed to be stable for 48 hours at the room temperature. The quality control methods of tablets were used during the development of methods of control capsules of enisamium iodide by parameters «Assay», «Related substances» and «Dissolution profiles». Validation of quality control methods of capsules has been carried out.

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 limits of impurities for the API and FDF of enisamium iodide were established in accordance with ICH and other current requirements of pharmaceutical regulation for the first time during the performance of dissertation. It was introduced HPLC method for the simultaneous determination of such impurities as: benzylamine, isonicotinic acid benzylamide, isonicotinic acid and other unidentified impurities in API and FDF. The methods for control such quality parameters as «Assay», «Related substances», «Dissolution», «Dissolution profiles»

were developed for the solid FDF of enisamium iodide. The solubility of API enisamium iodide in buffer solutions with pH 1.2, 4.5, 6.8 and 7.5 using the analytical HPLC method was studied for the first time in the process of performing the dissertation. 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.

Developed HPLC and spectrophotometric methods are used at Farmak JSC to control/manage the process of industrial synthesis of API, stability study of API and FDF, to investigate the effect of the changes during providing of new manufacturers of extipients or changes in the manufacturing process of FDF. For the first time during the performance of the dissertation data regarding the analytical methods of quality control of enisamium iodide were systematized. The developed analytical methods are validated in accordance with the requirements of ICH, State Pharmacopoeia of Ukraine and EP.

*Key words:* enisamium iodide, tablets, capsules, assay, related substances, HPLC, UV spectrophotometry, validation.

#### *Список публікацій здобувача*

1. Бурмака О. В., Гурєєва 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., Гурєєва 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 противірусного 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 противірусного 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.

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	19
ВСТУП.....	22
РОЗДІЛ 1 ПРОТИВІРУСНІ ПРЕПАРАТИ, ЩО ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ ПРИ ГРИПІ. ПІДХОДИ ДО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ ТА ГОТОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	29
1.1 Огляд противірусних препаратів, що застосовуються при грипі .	29
1.2 Методи контролю якості, які застосовуються при аналізі активних фармацевтичних інгредієнтів та готових лікарських форм у формі таблеток та капсул.....	35
1.3 Огляд методик контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду	37
1.4 Підходи до валідації аналітичних методик .....	39
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	44
2.1 Алгоритм проведення експериментальних досліджень .....	44
2.2 Фізико-хімічні властивості енісаміуму йодиду.....	46
2.3 Об'єкти дослідження, реактиви, прилади .....	47
2.4 Характеристика методик дослідження.....	51
2.4.1 ВЕРХ-методика визначення супровідних домішок в АФІ енісаміуму йодиду .....	51
2.4.2 ВЕРХ-методика кількісного визначення в АФІ енісаміуму йодиду .....	53
2.4.3 ВЕРХ-методика вивчення розчинності АФІ енісаміуму йодиду .....	54
2.4.4 ВЕРХ-методика визначення супровідних домішок в таблетках та капсулах енісаміуму йодиду.....	57
2.4.5 Спектрофотометрична методика кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках та капсулах.....	58



2.4.6 Спектрофотометрична методика вивчення «Розчинення» енісаміуму йодиду в таблетках та капсулах.....	60
2.4.7 ВЕРХ-методика вивчення профілів розчинення енісаміуму йодиду з таблеток та капсул .....	63
РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ АФІ ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ .....	67
3.1 Розробка методики контролю домішок в АФІ енісаміуму йодиду	68
3.2 Валідація методики контролю супровідних домішок енісаміуму йодиду .....	79
3.3 Розробка та валідація методики кількісного визначення енісаміуму йодиду .....	93
3.4 Вивчення розчинності енісаміуму йодиду .....	103
ВИСНОВКИ .....	105
РОЗДІЛ 4 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ТАБЛЕТОК ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ .....	107
4.1 Розробка та валідація методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках .....	107
4.2 Розробка та валідація методики визначення супровідних домішок у таблетках.....	115
4.3 Розробка та валідація методики контролю якості таблеток за показником «Розчинення» .....	128
4.4 Розробка та валідація методики вивчення профілів вивільнення енісаміуму йодиду з таблеток.....	134
ВИСНОВКИ .....	142
РОЗДІЛ 5 РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ КАПСУЛ ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ .....	144
5.1 Розробка та валідація методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах .....	144
5.2 Розробка та валідація методик визначення супровідних домішок в капсулах .....	153

5.3 Розробка та валідація методики контролю якості капсул за показником «Розчинення» .....	164
5.4 Розробка та валідація методики вивчення профілів вивільнення енісаміуму йодиду з капсул .....	169
ВИСНОВКИ .....	179
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	180
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	182

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт;
АТ	– акціонерне товариство;
БА	– бензиламін;
БАІНК	– бензиламід ізоніотинової кислоти;
БСК	– Біофармацевтична система класифікації;
ВЕРХ	– високоефективна рідинна хроматографія;
ВИД	– видима(ий);
ВЛП	– внутрішньолабораторна прецизійність;
ВООЗ	– Всесвітня Організація Охорони Здоров'я;
ГЛФ	– готова лікарська форма;
ГЛЗ	– готовий лікарський засіб;
ГРВІ	– гостра респіраторна вірусна інфекція
ДР	– допоміжна речовина(и);
ДФУ	– Державна Фармакопея України;
ЕЙ	– енісаміум йодид;
ЄФ	– європейська фармакопея;
ІНК	– ізоніотинова кислота;
ЛД	– ліміт детектування;
ЛЗ	– лікарський засіб;
ЛКВ	– ліміт кількісного визначення;
ЛП	– лікарський препарат(и);
ЛФ	– лікарська форма;
МВ	– межа виявлення;
МКВ	– межа кількісного визначення;
МКЯ	– методи контролю якості;
НАМН	– Національна академія медичних наук
РП	– реєстраційне посвідчення;
СЗ	– стандартний зразок;

СФ	–	спектрофотометрія;
ТШХ	–	тонкошарова хроматографія;
УФ	–	ультрафіолетова(ий);
$A_i$	–	абсорбція для $i$ -того аналізованого розчину;
$A_{st}$	–	абсорбція для розчину порівняння;
АТС	–	Anatomical Therapeutic Chemical
$b$	–	кутовий коефіцієнт для розрахованої регресійної прямої;
$C_i$	–	концентрація аналіту в $i$ -ому аналізованому розчині;
$C_{st}$	–	концентрація аналіту в розчині порівняння;
DAD	–	діодноматричний детектор;
FDA	–	Food and Drug Administration;
$\Delta_{FAO}$	–	невизначеність кінцевої аналітичної операції;
ICH	–	Міжнародна конференція з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів для людини;
MS	–	мас-селективний;
max	–	максимальне;
min	–	мінімальне;
$n$	–	число паралельних хроматограм;
$ r $	–	коефіцієнт кореляції між введеним та знайденим значеннями для компоненту;
RS	–	розчин порівняння
RSD	–	відносне стандартне відхилення;
$RSD_{max}$	–	відносне стандартне відхилення (%), що описане у вимогах до придатності хроматографічної системи;
$s_a$	–	стандартне відхилення вільного члена лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої;
$s_b$	–	тангенс кута нахилу для розрахованої регресійної прямої;
$S_i$	–	площа визначуваного піка для $i$ -того аналізованого розчину
$\Delta_{SP}$	–	невизначеність пробопідготовки;
$S_{st}$	–	площа визначуваного піка для розчину порівняння;

- $s_0$  – залишкове стандартне відхилення;
- $t_{95\%,n-1}$  – односторонній коефіцієнт Стьюдента для імовірності 95 %;
- $X_i$  та  $Y_i$  – нормалізовані значення «знайдено/введено» ;
- $Z_i$  – відношення «знайдено/введено» аналіту, у %.

## ВСТУП

### **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 індустріального 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 противірусну 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 енісаміумом йодидом репозиціоновано як інгібітор вірусної РНК-полімерази штамів А і В, йому у 2019 році присвоєно відповідний код АТС/DDD ВООЗ J05AX17 (противірусні 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 високоефективну 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 кислота 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), 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) (дод. Е).

### **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 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 Science), 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.

## РОЗДІЛ 1

# ПРОТИВІРУСНІ ПРЕПАРАТИ, ЩО ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ ПРИ ГРИПІ. ПІДХОДИ ДО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ ТА ГОТОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

### 1.1 Огляд противірусних препаратів, що застосовуються при грипі

У зв'язку з тим, що вакцинопрофілактикою грипу у більшості країн світу охоплена менша частина населення, існує необхідність застосування хіміотерапевтичних ЛЗ. Хоча вакцинація є найкращим захистом від грипу [1-3], навіть вона не може гарантувати повний захист від інфекції через певні причини [4]. Захворювання на грип пов'язані головним чином із вірусами грипу типу А і В. Декотрі науковці виділяють вірус грипу С [5].

Небезпека вірусу грипу полягає в тому, що він може призвести до розвитку ускладнень, госпіталізації, летальності, епідемій та пандемій.

Інгібітори нейрамінідази та, у меншій мірі, інгібітори йонних  $M_2$  каналів є основними класами ЛЗ, що застосовують при грипі [6, 7].

Наявний новий клас, який наразі комерційно не доступний на фармацевтичному ринку України, – інгібітори РНК-полімерази (балоксавір та фавіпіравір) [8].

Варто зазначити, що ефективність будь-яких інших противірусних засобів, що застосовуються при грипі, не доведена.

На жаль, навіть до противірусних ЛЗ, що добре себе зарекомендували, періодично розвивається резистентність.

До інгібіторів  $M_2$  рецепторів належить римантадин, який по АТХ класифікації відноситься до циклічних амінів. Римантадину гідрохлорид є похідним амантадину, проявляє противірусну активність та ефективність по відношенню до різних вірусів грипу типу А. Для препарату притаманна антитоксична дія при грипі, що викликаний вірусом грипу типу В.

Завдяки ушкодженню римантадином вірусної оболонки, він інгібує реплікацію вірусів на ранніх стадіях. Як показали генетичні дослідження, противірусна дія римантадину пов'язана з тим, що він впливає саме на специфічний білок гену  $M_2$  віріона. *In vitro* дослідження римантадину показали пригнічення реплікації трьох антигенних підтипів вірусу грипу: H1N1, H2N2, H3N3. Препарати з римантадином, що наявні на ринку України, наведені в табл. 1.1.

Таблиця 1.1

**Перелік препаратів з римантадином,  
що наявні на фармацевтичному ринку України**

Назва/ЛФ	Виробник
РИМАНТАДИН-ДАРНИЦЯ, таблетки по 50 мг	ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна
РЕМАНТАДИН-КР, таблетки по 50 мг	ПАТ «Хімфармзавод «Червона зірка», Україна
РЕМАВІР, таблетки по 50 мг	АТ «Олайнфарм», Латвія
РЕМАВІР 20 мг, порошок дозований, 20 мг/дозу	АТ «Олайнфарм», Латвія
РЕМАВІР, капсули по 100 мг	АТ «Олайнфарм», Латвія

У зв'язку з резистентністю в більшості циркулюючих варіантів вірусу грипу, в тому числі А/Н3N2, застосування римантадину в клінічній практиці наразі обмежене, а в декотрих країнах, наприклад США, взагалі вилучено з клінічного застосування [9, 10].

До інгібіторів нейрамінідази належать озельтамівір, занамівір, перамівір та ланінамівір. Наразі на ринку України із доступних препаратів цієї групи є озельтамівір та занамівір.

Для лікування та профілактики грипу, в тому числі і грипу, що викликаний пандемічними штамами, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) рекомендує саме озельтамівір та занамівір [11].

Активним метаболітом озельтамівіру фосфату є його карбоксилатна форма, яка інгібує фермент нейрамінідазу, таким чином попереджуючи вивільнення нових вірусних частинок з інфікованих клітин. Внаслідок цього препарат запобігає проникненню вірусу у неінфіковані клітини, чим зупиняє поширення вірусу в організмі. Отже, *in vitro* дослідження з озельтамівіром карбоксилатом засвідчують інгібуючу дію на реплікацію вірусів типу А та В.

Крім того, експериментальні дослідження на здорових добровольцях підтвердили антивірусну активність по відношенню до вірусів грипу типів А та В [12].

Препарати з озельтамівіром, що наявні на ринку України, наведені в табл. 1.2 [12].

Таблиця 1.2

**Перелік препаратів з озельтамівіром,  
що наявні на фармацевтичному ринку України**

Назва/ЛФ	Виробник
РІНІВІР, капсули по 75 мг	ЗАТ Сантоніка, Литва
СЕЛЬТАВІР, капсули тверді по 75 мг	Маклеодс Фармасьютикалс Лімітед, Індія
СЕЛЬТАВІР, капсули тверді по 30 мг	Маклеодс Фармасьютикалс Лімітед, Індія
СЕЛЬТАВІР, капсули тверді по 45 мг	Маклеодс Фармасьютикалс Лімітед, Індія
ТАМІФЛЮ®, капсули по 75 мг	Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцарія
ТАМІФЛЮ®, порошок для оральної суспензії, 6 мг/мл	Роттендорф Фарма ГмбХ, Німеччина; Ф. Хоффманн-ЛяРош Лтд, Швейцарія
ФЛУКАП, капсули по 75 мг	Гетеро Лабз Лімітед, Індія
ФЛУКАП, капсули по 45 мг	Гетеро Лабз Лімітед, Індія
ФЛУКАП, капсули по 30 мг	Гетеро Лабз Лімітед, Індія

Щодо другого визнаного FDA препарату, що є в доступі в Україні, – занамівір – інгібітор нейрамінідази. Занамівір проявляє позаклітинну активність

та зменшує поширення грипу А та В через його пригнічення вивільнення віріонів з епітеліальних клітин дихального тракту. Саме при застосуванні цього препарату реплікація вірусу через поверхню дихального тракту обмежена. Місцеве призначення занамівіру, у вигляді інгаляцій, є ефективним способом лікування. Такий висновок підтверджено клінічними дослідженнями, де було показано зменшення вірусних титрів порівняно з групою плацебо. Клінічні дослідження не виявили зменшення чутливості вірусу до занамівіру [13, 14]. На ринку України є один препарат, що містить занамівір – Реленца, порошок для інгаляцій, дозований, по 5 мг, виробництва Глаксо Веллком Продакшн, Франція та ГлаксоСмітКляйн Австралія Пту Лтд, Австралія. Даний препарат можна застосовувати тільки за допомогою дискгалеру, який додається в упаковку з препаратом. Даний препарат не можна застосовувати через інгалятори чи небулайзери. 80 % дози препарату розподіляється у верхніх дихальних шляхах, а інша частина досягає бронхів та альвеол. Абсорбція препарату становить близько 10-20 % дози ЛЗ [15].

Також є інші препарати, які широко застосовуються при грипі, до таких відноситься інозину пранобекс.

Інозину пранобекс, окрім протівірусних властивостей, має імуномодулюючу дію. Даний препарат нормалізує клітинний імунітет через індукцію дозрівання і диференціювання Т-лімфоцитів і Т1-хелперів. Також інозину пранобекс збільшує кількість імуноглобулінів G та синтез інтерлейкіну-1 та інтерлейкіну-2, при цьому зменшує продукування інтерлейкіну-4. Пригнічення синтезу вірусів полягає у тому, що після інкорпорації інозин-оротової кислоти у полірибосоми ураженої вірусом клітини зменшується приєднання аденілової кислоти до вірусної інформаційної РНК [16].

В табл. 1.3 наведено ЛФ з інозином пранобексом, що зареєстровані в Україні.



**Перелік препаратів з інозином пранобексом, що наявні на  
фармацевтичному ринку України**

Назва/ЛФ	Виробник
ГРОПІВІРІН® сироп, 50 мг/мл	АТ «Фармак», Україна
НОВІРИН, таблетки по 500 мг	АТ «КИЇВСЬКИЙ ВІТАМІННИЙ ЗАВОД», Україна
ГРОПРИМ, таблетки по 500 мг	ТОВ «АСТРАФАРМ», Україна
ГРОПРИНОЗИН®-РІХТЕР, сироп, 250 мг/5 мл	ТОВ «Гедеон Ріхтер Польща»
ІЗОПРИНОЗИН, таблетки по 500 мг	Лізомедикамента Текнікал Фармацевтікал Сосьєдаде, С. А., Португалія; АТ Фармацевтичний завод ТЕВА, Угорщина
ІЗОПРИНОЗИН, таблетки по 500 мг	Лізомедикамента Текнікал Фармацевтікал Сосьєдаде, С. А., Португалія; АТ Фармацевтичний завод ТЕВА, Угорщина
ГРОПРИНОЗИН®, таблетки по 500 мг	ТОВ «Гедеон Ріхтер Польща», Польща
ГРОПІВІРІН, таблетки по 500 мг	ПАТ «Фармак», Україна
НЕОПРИНОЗИН, сироп, 250 мг/5 мл	ТОВ «ДКП «Фармацевтична фабрика»», Україна; ТОВ «Афлофарм Фармація Польська», Польща
НОВІРИН®, сироп по 50 мг/мл	АТ «КИЇВСЬКИЙ ВІТАМІННИЙ ЗАВОД», Україна; Ей.Бі.Сі. Фармасьютіці С.П.А., Італія

Енісаміум йодид, який був вперше синтезований ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», широко застосовується в Україні та деяких інших країнах. Противірусна ефективність енісаміуму йодиду доведена як *in vitro*, так і при клінічному застосуванні [17, 18–24].

Неклінічна програма, яка включала повний комплекс фармакологічних, фармакокінетичних і токсикологічних досліджень, виконана у відомих науково-дослідних інститутах та лабораторіях Німеччини, Великобританії, Чехії, Нідерландів, Швейцарії та США [17].

Нещодавно проведені дослідження в НДІ Іллінойського технологічного інституту (Чикаго, США) підтвердили зниження вірусних титрів в 1000 раз при інкубації інфікованих вірусом грипу бронхоепітеліальних клітин людини у дослідженні з енісаміумом йодидом. Крім того, виявлено, що енісаміум йодид пригнічує експресію М-гена вірусу грипу [17] (рис. 1.1).

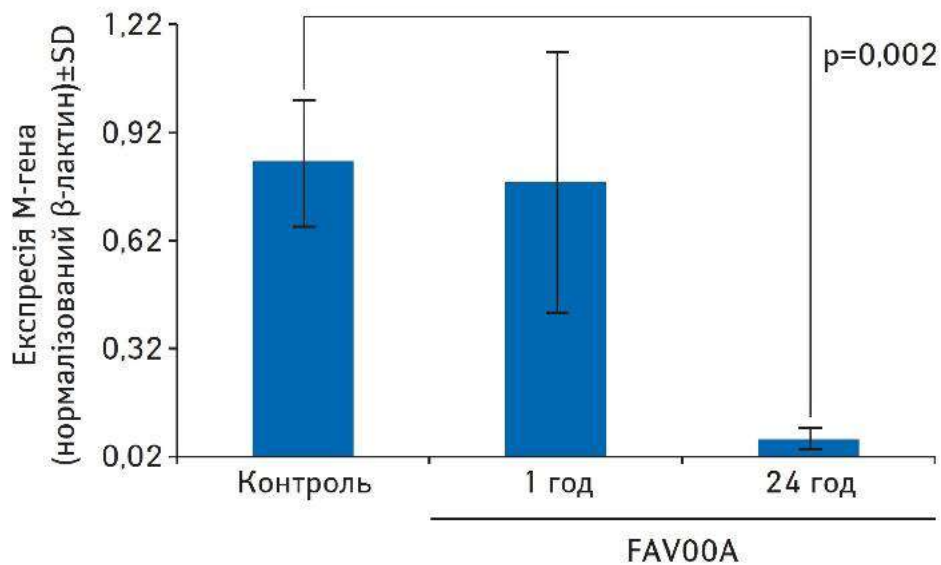


Рис. 1.1. Вплив енісаміуму йодиду (FAV00A) на експресію М-гена (інфікування вірусом грипу A/Brisbane/59/2007 (H1N1), MOI 0,01)

Проведені дослідження на тхорах в місті Лондон, Великобританія, де проводили інокулювання вірусу грипу через верхні дихальні шляхи, продемонстровано противірусний ефект енісаміуму йодиду [25–27].

Враховуючи те, що наразі до якості ЛЗ висуваються принципово нові вимоги та зважаючи на обмежений вибір доступних ефективних ЛЗ в Україні та у всьому світі, виникає необхідність у розробці ефективних противірусних засобів з доказовою ефективністю.

Дана робота присвячена розробці та валідації аналітичних методик для контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду – першого українського противірусного препарату прямої дії на вірусну РНК-полімеразу вірусу грипу типу А і В для можливості підготовки реєстраційних матеріалів міжнародного

рівня та виведення продуктів енісаміуму йодиду на добре регульовані ринки світу.

1.2 Методи контролю якості, які застосовуються при аналізі активних фармацевтичних інгредієнтів та готових лікарських форм у формі таблеток та капсул

У фармацевтичній практиці знайшли широке застосування такі методи контролю якості, як ТШХ, спектрофотометрія в УФ та ВИД областях, інфрачервона спектрофотометрія, газова хроматографія, рідинна хроматографія.

Вищезгадані методи найчастіше застосовуються для оцінки чистоти як АФІ, так і ГЛФ. Вибір методу при контролі АФІ та ГЛФ залежить від фізико-хімічних властивостей АФІ.

Перелік показників якості, які встановлюються до АФІ чи ГЛФ, залежить від його кінцевого застосування, а точніше від їх цільового профілю [28, 29]. Для оцінки кількісного вмісту основної речовини в АФІ часто застосовують титриметричний аналіз, в тому числі кислотно-основне титрування, окисно-відновне титрування, осаджувальне титрування та титрування методом комплексонометрія [30].

Метод титрування найчастіше застосовується для кількісного визначення АФІ. Для ГЛФ метод титрування теж може бути застосований, але при цьому має бути підтверджена специфічність методу, оскільки дуже часто ДР мають вплив на результат. До появи ВЕРХ для оцінки чистоти субстанції широкого застосування набув метод ТШХ, але з удосконаленням обернено-фазової хроматографії метод ТШХ має менше застосування, оскільки є методом напівкількісного визначення.

На сьогоднішній день знаходить широкого застосування метод високоефективної ТШХ, де завдяки додатковому обладнанню по оцінці площі

плям речовин можна говорити про кількісний вміст речовини, в тому числі супровідних домішок та основного компоненту [31–34].

У випадку, коли АФІ являє собою летку речовину, то для її контролю є можливість застосування газової хроматографії, яка застосовується як для кількісного визначення компонентів, так і для визначення супровідних домішок, в тому числі визначення залишкових кількостей органічних розчинників [35–38]. Із застосуванням газової хроматографії можна вирішувати питання контролю генотоксичних домішок, вміст яких контролюється набагато жорсткіше ніж вміст залишкових кількостей органічних розчинників [39–41]. Також при контролі генотоксичних домішок застосовують і рідинну хроматографію [42–54]. При розробці методики контролю супровідних домішок має бути підтверджена специфічність методики, в тому числі на основі стресових випробувань [55–63].

Поліморфізм АФІ значно впливає на його біологічну активність [64]. Хімічні сполуки мають різну структуру (координаційне число, мотив розташування катіонів, поворот деяких структурних груп в процесі поліморфного перетворення, розміри і форми граней), що характеризується в кожному конкретному випадку специфічною сукупністю властивостей. Усе це призводить до різниці зовнішньої форми кристалів. Як наслідок поліморфізм АФІ впливає на його вивільнення із твердих дозованих ЛФ, і виникає необхідність досліджень АФІ із застосуванням більш специфічних методів контролю якості [65–71].

Випробування «Розчинення» призначене для визначення кількості діючої речовини, яке за певний проміжок часу має вивільнитися в середовище розчинення з твердої дозованої ЛФ у зазначених умовах. Випробування «Розчинення» проводиться при контролі якості твердих дозованих ЛФ з метою підтвердження постійності їх властивостей і належних умов виробничого процесу. Для твердих ЛФ має бути підібраний відповідний метод розчинення, у зв'язку з чим має бути підтверджена дискримінаційність такої методики [72–82], тобто методика повинна реагувати на будь-які зміни у технології.

Елементні домішки в ЛП можуть з'являтися з кількох джерел: вони можуть бути залишками каталізаторів, навмисно доданими при синтезі, або бути домішками (наприклад, внаслідок взаємодії з обробним устаткуванням або системою контейнер/закупорювання, або бути присутнім в якості компонента ЛП) [83, 84]. Оскільки елементні домішки не несуть терапевтичну користь пацієнту, їх вміст в ЛП необхідно обмежити. У відповідності до вимог ICH Q3D має бути проведена оцінка вмісту елементних домішок, де за необхідності мають бути застосовані такі методи контролю як ICP MS, ICP OES та інші належні методи [85–102].

На етапі виробництва ГЛФ виникає необхідність запровадження такого методу контролю, як спектроскопії в ближній інфрачервоній області [103–112], де перевагою є поточний (online) контроль показників якості [113–120].

### 1.3 Огляд методик контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду

Енісаміум йодид не описаний в жодній фармакопеї світу, а у джерелах літератури описано невелику кількість методик його визначення.

Кушніруком В. М. із співавторами [121] розроблено методику кількісного визначення енісаміуму йодиду із застосуванням кислотно-основного титрування у неводному середовищі. Метод кислотно-основного титрування вибрано у зв'язку з тим, що у енісаміуму йодиду наявний третинний атом нітрогену. Проведено валідацію аналітичної методики, де було вивчено такі валідаційні характеристики: правильність, прецизійність, лінійність. При дослідженні лінійності було приготовано 9 модельних розчинів різних концентрацій в діапазоні  $\pm 20$  % від номінального 0,200 г. Підтверджено відповідність всіх валідаційних характеристик, в тому числі коефіцієнт кореляції ( $r$ ), який становив 0,99994. Вченими було підтверджено, що запропонована методика не має суттєвої систематичної похибки ( $\delta = 0,24$  %). Методика володіє достатньою збіжністю ( $\Delta z = 0,46$  %).

На підставі експериментальних даних, що наведено у джерелі [121] запропоновано наступну методику: 0,200 г АФІ розчиняють у суміші 20 мл ацетону та 5 мл розчину ртуті (II) ацетату, додають 1 мл розчину метилового оранжевого Р і титрують 0,1 М розчином кислоти хлорної до появи малинового забарвлення. Паралельно проводять контрольний дослід. Приготування розчину метилового оранжевого проводять наступним чином: 0,1 г метилового оранжевого розчиняють в ацетоні у мірній колбі на 100 мл, доводять тим же розчинником до позначки та перемішують.

Ацетон використаний як розчинник для підсилення основних властивостей енісаміуму йодиду. Ртуті (II) ацетат додавали з метою зв'язування йодидів. 0,1 М розчин кислоти хлорної використано як титрант. Метилловий оранжевий використаний як індикатор. Отримані результати авторами [121] дозволяють рекомендувати методику для аналізу АФІ за показником «Кількісне визначення» з допуском вмісту діючої речовини  $\pm 1$  %.

Бухтіаровою Т. А. та співавторами [122] запропоновано методику ТШХ, яка застосовується для оцінки чистоти амідів піридинкарбоксільних кислот, до яких і відноситься енісаміум йодид, де було застосовано хроматографічну пластинку «Silufol» виробництва «Kavalier», а в якості рухомої фази суміш n-бутанол – аміак (5 %) – оцтова кислота – вода у співвідношенні (6:1:1:2, об/об/об/об) та рухому фазу етанол – аміак (25 %) у співвідношенні (10:1 об/об). В цій же роботі [122] було вивчено ІЧ та УФ спектри. УФ спектри проявляють максимуми при 266–280 нм та 206–220 нм. ІЧ спектри, отриманого зразка із калієм бромідом (диск) проявляють наступні піки (см<sup>-1</sup>): 1705, 1670–1690, 1540–1550, 3400–3500.

Вченими Георгіянц В. А., Кушніруком В. М. та Гарною Н. В. [123] проведено валідацію методики визначення супровідних домішок в капсулах, що містять енісаміум йодид. В роботі наведено дані по валідації методики визначення супровідних домішок із застосуванням методу ТШХ. Вивчено такі валідаційні характеристики як специфічність, діапазон застосування, придатність хроматографічної системи, межа виявлення. В методиці

застосовано хроматографічну пластину Silica gel 60 фірми «Merck», а в якості рухомої фази використано суміш ацетон – метанол – вода, у співвідношенні (8:2:1 об/об/об), пари йоду використано для виявлення плям визначуваних речовин. Відповідно до описаної методики, МВ домішки становить 0,4 %.

Вінницькими вченими [124] розроблено методику кількісного визначення енісаміуму йодиду в плазмі крові із застосуванням методу ВЕРХ. В роботі [124] описано наступну методику: до 0,5 мл плазми крові додавали 1,5 мл ацетонітрилу. Суміш центрифугували, надосадову рідину зливали і додавали до неї 3,5 мл хлороформу. Суміш рідин струшували протягом 30 с, потім центрифугували. Верхній рідкий шар після фільтрування хроматографували на колонці Zorbax Eclipse XDB-C8 (150x2,1 мм, 5 мкм). Застосовано ізократичне елюювання. Склад мобільної фази (за об'ємом): 40 % метанол на 0,04 М фосфатному буфері (рН 3,0) з додаванням гептансульфонату натрію (0,1 мг/мл). Детектування проводили при довжині хвилі 268 нм. У діапазоні концентрацій енісаміуму йодиду від 0,1 до 50 мкг/мл зберігається пропорційна залежність між площею хроматографічного піка та кількістю препарату в пробі.

#### 1.4 Підходи до валідації аналітичних методик

У фармацевтичній галузі основним документом, який є основою для розробки настанов, в тому числі настанови з валідації аналітичних методик, є рекомендації ІСН Q2 [125]. Відповідно до рекомендацій ІСН валідація аналітичних методик стосується чотирьох основних аналітичних процедур: тесту ідентифікації, тесту кількісного визначення домішок, лімітуючого тесту визначення супровідних домішок та власне визначення основного компоненту в АФІ чи в ГЛФ.

Також виникає необхідність валідації і інших методик, таких як тест «Розчинення», методики визначення розміру часток АФІ та інших методик.

Короткий опис випробувань, які розглядаються в рекомендаціях ІСН Q2, описано нижче:

– тест ідентифікації призначений для того, щоб підтвердити відповідність речовини в зразку. Зазвичай, таке підтвердження досягається порівнянням даних випробувань зразка із стандартним зразком (наприклад, спектрами, хроматограмами, хімічною реакцією);

– тест визначення супровідних домішок може бути кількісним або лімітуючим. Обидва тести характеризують чистоту зразка. Однак, для кількісного тесту та лімітуючого валідаційні характеристики будуть різні;

– тест кількісного визначення призначений для визначення аналіту в аналізованому зразку. Валідаційні характеристики для кількісного визначення АФІ чи іншого компонента (наприклад, консерванту чи стабілізатора) в ГЛФ будуть однаковими. Такі ж характеристики можуть бути застосовані до подібних тестів, наприклад, для тесту «Розчинення».

У залежності від типу аналітична методика може бути валідована за такими валідаційними характеристиками як: прецизійність, правильність, повторювальність, внутрішньолабораторна точність, специфічність, ЛД, ЛКВ, діапазон лінійності [126–133].

*Прецизійність* аналітичної методики виражає ступінь розкиду результатів для вимірювань, що виконані за однією і тою ж методикою із застосуванням різних проб одного і того самого зразка. Прецизійність розглядається на трьох рівнях: збіжність, внутрішньолабораторна точність і відтворюваність.

Відтворюваність виражає точність між лабораторіями (спільні дослідження та, зазвичай, застосовується при стандартизації методології).

Прецизійність залежить від випадкових факторів і не має відношення до істинного значення вимірюваної величини. Прецизійність характеризують величиною стандартного відхилення та довірчим інтервалом, які розраховують за формулами:

$$\Delta_X = S_{C,r}(\%) \cdot t(\text{one} - \text{side}, 8) \leq \Delta_{As}, \quad (1.1)$$



$$S_{C,r}(\%) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=9} (X_i - \bar{X})^2}{8}}, \quad (1.2)$$

*Правильність* характеризує ступінь відповідності між відомим істинним значенням або довідковою величиною і значенням, одержаним за даною методикою. Показником правильності методу є значення систематичної похибки. Систематичну похибку виражають як різницю між математичним очікуваним результатом визначення та істинним значенням за формулою:

$$\delta, \% = |\bar{Z} - 100|, \quad (1.3)$$

*Повторюваність* виражає точність методики при її відтворенні в одних і тих самих умовах, при аналізі одного зразка, зокрема, одним і тим самим аналітиком або групою аналітиків протягом невеликого проміжку часу.

*Внутрішньолабораторна точність* виражає варіації в межах лабораторій: різні дні, різні аналітики, інше обладнання тощо.

*Специфічність* – здатність однозначно оцінювати аналізовану речовину в присутності інших компонентів, які можуть бути присутніми у зразку. Як правило, це можуть бути домішки, продукти деградації, ДР тощо. Для підтвердження специфічності СФ методик розраховують відносну систематичну похибку, яку вносить розчинник, тобто вклад плацебо [126, 127, 134, 135]. Для цього вимірюють оптичну густину ( $A_{blank}$ ) розчину плацебо та оптичну густину розчину порівняння ( $A_{st}$ ) та розраховують систематичну похибку, що вносить плацебо:

$$\delta_{exc} = \frac{A_{blank}}{A_{st}} \cdot 100\%, \quad (1.4)$$

Для підтвердження специфічності методом ВЕРХ необхідно підтвердити відсутність співпадіння часів утримування піків визначуваних компонентів із іншими піками (піками плацебо, домішок, консервантів, тощо).

*ЛД* виражає найменшу кількість аналізованої речовини в зразку, котра може бути детектована, але не обов'язково кількісно визначена.

*ЛКВ* виражає найменшу кількість аналіту в зразку, яку кількісно можна визначити з відповідною точністю. Зазвичай ЛКВ застосовується для оцінки супровідних домішок чи продуктів деградації.

*Лінійність* – це здатність методики (в межах заданого діапазону) одержувати результати випробування, які прямо пропорційні концентрації (кількості) аналіту в зразку.

Такий валідаційний параметр як робасність має бути виконаний на певному етапі розробки аналітичної методики.

*Робасність* – це здатність аналітичної методики не зазнавати значного впливу під контрольованими аналітиком змінами в умовах аналізу зразка за аналітичною методикою. Робасність характеризує надійність аналітичної методики.

У табл. 1.4 наведено перелік необхідних валідаційних параметрів для конкретного випробування.

Таблиця 1.4

### Необхідні валідаційні параметри для конкретного випробування

Тип аналітичного випробування та характеристика	Ідентифікація	Випробування на домішки		Кількісне визначення: розчинення
		кількісне	лімітуюче	
1	2	3	4	5
Правильність	–	+	–	+
Прецизійність				
– збіжність	–	+	–	+
– внутрішньолабораторна точність	–	+ *	–	+ *

1	2	3	4	5
Специфічність **	+	+	+	+
МВ	–	– ***	+	–
Межа кількісного визначення	–	+	–	–
Лінійність	–	+	–	+
Діапазон застосування	–	+	–	+

Примітка. «–» характеристика не досліджується, «+» – досліджується; \* – у випадку, коли проводиться вивчення відтворюваності, дослідження внутрішньолабораторної точності не вимагається; \*\* – недолік специфічності можна замінити іншими дослідженнями; \*\*\* – коли МВ і межа нормування близькі, то може виникнути необхідність вивчення

Таким чином, проаналізовано та систематизовано дані літературних джерел щодо противірусних препаратів, що застосовуються при грипі. Оцінено методи контролю АФІ, таблеток та капсул. Опрацьовано та узагальнено підходи до валідації аналітичних методик.

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, де ліміт виявлення домішки становить 0,4 %. 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.

За матеріалами розділу опубліковано роботи [143, 148].

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Алгоритм проведення експериментальних досліджень

На рис. 2.1 наведено алгоритм проведених експериментальних досліджень з розробки аналітичних методик контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду.

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.

На основі методики визначення супровідних домішок було розроблено методику кількісного визначення АФІ, де було змінено довжину хвилі детектування, об'єм інжекції та вимоги до придатності хроматографічної системи. Розроблену методику кількісного визначення енісаміуму йодиду в АФІ було використано при вивченні розчинності енісаміуму йодиду у відповідності до БСК системи. Також ВЕРХ-методика була взята за основу при розробці методики вивчення профілів розчинення твердих ЛФ (таблеток та капсул) енісаміуму йодиду. При адаптації методики було скориговано робочу концентрацію та склад рухомої фази (для прискорення елюювання піка енісаміуму). Для пришвидшення контролю таблеток та капсул енісаміуму йодиду, була розроблена СФ-методика для контролю показників «Кількісне визначення» та «Розчинення».

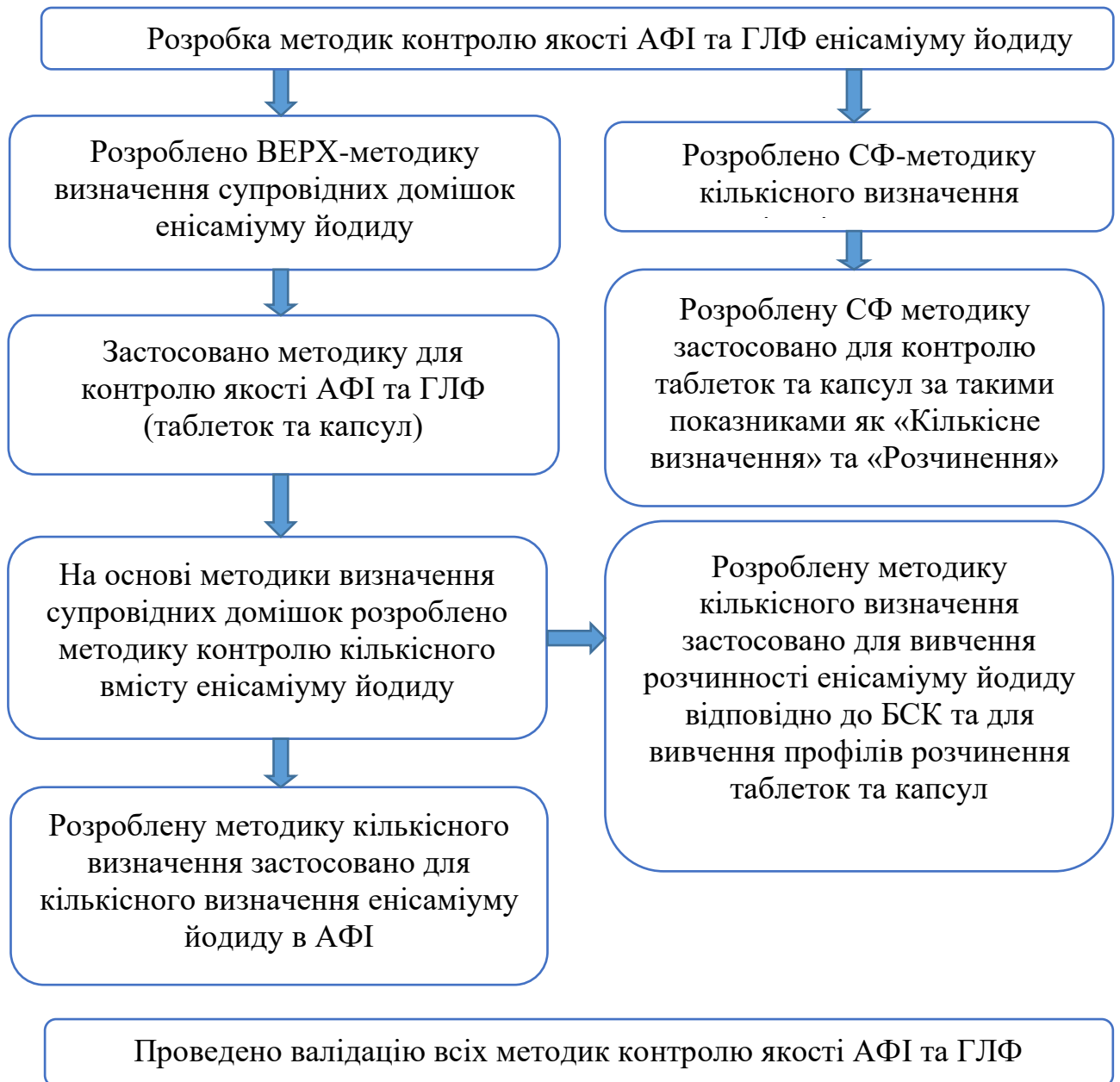


Рис. 2.1. Алгоритм експериментальних досліджень з розробки аналітичних методик контролю якості АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду

Таким чином, двома основними методами були ВЕРХ та СФ. Після завершення розробки кожної методики було проведено її валідацію. Підтверджено придатність всіх розроблених аналітичних методик для їх застосування при контролі АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду.

## 2.2 Фізико-хімічні властивості енісаміуму йодиду

На рис. 2.2 представлена структурна формула енісаміуму йодиду (N-метил-4-бензилкарбамідопіридинію йодид).

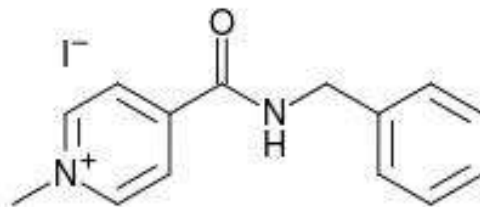


Рис. 2.2 Структурна формула енісаміуму йодиду [138]

Відповідно до даних [138–140], енісаміум йодид отримують у результаті реакції ізонікотинової кислоти (ІНК) з бензиламіном, у результаті чого утворюється бензиламід ізонікотинової кислоти, а в подальшому БАІНК піддають метилюванню із застосуванням метилу йодистого.

Схему синтезу енісаміуму йодиду наведено на рис. 2.3.

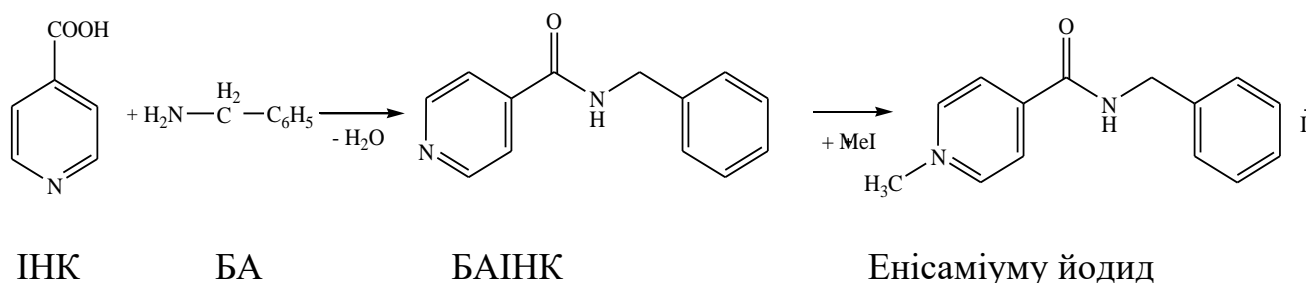


Рис. 2.3. Схema синтезу енісаміуму йодиду [138]

У джерелі [139] є інформація про розчинність енісаміуму йодиду у воді, етанолі, 2-пропанолі та ацетоні, а також в їх водних 30 %, 50 % та 70 % розчинах. Показано, що розчинність енісаміуму йодиду у воді вища, ніж в органічних розчинниках. Так, наприклад, 1 г енісаміуму йодиду розчиняється в 22 мл води, а у випадку розчинення в етанолі, необхідно близько 1300 мл розчинника, а у випадку 2-пропанолу – близько 1400 мл розчинника. Відповідно до джерела [141] енісаміум йодид є яскраво-жовтий з рожевим

відтінком кристалічний порошок зі слабким специфічним запахом. Молекулярна маса енісаміуму йодиду становить 354,19, плавиться при температурі 185–189 °С з розкладанням, розчинний у воді, мало розчинний в 95 % спирті етиловому, практично не розчинний в хлороформі та ефірі. Відповідно до цього ж джерела [141], УФ спектр спиртового розчину енісаміуму йодиду має максимум поглинання за довжини хвилі 267 нм ± 2 нм. Також описано характерні відгуки інфрачервоної спектроскопії, де відгук при 1670 см<sup>-1</sup> зазначено як зв'язок – ОО, 1540 см<sup>-1</sup> – зв'язок NH, 855 см<sup>-1</sup> – зв'язок монозаміщеного бензолу.

### 2.3 Об'єкти дослідження, реактиви, прилади

На українському ринку енісаміум йодид представлений у вигляді капсул та таблеток. Також наявна ЛФ у вигляді сиропу. Єдиним виробником ГЛФ енісаміуму йодиду в Україні є АТ «Фармак».

Якісний склад ГЛФ у вигляді капсул та таблеток наведено в табл. 2.1 [136].

Таблиця 2.1

#### Склад капсул та таблеток енісаміуму йодиду

Назва ГЛФ, виробник	Склад ГЛФ
Амізон Макс, капсули 500 мг, АТ «Фармак», Україна	енісаміуму йодид, магнію стеарат, желатинова капсула що містить желатин, титану діоксид (E171), барвник «сонячний захід» FCF (E110)
Амізон, таблетки 125 та 250 мг, АТ «Фармак», Україна	енісаміуму йодид, лактози моногідрат, целюлоза мікрокристалічна, повідон, натрію кроскармелоза, кальцію стеарат, оболонка: OPADRY II Clear 85F19250 (поліетиленгліколь, полісорбат 80, спирт полівініловий, тальк)

У патенті [137] наведено дані щодо фармацевтичної композиції таблеток, яка забезпечує їх міцність. Склад таких таблеток представлено в табл. 2.2 [137],

де технічним результатом винаходу вважається підвищена твердість таблеток енісаміуму йодиду. До того ж, така композиція запобігає отриманню таблеток зі сколами.

Таблиця 2.2

### Склад таблеток енісаміуму йодиду

Компонент ГЛФ	Масова частка, %
Енісаміуму йодид	50–80
Лактоза, або магнію карбонат основний або кальцію фосфат двозаміщений, або крохмаль прежелатинізований	15–29
Целюлоза мікрокристалічна	1–15
Сахароза	1–12
Повідон	0,5–3
Коповідон	0,5–3
Кросповідон або кроскармелоза натрію	1–5
Стеаринова кислота або стеарат кальцію, або стеарат магнію	0,5–1,8
Тальк (можливий вміст)	0,5–3
Плівкова оболонка (можлива в складі)	близько 3

Виходячи із вищенаведеної інформації, можна зробити висновок, що перелік препаратів, що містять енісаміум йодид невеликий, всі препарати представлені у формі для перорального застосування, та, окрім АФІ, містять ДР. У зв'язку з чим є необхідність враховувати вплив цих речовин у процесі розробки методик контролю якості ГЛФ, зокрема при вивченні специфічності аналітичних методик.

При розробці методики визначення супровідних домішок використано АФІ енісаміуму йодид виробництва АТ «Фармак», серії 10415.

При валідації методики визначення супровідних домішок було використано АФІ енісаміуму йодид виробництва АТ «Фармак», серії 10416.

Для вивчення валідаційних характеристик застосовано СЗ енісаміуму йодиду с. 07-16, СЗ бензиламиду ізонікотинової кислоти виробництва с. 10413.



Використано бензиламін фірми Sigma-Aldrich (кат. № 185701) та ізонікотинову кислоту фірми Sigma-Aldrich, (кат. № I17508).

При приготуванні рухомої фази було використано воду очищену (отриману на АТ «Фармак»), динатрію гідрогенфосфат безводний, натрій октан-1-сульфонат моногідрат, фосфорну кислоту 85 %, ацетонітрил (реактиви виробництва Sigma-Aldrich).

Для приготування 0,1 М розчину натрію гідроксиду застосовано натрію гідроксид виробництва Sigma-Aldrich, кат. № 06203.

Для проведення стресових випробувань використовували перекис водню Sigma-Aldrich, кат. № 216763, хлористоводневу кислоту Merck, кат. № 1.00317, натрію гідроксид Sigma-Aldrich, кат. № 06203.

При розробці методики кількісного визначення АФІ було використано енісаміуму йодид виробництва АТ «Фармак» с. 10416.

При вивченні розчинення АФІ енісаміуму йодиду в стандартних буферних розчинах, було використано енісаміуму йодид виробництва АТ «Фармак» с. 170215, 180215, 190315.

Для приготування буферних розчинів рН 1,2, рН 4,5, рН 6,8 та рН 7,5 було використано наступні реактиви:

– хлористоводнева кислота концентрована (чистота 37,0–38,0 %, Merck, Німеччина),

– оцтова кислота (чистота 99,8–100,5 %, Sigma-Aldrich),

– натрію хлорид (чистота  $\geq 99,8$  %, Sigma-Aldrich),

– натрію гідроксид (чистота 99,0–100,5 %, Sigma-Aldrich),

– натрію ацетат (чистота  $\geq 99,0$  %, Sigma-Aldrich),

– та калію фосфат одноосновний (чистота 98,0–100,5 %, Sigma-Aldrich).

При розробці та валідації методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках було використано таблетки 0,25 г виробництва АТ «Фармак», с. 11016.

При розробці та валідації методик «Супровідні домішки», «Розчинення» та «Профілі розчинення» використано таблетки енісаміуму йодиду 0,25 г виробництва АТ «Фармак», с. 10118.

При розробці та валідації методики кількісного визначення енісаміуму йодиду у капсулах енісаміуму йодиду було використано капсули 500 мг виробництва АТ «Фармак», с. 10916, в рамках методики супровідних домішок використано капсули, с. 41217, при розробці та валідації методик «Розчинення» та «Профілі розчинення» використано капсули с. 10218.

При розробці та валідації методики визначення супровідних домішок було використано наступне обладнання:

- рН-метр Seven Compact «Mettler Toledo», Швейцарія;
- Ваги електронні MSA1202S-000-D0 «Sartorius AG», Німеччина;
- Ваги аналітичні AB54-S «Mettler Toledo», Швейцарія;
- Рідинний хроматограф Agilent 1200 «Agilent Technologies», США;
- Рідинний хроматограф Agilent 1260 «Agilent Technologies», США;
- Спектрофотометр Specord 250 Plus «Analytic Jena AG», Німеччина;
- Тестер вивчення розчинності пігулок ERWEKA DT 820, Німеччина.

При вивченні впливу світла на АФІ, використано камеру вивчення фотостабільності Binder, Німеччина.

При вивченні розчинності АФІ використано інкубаційний перемішувач GFL, модель 3031.

При валідації аналітичних методик використано хроматографічну колонку Zorbax Eclipse XDB – C18 розміром 150 × 4,6 мм, заповнену сорбентом з розміром часток 5 мкм (P.N. 7995118-595, S.N 511041, L.N B16099), виробництва Agilent Technologies, США.

При розробці методики визначення супровідних домішок застосовували такі хроматографічні колонки як: Discovery Cyano 4,6 x 150 з розміром часток 5 мкм, виробництва Discovery, США, Luna NH<sub>2</sub> 4,6 x 150 з розміром часток 5 мкм, виробництва Phenomenex, США, Nova-Pack Phenyl 3,9 x 150 з розміром часток 4 мкм, виробництва Waters, США, та ін.

## 2.4 Характеристика методик дослідження

Застосовано УФ спектрофотометрію в УФ та ВИД областях (ДФУ 2.2.25) та ВЕРХ (ДФУ 2.2.29).

2.4.1 ВЕРХ-методика визначення супровідних домішок в АФІ енісаміуму йодиду

Приготування рухомої фази.

*Буферний розчин рН 2,5:* 1,085 г натрію октан-1-сульфонату моногідрату та 1,000 г динатрію гідрофосфату безводного розчиняють в 900 мл води очищеної, доводять рН розчину фосфорною кислотою до  $(2,5 \pm 0,05)$  та доводять об'єм розчину водою очищеною до 1000,0 мл.

Кінцевий склад рухомої фази: буферний розчин рН 2,5:вода очищена:ацетонітрил (30:44:26, об/об/об). Рухому фазу фільтрують крізь фільтр з розміром пор 0,45 мкм.

Приготування випробовуваного розчину. До 0,4000 г АФІ додають 80 мл рухомої фази, розчиняють, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл. 10,0 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100,0 мл.

Приготування розчину порівняння. *Проміжний розчин бензиламіну:* 0,100 г бензиламіну розчиняють в 10 мл ацетонітрилу та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100,0 мл. 10,0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100,0 мл.

*Проміжний розчин бензиламідю ізонікотинової кислоти:* 0,010 г бензиламідю ізонікотинової кислоти розчиняють в 10 мл ацетонітрилу та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100,0 мл.

*Проміжний розчин ізонікотинової кислоти:* 0,100 г ізонікотинової кислоти розчиняють в 10 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду та доводять рухомою фазою до 100,0 мл. 10,0 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100,0 мл.

*Проміжний розчин енісаміуму йодиду:* 0,400 г СЗ енісаміуму йодиду розчиняють у 80 мл рухомої фази та доводять об'єм розчину до 100,0 мл тим же розчинником.

*Кінцевий розчин порівняння:* до 10,0 мл проміжного розчину енісаміуму йодиду додають по 0,2 мл проміжних розчинів бензиламіну, бензиламідую ізонікотинової кислоти та ізонікотинової кислоти, доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100,0 мл.

*Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи:* до 10,0 мл розчину енісаміуму йодиду (проміжного) додають по 0,12 мл розчинів бензиламіну, бензиламідую ізонікотинової кислоти та ізонікотинової кислоти (проміжних), доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100,0 мл.

*Хроматографічна колонка:* октадецилсилільна розміром 150 x 4,6 мм з розміром часток 5 мкм (Zorbax Eclipse XDB – C18), виробництва Agilent Technologies, США;

*Ізократичний режим елюювання з потоком рухомої фази:* 0,5 мл/хв;

*Детектування:* за довжин хвиль 205 нм та 265 нм;

*Термостат колонки:* 30 °С;

*Об'єм інжекції:* 20 мкл.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо на хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи витримуються наступні умови:

- число теоретичних тарілок, розраховане за піком бензиламіну – не менше 2500 (за довжини хвилі 205 нм);
- симетрія піка бензиламіну – від 0,8 до 1,5 (за довжини хвилі 205 нм);
- співвідношення пік/западина для піка йодид-йону та піка ізонікотинової кислоти – не менше 1,1 (за довжини хвилі 265 нм);
- співвідношення пік/западина для піка енісаміуму та піка бензиламідую ізонікотинової кислоти – не менше 1,1 (за довжини хвилі 205 нм).

Для оцінки вмісту домішок площі піків, одержаних на хроматограмі випробовуваного розчину, порівнюють з площами піків, що одержані на

хроматограмі розчину порівняння. Вміст бензиламіну, бензиламід у ізонікотинової кислоти та неідентифікованих домішок оцінюють за довжини хвилі 205 нм, а ізонікотинової кислоти – 265 нм.

2.4.2 ВЕРХ-методика кількісного визначення в АФІ енісаміуму йодиду

*Методика.*

Для кількісного визначення енісаміуму йодиду застосовують методику, що розроблена для контролю супровідних домішок АФІ енісаміуму йодиду з наступними корективами:

*Довжина хвилі детектування:* 225 нм;

*Об'єм інжекції:* 10 мкл.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо на хроматограмі розчину порівняння витримуються наступні умови:

- відносне стандартне відхилення, розраховане для другого основного піка з хроматограм розчину порівняння, має бути не більше 0,35 %;
- симетрія другого піка енісаміуму йодиду – від 0,8 до 1,5;
- число теоретичних тарілок для другого піка енісаміуму йодиду становить не менше 3000.

Вміст енісаміуму йодиду ( $X$ ) в субстанції ( $y$  %) в перерахунку на суху речовину розраховують за формулою (2.1):

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 100 \cdot (100 - W_0) \cdot P_0}{S_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot m_1 \cdot 10 \cdot (100 - W_1) \cdot 100} \cdot 100 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot (100 - W_0) \cdot P_0}{S_0 \cdot m_1 \cdot (100 - W_1)}, \quad (2.1)$$

де  $S_1$  – середнє значення площ піків енісаміуму, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

$S_0$  – середнє значення площ піків енісаміуму, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

$m_1$  – маса наважки АФІ, взята для приготування випробовуваного розчину, в г;

$m_0$  – маса наважки СЗ енісаміуму йодиду, взята для приготування розчину порівняння, в г;

$W_0$  – втрата в масі при висушуванні СЗ енісаміуму йодиду, у %;

$W_1$  – втрата в масі при висушуванні зразка випробовуваної субстанції, взятої для приготування випробовуваного розчину, у %;

$P_0$  – вміст основної речовини в енісаміумі йодиді в перерахуванні на суху речовину, взятого для приготування розчину порівняння, у %.

#### 2.4.3 ВЕРХ-методика вивчення розчинності АФІ енісаміуму йодиду

Хроматографування проводили із застосуванням рідинного хроматографа за наступних умов:

– хроматографічна колонка Zorbax Eclipse XDB – C18 розміром  $150 \times 4,6$  мм, заповнена сорбентом з розміром часток 5 мкм (P.N 7995118-595, S.N 511041, L.N B16099), виробництва Agilent Technologies, США;

– рухома фаза: суміш фосфатного буферного розчину з натрію октансульфонату, рН якого доведено до 2,5; ацетонітрил: вода очищена (26:30:44 об/об/об).

Приготування фосфатного буферного розчину з натрію октансульфонату: суміш 1,085 г (1,000 г в перерахуванні на безводну речовину) натрію октан-1-сульфонату моногідрату і 1,000 г динатрію гідрофосфату безводного розчиняють в 900 мл води, доводять рН розчину фосфорною кислотою 85 % до  $2,5 \pm 0,05$  і доводять об'єм розчину водою Р до 1000 мл).

– Швидкість рухомої фази 0,5 мл/хв;

– детектування за довжини хвилі 225 нм;

– температура термостату колонки 30 °С;

– об'єм ін'єкції 10 мкл;

– час хроматографування 10 хв.

Хроматографічна система вважалася придатною, якщо виконувалися наступні вимоги до піка енісаміуму йодиду (другого піка, органічної частини):

- симетрія від 0,8 до 1,5;
- число теоретичних тарілок не менше 3000;
- RSD для трьох паралельних інжекцій не перевищувало 0,67 %.

*Підготовка вихідних випробовуваних розчинів.* У конічну колбу на 100 мл поміщали 40 мл буферного розчину, додавали надлишкову кількість субстанції, колбу герметично укупували, та проводили перемішування в інкубаторі-перемішувачі GFL, модель 3031 зі швидкістю 140 об/хв. Розчинність субстанції в наведених буферних розчинах проводили за температури 25 °С та 37 °С.

Надлишкова кількість субстанції була встановлена заздалегідь і становила 2,9 г при вивченні розчинності за температури 25 °С та 6,9 г при вивченні розчинності за температури 37 °С.

Для досягнення рівноважної концентрації перемішування проводили протягом 96 год, за виключенням вивчення розчинності в рН 1,2 при 37 °С, де перемішування проводили протягом 48 год.

*Приготування кінцевого випробовуваного розчину при вивченні розчинності АФІ за температури 25 °С.* Зупиняють перемішування, не вимикаючи підтримання температури, залишають колбу на 5 хв для можливості осадження надлишку субстанції, відбирають 1,0 мл надосадової рідини в мірну колбу на 50,00 мл, розбавляють рухомою фазою, та доводять до 50,00 мл тим самим розчинником, 5,00 мл одержаного розчину розбавляють до 20,00 мл рухомою фазою.

*Приготування кінцевого випробовуваного розчину при вивченні розчинності АФІ за температури 37 °С.* Зупиняють перемішування, не вимикаючи підтримання температури, залишають колбу на 5 хв для можливості осадження надлишку субстанції, відбирають 1,00 мл надосадової рідини в мірну колбу на 50,00 мл, розбавляють рухомою фазою, та доводять до 50,00 мл тим самим розчинником, 5,00 мл одержаного розчину розбавляють до 50,00 мл рухомою фазою.

Приготування розчину порівняння. 400,0 мг СЗ енісаміуму йодиду розчиняють в рухомій фазі і доводять об'єм розчину тим самим розчинником

до 100,0 мл. 10,00 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100,0 мл.

Приклад хроматограми випробовуваного розчину наведено на рис. 2.4.

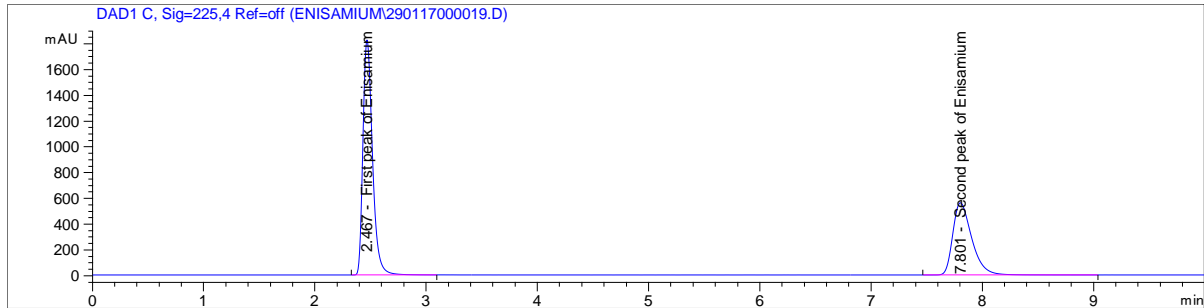


Рис. 2.4. Приклад хроматограми випробовуваного розчину, отриманої при вивченні розчинності субстанції енісаміуму йодиду

Розрахунок розчиненої кількості енісаміуму йодиду проводили за формулами  $X_1$  (2.2) та  $X_2$  (2.3):

при вивченні розчинності за температури 25 °С:

$$X_1 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 50 \cdot 20 \cdot (100 - W_0) \cdot P_0}{S_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100}, \quad (2.2)$$

при вивченні розчинності за температури 37 °С:

$$X_2 = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 10 \cdot 50 \cdot 50 \cdot (100 - W_0) \cdot P_0}{S_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100}, \quad (2.3)$$

де  $S_1$  – середнє значення площ піків другого піка енісаміуму, розраховане з хроматограм кінцевого випробовуваного розчину;

$S_0$  – середнє значення площ піків другого піка енісаміуму, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

$m_0$  – маса наважки СЗ енісаміуму йодиду, взята для приготування розчину порівняння, в мг;

$W_0$  – втрата в масі при висушуванні СЗ, у %;



$P_0$  – вміст основної речовини в СЗ енісаміуму йодиду (в перерахуванні на суху речовину), взятому для приготування розчину порівняння.

Для приготування буферних розчинів рН 1,2; 4,5; 6,8 та 7,5 було використано наступні реактиви: хлористоводнева кислота концентрована (чистота 37,0–38,0 %, Merck, Німеччина), оцтова кислота (чистота 99,8–100,5 %, Sigma-Aldrich), натрію хлорид (чистота  $\geq 99,8$  %, Sigma-Aldrich), натрію гідроксид (чистота 99,0–100,5 %, Sigma-Aldrich), натрію ацетат (чистота  $\geq 99,0$  %, Sigma-Aldrich), та калію фосфат одноосновний (чистота 98,0–100,5 %, Sigma-Aldrich).

Додатково проводилося вивчення розчинності за температури 25 °С.

Буферний розчин рН 7,5 був вибраний як додатковий, з урахуванням інформації наведеної в регулюючому документі Food and Drug Administration (FDA) Guidance for Industry [142].

Приготування буферних розчинів:

рН 1,2: 425,0 мл 0,2 М розчину хлористоводневої кислоти та 250,0 мл 0,2 М розчину натрію хлориду розбавляли водою очищеною до 1000 мл;

рН 4,5: 2,99 г натрію ацетату та 14 мл 2 М оцтової кислоти розбавляли водою очищеною до 1000 мл;

рН 6,8: 250,0 мл 0,2 М розчину калію фосфату одноосновного та 112,0 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду розбавляли водою очищеною до 1000 мл;

рН 7,5: 250,0 мл 0,2 М розчину калію фосфату одноосновного та 112,0 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду розбавляли водою очищеною до 1000 мл та доводили рН до 7,5 за допомогою 0,1 М розчину натрію гідроксиду.

2.4.4 ВЕРХ-методика визначення супровідних домішок в таблетках та капсулах енісаміуму йодиду

*Методика для таблеток.*

Для визначення супровідних домішок в таблетках та капсулах енісаміуму йодиду застосовують методику, що розроблена для контролю супровідних домішок АФІ енісаміуму йодиду з наступними корективами:

Випробовуваний розчин (для таблеток). До 0,4960 г порошку розтертих таблеток додають 80 мл рухомої фази, перемішують протягом 5 хв та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл (4 мг/мл), розчин фільтрують крізь фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 5 мл фільтрату. 10,00 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100,0 мл.

Випробовуваний розчин (для капсул). 0,4010 г вмісту капсул розчиняють в рухомій фазі і доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100,0 мл (4 мг/мл). 10,00 мл випробовуваного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100,0 мл та фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка».

2.4.5 Спектрофотометрична методика кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках та капсулах

*Методика для таблеток.*

Визначення проводять методом абсорбційної спектрофотометрії (ЄФ, 2.2.25).

Випробовуваний розчин. 5 таблеток поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти та витримують на ультразвуковій бані до повного розпадання таблеток, доводять об'єм до 100,0 мл тим самим розчинником, перемішують і фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

1,00 мл одержаного фільтрату доводять 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти до об'єму 50,00 мл і перемішують.

5,00 мл одержаного розчину доводять 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти до об'єму 50,00 мл і перемішують.

Розчин порівняння. 0,2500 г СЗ енісаміуму йодиду розчиняють у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти, доводять тим самим розчинником до об'єму 100,0 мл і перемішують.

1,00 мл одержаного розчину доводять 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти до об'єму 100,0 мл і перемішують.

Розчин використовують свіжоприготовленим.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння на спектрофотометрі за довжини хвилі 267 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти як компенсаційний розчин.

Вміст енісаміуму йодиду ( $X$ ) в одній таблетці, в грамах, розраховують за формулою (2.4):

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 50 \cdot 10 \cdot P \cdot (100 - W_0)}{A_0 \cdot n \cdot 100 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot P \cdot (100 - W_0)}{A_0 \cdot n \cdot 2000}, \quad (2.4)$$

де  $A_1$  – оптична густина випробовуваного розчину;

$A_0$  – оптична густина розчину порівняння;

$n$  – кількість таблеток, взятих для випробування;

$m_0$  – маса наважки СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, в г;

$P$  – вміст основної речовини в енісаміуму йодиді в перерахуванні на суху речовину, взятого для приготування розчину порівняння, у %;

$W_0$  – втрата в масі при висушуванні СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, у %.

#### *Методика для капсул.*

Визначення проводять методом абсорбційної спектрофотометрії (ЄФ, 2.2.25).

Випробовуваний розчин. 201,0 мг вмісту капсул поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти  $P$  та струшують протягом 10 хв, доводять об'єм до 100,0 мл тим самим розчинником, перемішують і фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка» або мембранний фільтр з діаметром пор не більше 0,45 мкм, відкидаючи перші порції фільтрату.

1,00 мл одержаного фільтрату доводять 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти  $P$  до об'єму 100,0 мл і перемішують.

Розчин порівняння. 200,0 мг СЗ енісаміуму йодиду розчиняють у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти, доводять тим самим розчинником до об'єму 100,0 мл і перемішують. 1,00 мл одержаного розчину доводять 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти до об'єму 100,0 мл і перемішують.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння на спектрофотометрі за довжини хвилі 267 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти як компенсаційний розчин.

Вміст енісаміуму йодиду ( $X$ ) в одній капсулі, в міліграмах, розраховують за формулою (2.5):

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot b \cdot P \cdot (100 - W_0)}{A_0 \cdot m_1 \cdot 1000}, \quad (2.5)$$

де  $A_1$  – оптична густина випробовуваного розчину;

$A_0$  – оптична густина розчину порівняння;

$m_0$  – маса наважки СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, в мг;

$m_1$  – маса наважки вмісту капсул, взята для приготування випробовуваного розчину, в мг;

$P$  – вміст основної речовини в енісаміуму йодиді в перерахуванні на суху речовину, взятого для приготування розчину порівняння, у %;

$W_0$  – втрата в масі при висушуванні СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, у %;

$b$  – середня маса вмісту капсули, в мг.

2.4.6 Спектрофотометрична методика вивчення «Розчинення» енісаміуму йодиду в таблетках та капсулах

*Методика для таблеток.*

Визначення проводять відповідно до вимог ЄФ, 2.9.3, використовуючи прилад з лопаттю.

Середовище розчинення – вода, об'єм середовища розчинення – 500 мл, швидкість обертання лопаті – 75 об/хв, час розчинення – 30 хв.

Випробовуваний розчин. Для випробування використовують одну таблетку (0,25 г).

Через 30 хв відбирають 25 мл із центру посудини для розчинення, фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату.

2,00 мл одержаного фільтрату доводять водою до об'єму 50,0 мл і перемішують.

Розчин порівняння. 0,100 г СЗ енісаміуму йодиду розчиняють у 30 мл води, доводять тим самим розчинником до об'єму 100,0 мл і перемішують.

2,00 мл одержаного розчину доводять водою до об'єму 100,0 мл і перемішують.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння на спектрофотометрі за довжини хвилі 267 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи воду в якості компенсаційного розчину.

Кількість енісаміуму йодиду ( $X$ ), що перейшов у розчин із таблетки, у відсотках, обчислюють за формулою (2.6):

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 500 \cdot 50 \cdot P \cdot (100 - W_0) \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 50 \cdot a \cdot n \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{A_1 \cdot m \cdot P \cdot (100 - W_0)}{A_0 \cdot n \cdot a \cdot 20}, \quad (2.6)$$

де  $A_1$  – оптична густина випробовуваного розчину;

$A_0$  – оптична густина розчину порівняння;

$m_0$  – маса наважки СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, в г;

$a$  – заявлений вміст енісаміуму йодиду в таблетці, в г (0,25 г);

$n$  – кількість таблеток, взятих для випробування;

$P$  – вміст основної речовини у СЗ енісаміуму йодиду в перерахуванні на суху речовину, взятого для приготування розчину порівняння, у %;

$W_0$  – втрата в масі при висушуванні СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, у %.

*Методика для капсул.*

Визначення проводять відповідно до вимог ЄФ, 2.9.3, використовуючи прилад з кошиком. Середовище розчинення – 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої, об'єм середовища розчинення – 1000 мл, швидкість обертання кошика – 100 об/хв, час розчинення – 30 хв.

Випробовуваний розчин. Для випробування в кошик поміщають 1 капсулу.

Через 30 хв відбирають 25 мл із центру посудини для розчинення, фільтрують крізь паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші порції фільтрату.

2,00 мл одержаного фільтрату доводять водою до об'єму 50,0 мл і перемішують.

Розчин порівняння. 0,100 г СЗ енісаміуму йодиду розчиняють у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл. 2,00 мл одержаного розчину доводять водою до об'єму 100,0 мл і перемішують.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину і розчину порівняння на спектрофотометрі за довжини хвилі 267 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи воду як компенсаційний розчин.

Вміст енісаміуму йодиду (X), що перейшов у розчин із капсули, у відсотках, обчислюють за формулою (2.7):

$$X = \frac{A_1 \cdot m_0 \cdot 1 \cdot 1000 \cdot 50 \cdot P \cdot (100 - W_0) \cdot 100}{A_0 \cdot 50 \cdot 50 \cdot n \cdot a \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{A_1 \cdot m \cdot P \cdot (100 - W_0)}{A_0 \cdot n \cdot a \cdot 10}, \quad (2.7)$$

де  $A_1$  – оптична густина випробовуваного розчину;

$A_0$  – оптична густина розчину порівняння;

$m_0$  – маса наважки СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, в г;

$a$  – вміст енісаміуму йодиду (0,5000), в г;

$n$  – кількість капсул, взятих для випробування;

$P$  – вміст основної речовини у СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, в перерахуванні на суху речовину, у %;

$W_0$  – втрата в масі при висушуванні СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, у %.

#### 2.4.7 ВЕРХ-методика вивчення профілів розчинення енісаміуму йодиду з таблеток та капсул

*Методика для таблеток.*

*Випробовуваний розчин.* Таблетки розміщують у середовище розчинення.

Через проміжки часу відбирають по 2 мл розчину із центральної частини стакана для розчинення. Розчин фільтрували крізь паперовий фільтр «синя стрічка» або застосовують автоматичну систему відбору проб.

*Розчин порівняння.* 0,028 г СЗ енісаміуму йодиду розчиняють у 80 мл відповідного середовища розчинення і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл.

*Буферний розчин рН 2,5.* 1,085 г натрію октансульфонату та 1,000 г динатрію гідрофосфату безводного розчиняють в 900 мл води, доводять рН розчину до  $2,5 \pm 0,05$  із застосуванням фосфорної кислоти, доводять об'єм розчину водою очищеною до 1000,0 мл.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за наступних умов:

– хроматографічна колонка октадецилсилільна розміром  $150 \times 4,6$  мм, заповнена сорбентом з розміром часток 5 мкм (Zorbax Eclipse XDB – C18), виробництва Agilent Technologies, США;

– рухома фаза: буферний розчин рН 2,5 – вода – ацетонітрил (30:35:35 об/об/об);

– потік рухомої фази: 0,5 мл/хв;

– детектування при 225 нм;

– температура термостату колонки: 30 °С.

Хроматографують 5 мкл розчину порівняння.

Часи утримування: першого піка енісаміуму йодиду (йодид-йон) близько 2,6 хв, другого піка енісаміуму йодиду (енісаміум) близько 3,8 хв.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо на хроматограмі розчину порівняння:

– RSD, розраховане для піків енісаміуму з трьох паралельних хроматограм, не перевищує 0,5 %;

– ефективність хроматографічної колонки, обчислена за піком енісаміуму становить не менше 2500 теоретичних тарілок;

– коефіцієнт симетрії, розрахований за піком енісаміуму становить не більше 1,5.

Хроматографували 5 мкл випробовуваного розчину.

Кількість енісаміуму йодиду, що перейшла у розчин із таблеток, у відсотках (X), обчислюють за формулою (2.8):

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 900 \cdot P \cdot (100 - W_0) \cdot 100}{S_0 \cdot 100 \cdot n \cdot a \cdot 100 \cdot 100}, \quad (2.8)$$

де  $S_1$  – площа піка енісаміуму, отримана на хроматограмі випробовуваного розчину;

$S_0$  – площа піка енісаміуму, отримана на хроматограмі розчину порівняння;

$m_0$  – наважка СЗ енісаміуму йодиду, взята для приготування розчину порівняння, в мг;

$a$  – заявлений вміст енісаміуму йодиду в одній таблетці, в міліграмах;

$n$  – кількість таблеток, взятих для випробування;



$P$  – вміст основної речовини у СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, в перерахуванні на суху речовину, у %;

$W_0$  – втрата в масі при висушуванні у СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, у %.

#### *Методика для таблеток*

Для визначення профілів розчинення капсул застосовують методику, що розроблена для контролю профілів розчинення таблеток з наступними корективами:

*Випробовуваний розчин.* Для випробування застосовували капсули (1 капсула містила 0,5 г АФІ).

Через 5, 10, 15, 20, 30, 45 хв відбирали по 2 мл із центральної частини посудини для розчинення, фільтрували крізь паперовий фільтр «синя стрічка» або застосовували автоматичний відбірник проб (із застосуванням фільтрів «Poroplast» з розміром пор 20 мкм).

*Розчин порівняння.* 0,055 г СЗ енісаміуму йодиду розчиняли у 80 мл відповідного буферного розчину і доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл.

Кількість енісаміуму йодиду, що перейшла у розчин із капсули, у відсотках ( $X$ ), обчислювали за формулою (2.9):

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 900 \cdot P \cdot (100 - W_0) \cdot 100}{S_0 \cdot 100 \cdot n \cdot a \cdot 100 \cdot 100}, \quad (2.9)$$

де  $S_1$  – площа піка енісаміуму, отримана на хроматограмі випробовуваного розчину;

$S_0$  – площа піка енісаміуму, отримана на хроматограмі розчину порівняння;

$m_0$  – наважка СЗ енісаміуму йодиду, взята для приготування розчину порівняння, в мг;

$a$  – заявлений вміст енісаміум йодиду в одній капсулі в міліграмах;

$n$  – кількість капсул, взятих для випробування;

$P$  – вміст основної речовини у СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, в перерахуванні на суху речовину, у %;

$W_0$  – втрата в масі при висушуванні у СЗ енісаміуму йодиду, взятого для приготування розчину порівняння, у %.

Таким чином, наведено алгоритм проведення експериментальних досліджень розробки та валідації аналітичних методик кількісного визначення та визначення супровідних домішок в АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду. Описано фізико-хімічні властивості енісаміуму йодиду та якісний склад ГЛФ (таблеток та капсул). Наведено перелік обладнання та реактивів, що були застосовані під час розробки та валідації аналітичних методик. Детально описано методики контролю АФІ та ГЛФ за такими показниками якості як «Супровідні домішки», «Кількісне визначення», «Розчинення», «Профілі розчинення» із застосуванням УФ спектрофотометрії (ДФУ 2.2.25) та ВЕРХ (ДФУ 2.2.29).

### РОЗДІЛ 3

## РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ АФІ ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ

Одним із основних завдань фармацевтичної хімії є розробка методик контролю якості АФІ. В умовах сучасного фармацевтичного ринку АФІ мають відповідати вимогам ІСН, ДФУ, ЄФ.

Зважаючи на нові підходи щодо забезпечення якості АФІ та ГЛФ, виникає необхідність створення аналітичних методик, які будуть відповідати діючим вимогам фармацевтичної регуляції, так як підходи, які були застосовані 10-15 років тому, наразі не можуть бути визнаними на законодавчому рівні України та на добре регульованих ринках. Для забезпечення регуляторної відповідності, виникає необхідність доопрацювання, а в деяких випадках і нової розробки, аналітичних методик контролю якості АФІ та ГЛФ.

Наявні аналітичні методики контролю вмісту домішок не дозволяють забезпечити регуляторно дозволений рівень контролю. У наявній ТШХ методиці недостатня чутливість (МВ становить 0,4 %) [123], в той час як для АФІ енісаміуму йодиду рівень контролю має бути забезпечений на рівні «не більше 0,05 %» кожної домішки [143].

У наведеному розділі представлено основні методики контролю якості АФІ та їх валідація. Також наведено результати вивчення розчинності АФІ енісаміуму йодиду в стандартних фармакопейних буферних розчинах в діапазоні рН від 1,2 до 7,5 у відповідності до БСК класифікації. Дані з розчинності надають можливість класифікувати АФІ у відповідності до БСК.

### 3.1 Розробка методики контролю домішок в АФІ енісаміуму йодиду

Перед початком розробки методики контролю супровідних домішок виникла необхідність у встановленні чутливості методики, а точніше розрахунку необхідної МВ та МКВ, визначенні переліку домішок та їх допустимого відсоткового вмісту в АФІ. Такий розрахунок було проведено у відповідності до ІСН Q3А.

У науковій літературі не описані аналітичні методики контролю якості енісаміуму йодиду, які б дозволяли виконати контроль домішок на рівні, заявленому в рекомендаціях ІСН Q3А.

При встановленні переліку потенційно можливих домішок було взято до уваги схему синтезу АФІ, де в якості вихідних матеріалів використовують ізонікотинову кислоту та бензиламін, а проміжним продуктом є бензиламід ізонікотинової кислоти [138].

Структурні формули енісаміуму йодиду та трьох відомих домішок наведено на рис. 3.1.



Рис. 3.1. Структурні формули енісаміуму йодиду та відомих домішок АФІ [138]

У відповідності до рекомендацій ІСН Q3А при розрахунку вмісту ідентифікованих та неідентифікованих домішок використовують дані, що наведені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

**Рекомендації ІСН Q3A відносно встановлення допустимих рівнів вмісту  
домішок в АФІ**

Максимальна добова доза АФІ, г/добу	Межа інформування, %	Межа ідентифікації	Межа кваліфікації
≤ 2	0,05	0,10 % або 1,0 мг/добу (в залежності що менше)	0,15 % або 1,0 мг/добу (в залежності що менше)
> 2	0,03	0,05 %	0,05 %

Таким чином, для встановлення допустимого ліміту вмісту домішок необхідно керуватися максимальною добовою дозою АФІ.

Відповідно до інструкції із застосування ГЛФ енісаміуму йодиду (Амізон Макс, капсули 0,5 г) [144] максимальна добова доза АФІ для пацієнта становить 2,0 г. Тому, відповідно до міжнародних рекомендацій, нормування вмісту домішок має бути на числових рівнях, що наведені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

**Нормування вмісту домішок в АФІ енісаміуму йодиду відповідно до  
рекомендацій ІСН Q3A**

Назва домішки	Допустимий вміст
Бензиламін	не більше 0,05 %
Ізонікотинова кислота	те саме
Бензиламід ізонікотинової кислоти	«-//-»
Будь-яка неідентифікована домішка	«-//-»

У наведеному випадку поріг інформування домішок встановлено на рівні 0,03 %.

Враховуючи достатньо жорсткі вимоги щодо вмісту домішок, а також необхідність аналізу щонайменше трьох домішок та основного компоненту, виникла необхідність у застосуванні методу ВЕРХ.

Енісаміум йодид – це іонна сполука, тому застосування рухомої фази, що представляла собою суміш води та органічних розчинників, разом з такими хроматографічними колонками як Discovery Cyano 4,6 x 150 з розміром часток 5 мкм, Luna NH<sub>2</sub> 4,6 x 150 з розміром часток 5 мкм, Nova-Pack Phenyl 3,9 x 150 з розміром часток 4 мкм, не привело до бажаного результату, також не було забезпечено хроматографічне розділення основного компонента з домішками.

Одним із способів вирішення завдання такої складності виявилось застосування йон-парних реагентів, котрі сприяють утриманню йонних сполук на хроматографічній колонці [145, 146]. Як йон-парні реагенти було застосовано тетрабутиламонію гідроксид та натрію октансульфонат.

У результаті проведених експериментальних досліджень як йон-парний реагент було вибрано натрію 1-октансульфонат моногідрат, при застосуванні якого досягалося розділення хроматографічних піків (компонентів), а також забезпечувалася їх належна характеристика, що необхідно для дотримання придатності хроматографічної системи. При застосуванні тетрабутиламонію гідроксиду було складно забезпечити розділення піків енісаміуму з піком бензиламідом ізонікотинової кислоти. 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.

При зниженні значення рН буферного розчину до рН 2,0 погіршувалося розділення піків енісаміуму з піком бензиламідом ізонікотинової кислоти, а при підвищенні рН більше 2,5 погіршувалося розділення піка йодид-йону з ізонікотиновою кислотою (рис. 3.2-3.3).

На рис. 3.2 наведена хроматограма, отримана із застосуванням рухомої фази, де значення рН буферного розчину становило 2,0.

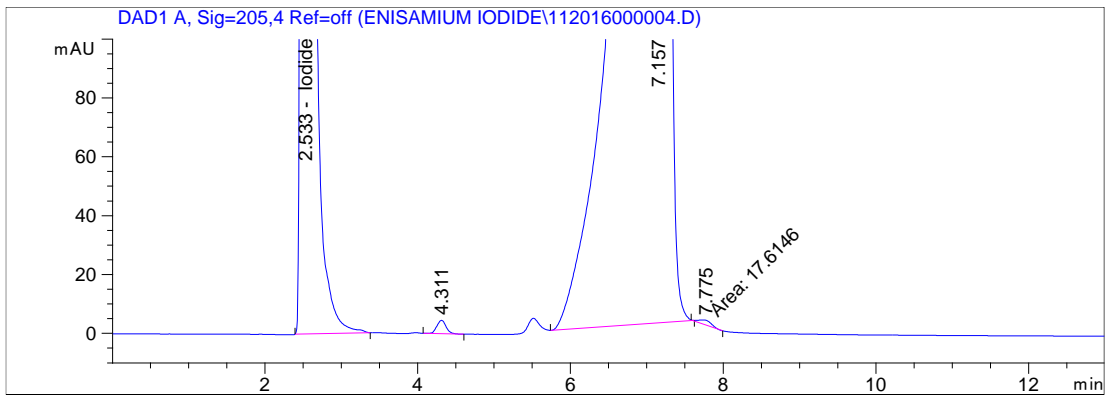


Рис. 3.2. Хроматограма розчину порівняння отримана із застосуванням буферного розчину із значенням рН 2,0 (часи утримування піків: йодид-йон – 2,5 хв, бензиламін – 4,3 хв, енісаміум – 7,2 хв, бензиламід ізонікотинової кислоти – 7,8 хв)

Із хроматограми на рис. 3.2 видно, що немає достатнього розділення піка енісаміуму (час утримування 7,157 хв) з піком бензиламиду ізонікотинової кислоти (час утримування 7,775 хв).

На рис. 3.3 наведена хроматограма, отримана із застосуванням рухомої фази, де значення рН буферного розчину становило 3,0.

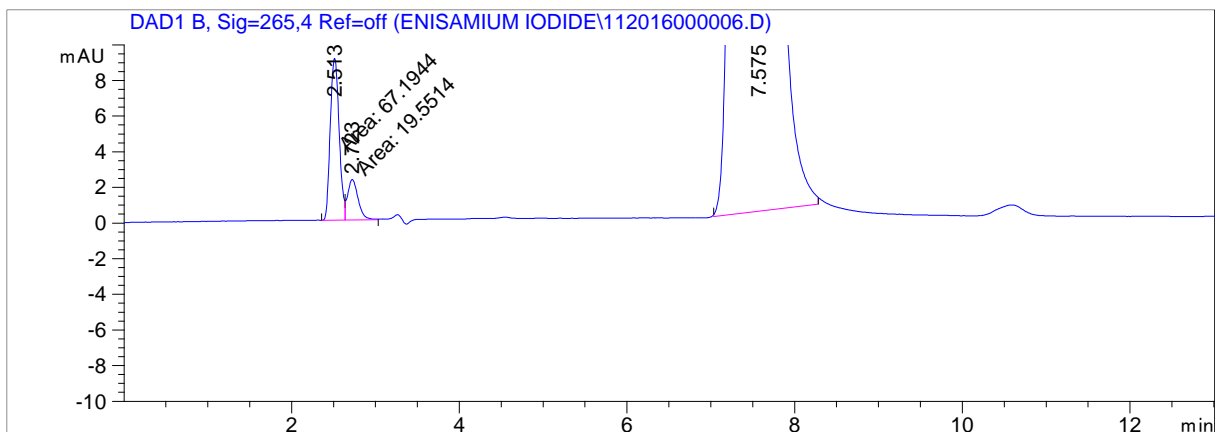


Рис. 3.3. Хроматограма розчину порівняння отримана із застосуванням буферного розчину із значенням рН 3,0 (часи утримування піків: йодид-йон – 2,5 хв, ізонікотинова кислота – 2,7 хв, енісаміум – 7,6 хв)

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

На початковому етапі розробки аналітичної методики визначення супровідних домішок була спроба застосування хроматографічної колонки з сорбентом Суано (CN), але із даним сорбентом не вдалося досягти утримування енісаміуму йодиду. Приклад хроматограми, отриманої для енісаміуму йодиду на колонці зі сорбентом Суано наведено на рис. 3.4.

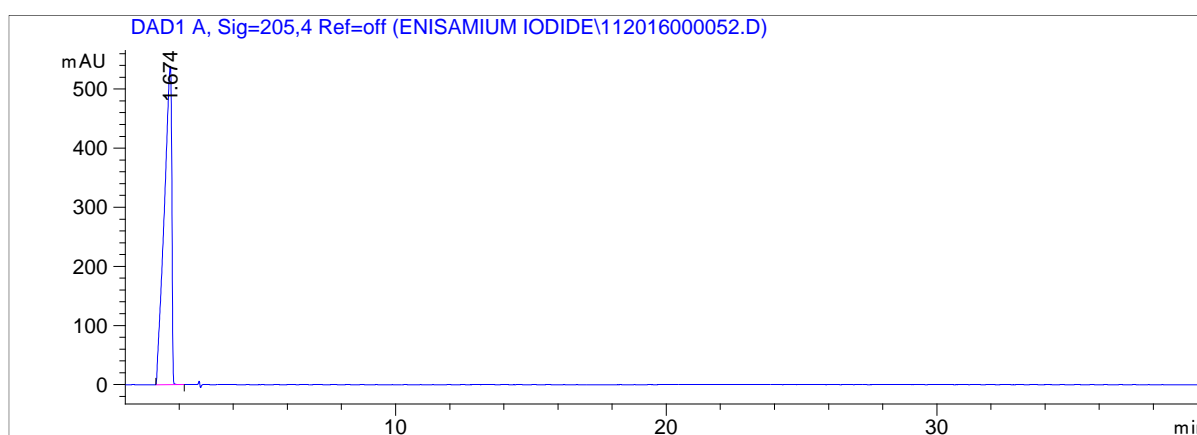


Рис. 3.4. Хроматограма розчину енісаміуму йодиду, отримана із застосуванням хроматографічної колонки Nova-Pak Суано 150 мм x 3,9 мм, з розміром часток 4 мкм

Експериментально встановлено, що октадецильна хроматографічна колонка розміром 150 мм x 4,6 мм, з розміром часток 5 мкм є оптимальною, оскільки 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 рухомої фази як розчинника, що сприяло покращенню чутливості системи, збільшуючи співвідношення сигнал/шум.

Вибрана оптимальна концентрація випробовуваного розчину – 0,4 мг/мл, оскільки при більшій концентрації, наприклад при 1 мг/мл, спостерігається погіршення симетрії піка енісаміуму до рівня, що призводить до втрати



селективності по відношенню до визначення бензиламіну та невідомих домішок.

На рис. 3.5 наведена хроматограма випробовуваного розчину, концентрація якого становила 1 мг/мл енісаміуму йодиду.

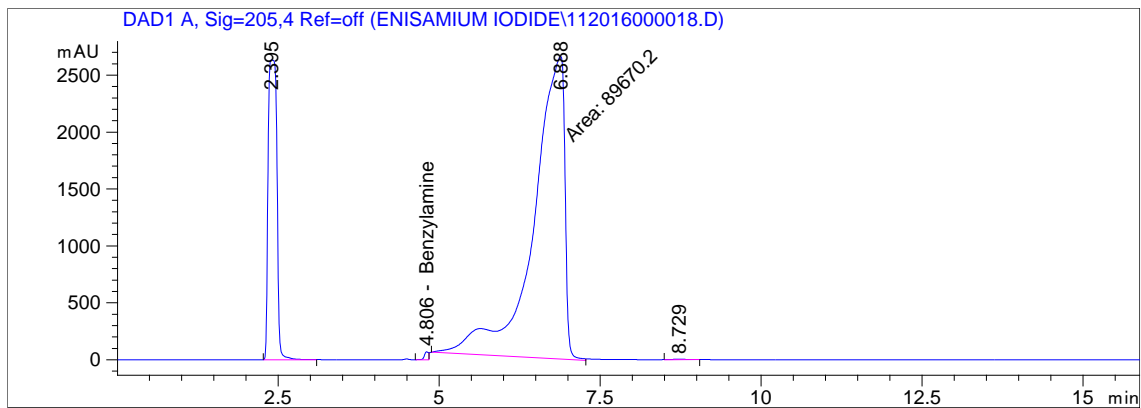


Рис. 3.5. Хроматограма, отримана із застосуванням випробовуваного розчину, де концентрація енісаміуму йодиду становила 1 мг/мл (часи утримування піків: йодид-йон – 2,4 хв, бензиламін – 4,8 хв, енісаміум – 6,9 хв)

При зменшенні концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині (менше 0,4 мг/мл) не досягається достатня чутливість методики, яка б дозволяла детектувати та визначати домішки на попередньо встановленому рівні – 0,05 %.

Для коректного встановлення довжини хвилі детектування було проведено роботи з визначення максимумів поглинання випробовуваних речовин в УФ та ВИД діапазонах світла.

Вивчення максимумів поглинання відомих домішок проводили у відповідності до ДФУ 2.2.25. Спектри домішок наведено на рис. 3.6–3.8.

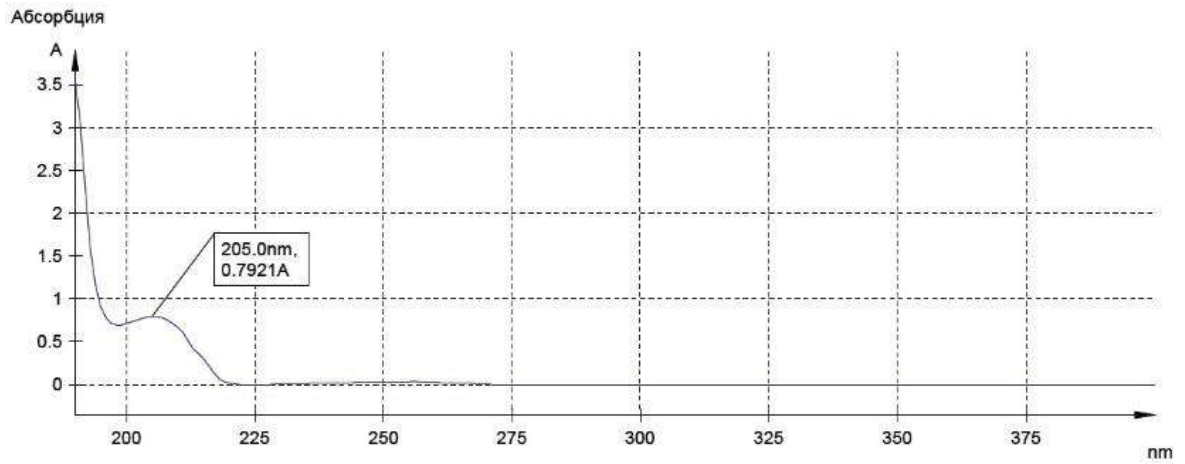


Рис. 3.6. УФ – спектр поглинання бензиламіну

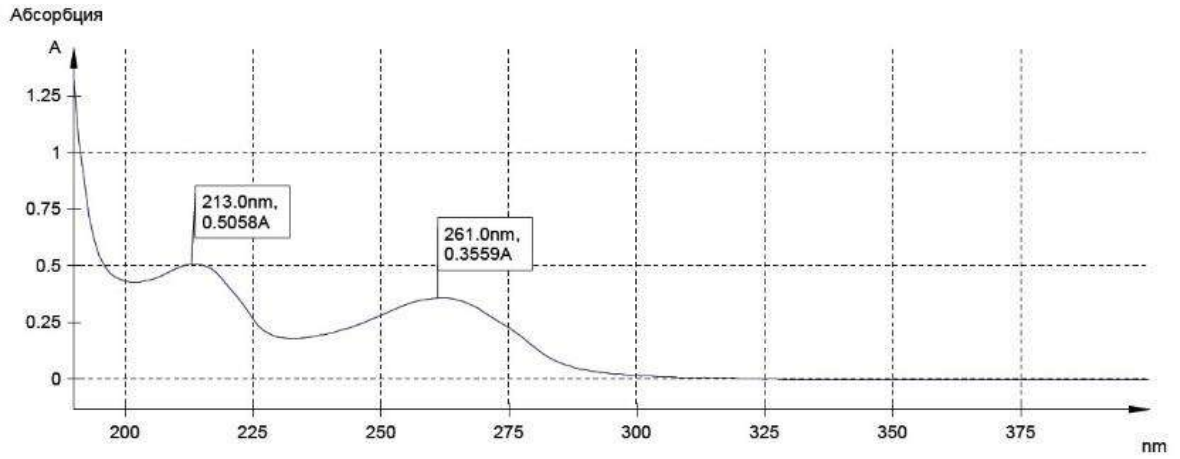


Рис. 3.7. УФ – спектр поглинання ізонікотинової кислоти

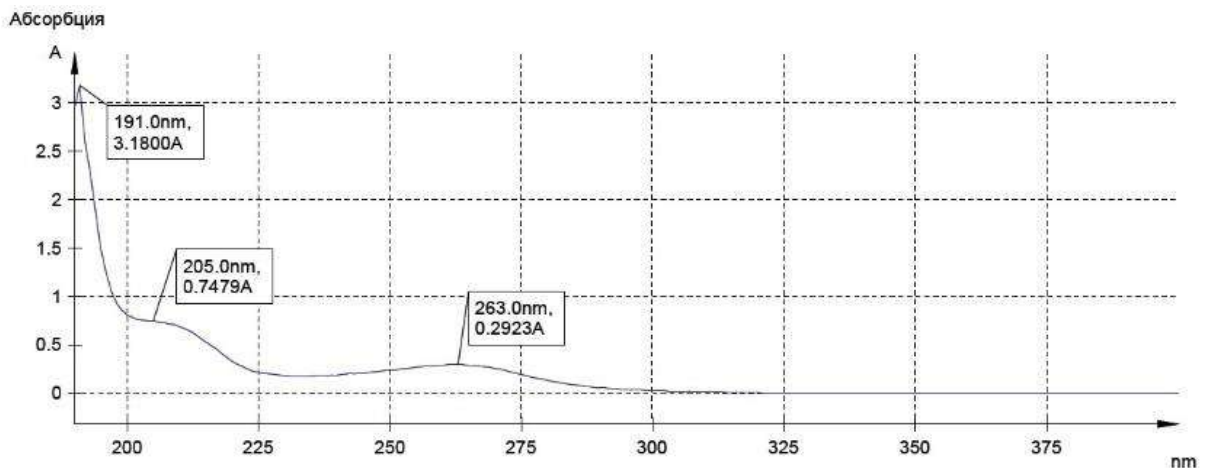


Рис. 3.8. УФ – спектр поглинання бензиламіду ізонікотинової кислоти

Для бензиламіну встановлено довжину хвилі детектування 205 нм. Враховуючи те, що поглинання для бензиламіду ізонікотинової кислоти за довжини хвилі 205 нм має більшу абсорбцію, ніж за 263 нм, і враховуючи необхідність досягнення високої чутливості методики, для бензиламіду ізонікотинової кислоти було встановлено довжину хвилі детектування таку ж саму, як і для бензиламіну – 205 нм.

На початковому етапі розробки методики для ізонікотинової кислоти було запропоновано довжину хвилі детектування 261 нм, але при додаткових дослідженнях було враховано неповне розділення ізонікотинової кислоти з йодид-йоном, а також враховано низькохвильовий максимум йодид-йону, тому довжина хвилі детектування ізонікотинової кислоти була вибрана 265 нм.

Для встановлення довжини хвилі детектування неідентифікованих домішок, а також в рамках підтвердження селективності методики стосовно потенційно невідомих домішок, було проведено стресові дослідження: вплив підвищеної температури, вплив окисника, кислотний та лужний гідроліз та вплив світла [147, 148].

Умови стресових випробувань, яким піддавався енісаміум йодид, а також основні продукти розкладу наведено в табл. 3.3.

У результаті проведення стресових випробувань було встановлено, що субстанція енісаміуму йодиду стабільна, основними продуктами розкладу є бензиламін та ізонікотинова кислота. В зв'язку з високою абсорбцією вихідних компонентів синтезу та проміжного продукту синтезу при 205 нм, для детектування неідентифікованих домішок встановлено довжину хвилі 205 нм.

Приклади хроматограм зразка АФІ, який піддавали стресовим випробуванням, наведено на рис. 3.9–3.10.

## Умови проведення та результати стресових випробувань

Умови	Часові точки контролю	Отримані продукти розкладу
Температура 100 °С	0, 5, 10 діб	Бензиламін Ізонікотинова кислота
Перекис водню 6 % розчин	0, 5, 10 діб	Бензиламін Ізонікотинова кислота Неідентифіковані домішки
Хлористоводнева кислота 1М розчин	0, 5, 10 діб	Не спостерігається утворення продуктів розкладу
Натрію гідроксид 0,1 М розчин	0, 5, 10 діб	Бензиламін Ізонікотинова кислота
Вплив світла	Загальний вплив світла не менше 1200000 люкс/год та джерело УФ світла 200 Вт·г/м <sup>2</sup>	Не спостерігається утворення продуктів розкладу

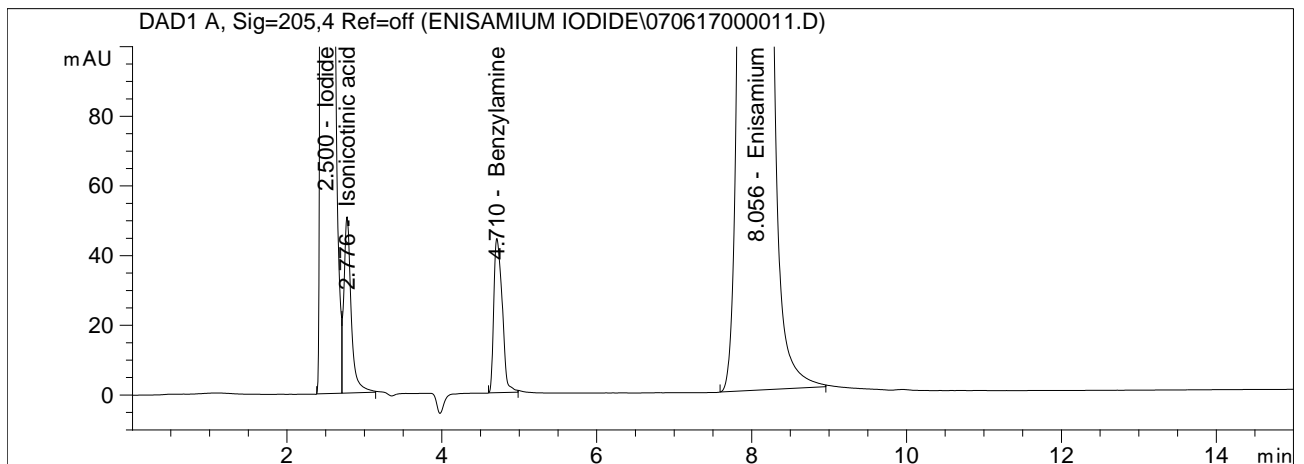


Рис. 3.9. Хроматограма випробовуваного розчину (зразок АФІ, який піддавали стресовим випробуванням), отримана за довжини хвилі 205 нм

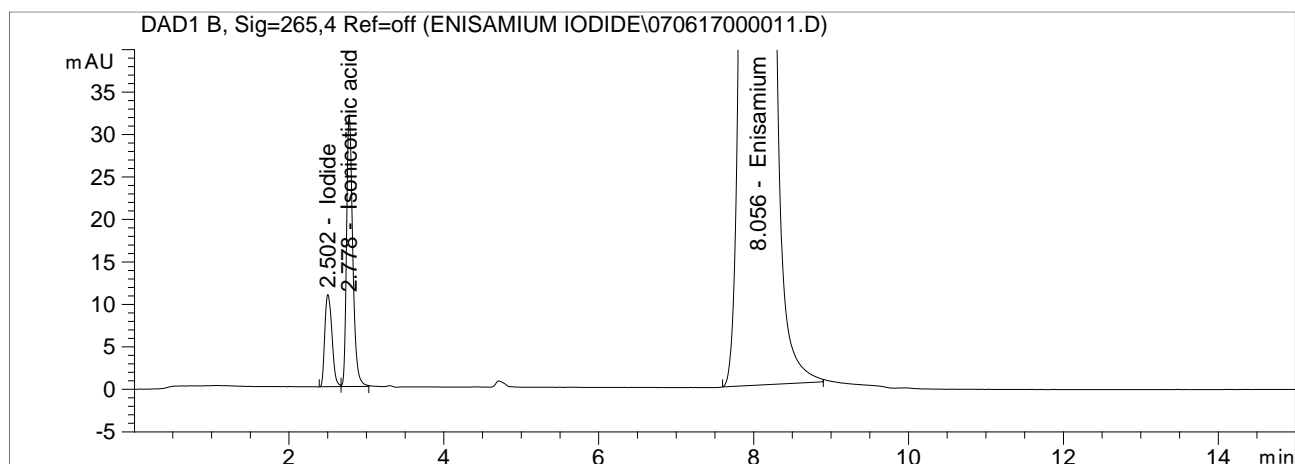


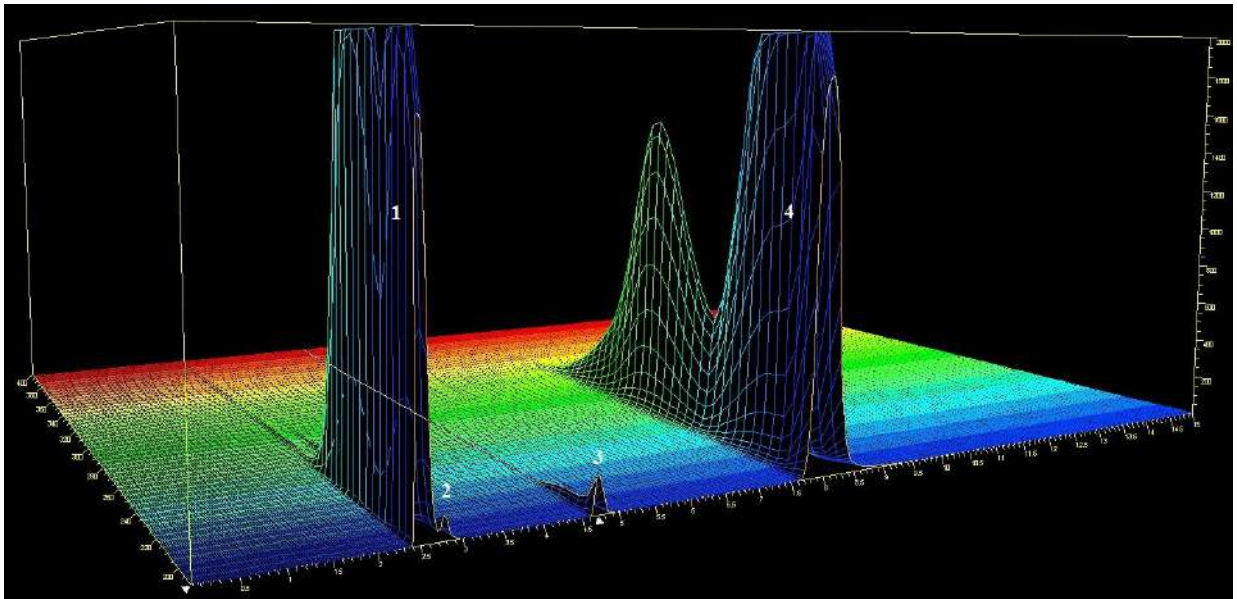
Рис. 3.10. Хроматограма випробовуваного розчину (зразок АФІ, який піддавали стресовим випробуванням), отримана за довжини хвилі 265 нм

Також проводилася 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. 3.11.

Для оцінки придатності хроматографічної системи готували розчин з вмістом основних домішок на рівні 0,03 % по відношенню до концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині.

Хроматограми вищезгаданих розчинів порівняння та випробовуваних розчинів, що отримані за довжин хвиль 205 нм та 265 нм, наведені на рис. 3.12–3.13.



1. Спектр першого піка енісаміуму йодиду

2. Спектр ізонікотинової кислоти

3. Спектр бензиламіну

4. Спектр другого піка енісаміуму йодиду

Рис. 3.11. ВЕРХ-спектр випробовуваного розчину після впливу стресових випробувань на субстанцію енісаміуму йодиду

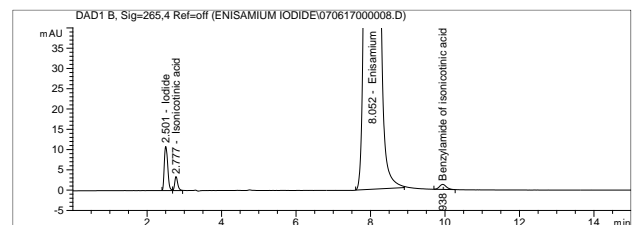
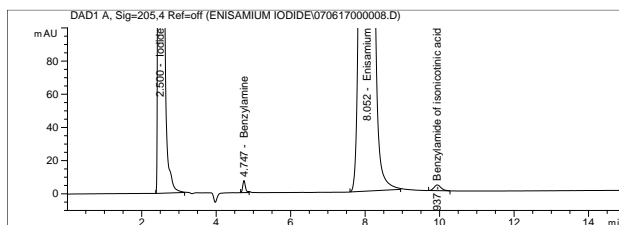


Рис. 3.12. Хроматограми розчинів порівняння, отримані за довжини хвилі 205 нм та 265 нм

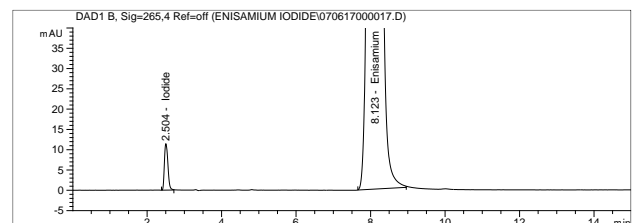
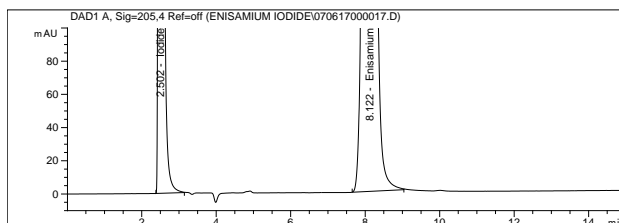


Рис. 3.13. Хроматограми випробовуваних розчинів, отримані за довжини хвилі 205 нм та 265 нм

Для оцінки придатності хроматографічної системи, а також з метою можливості відтворення методики на інших приладах, в тому числі в інших лабораторіях, були встановлені вимоги до придатності хроматографічної системи [149]. Детальний опис методики визначення супровідних домішок в АФІ енісаміуму йодиду наведений в розд. 2.

### 3.2 Валідація методики контролю супровідних домішок енісаміуму йодиду

Оскільки методика визначення супровідних домішок відповідно до вимог ДФУ [127, 134] має бути валідована, було проведено її валідацію за такими валідаційними характеристиками як: специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, діапазон застосування, робастність. Також розраховано МВ та МКВ кожної домішки.

Перед початком проведення валідації було проаналізовано розчин для перевірки придатності хроматографічної системи (рис. 3.14).

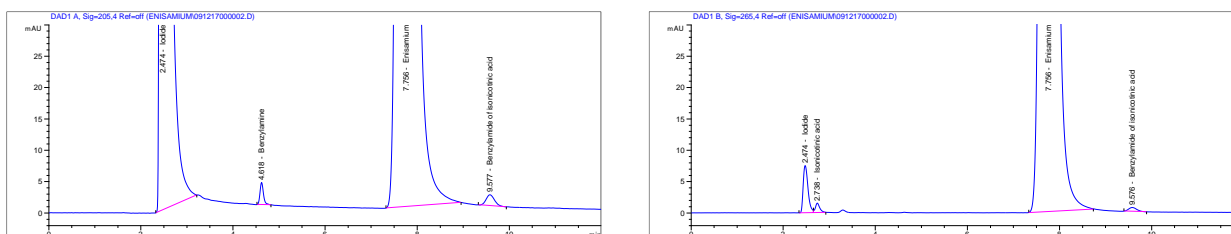


Рис. 3.14. Хроматограми розчину для перевірки придатності хроматографічної системи, отримані при 205 нм та 265 нм

У табл. 3.4 наведено результати щодо придатності хроматографічної системи. Як видно із результатів, наведених у табл. 3.4, придатність хроматографічної системи виконується.

**Дані, що підтверджують придатність хроматографічної системи при визначенні супровідних домішок у АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Параметри придатності хроматографічної системи	Критерії прийнятності	Отримані значення
Число теоретичних тарілок, розраховане за піком бензиламіну (при 205 нм)	не менше 2500	19740
Симетрія піка бензиламіну (при 205 нм)	від 0,8 до 1,5	1,2
Співвідношення пік/западина для піка йодид-йону та піка ізонікотинової кислоти (при 265 нм)	не менше 1,1	4,0
Співвідношення пік/западина для піка енісаміуму та піка бензиламіду ізонікотинової кислоти (при 205 нм)	не менше 1,1	6,0
Відносне стандартне відхилення, розраховане для 3-х паралельних інжекцій, для кожного із визначуваних компонентів, у %	не більше 2,0	максимальне значення 1,2

Для підтвердження специфічності методики проводили хроматографування розчинника (рухомої фази), розчинів ідентифікованих домішок з концентрацією 0,0004 мг/мл та розчин енісаміуму йодиду з концентрацією 0,4 мг/мл.

Оскільки на хроматограмах відсутня інтерференція піків домішок, що визначаються між собою, піками енісаміуму йодиду та піками рухомої фази, то можна стверджувати, що методика є специфічною.

Отримані хроматограми представлені на рис. 3.15.

Вивчення лінійності проводили на модельних сумішах, в яких концентрація бензиламіну, бензиламіду ізонікотинової кислоти, ізонікотинової кислоти та енісаміуму йодиду змінювалася в діапазоні концентрацій від 0,01 % до 0,06 % відносно концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині (0,4 мг/мл). Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів [150]. Отримані дані наведено в табл. 3.5.



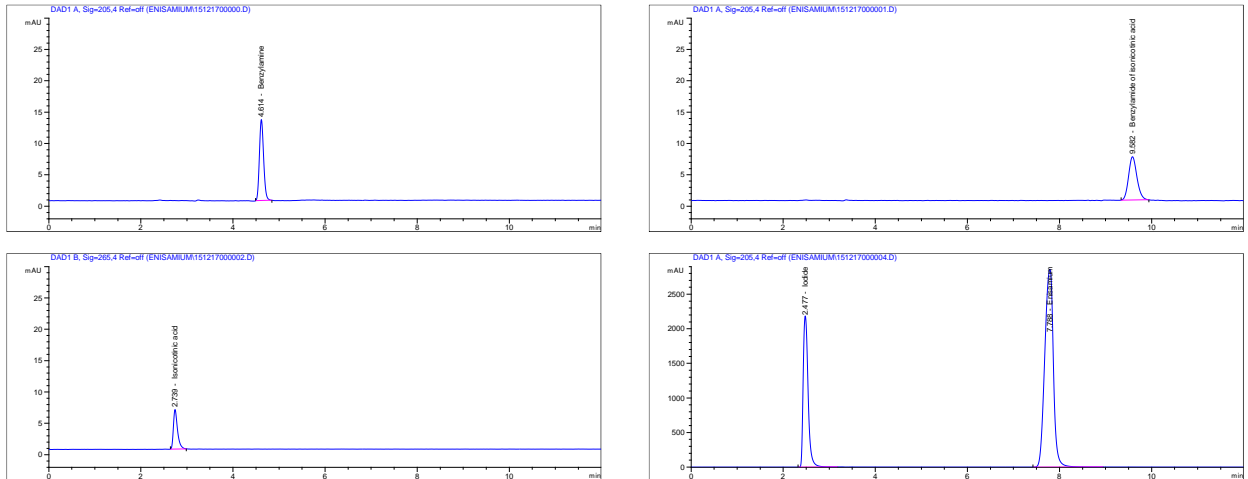


Рис. 3.15. Типові хроматограми підтвердження специфічності аналітичної методики

Таблиця 3.5

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

Величина	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Отримані значення			
		БА	ІНК	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

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності, що регламентовані ДФУ [151]. Отримані значення коефіцієнтів кореляції підтверджують лінійність залежності між «введеною» і «знайденою» кількістю введеної домішки.

Графіки лінійної залежності площ піків від концентрації компонентів наведено на рис. 3.16.

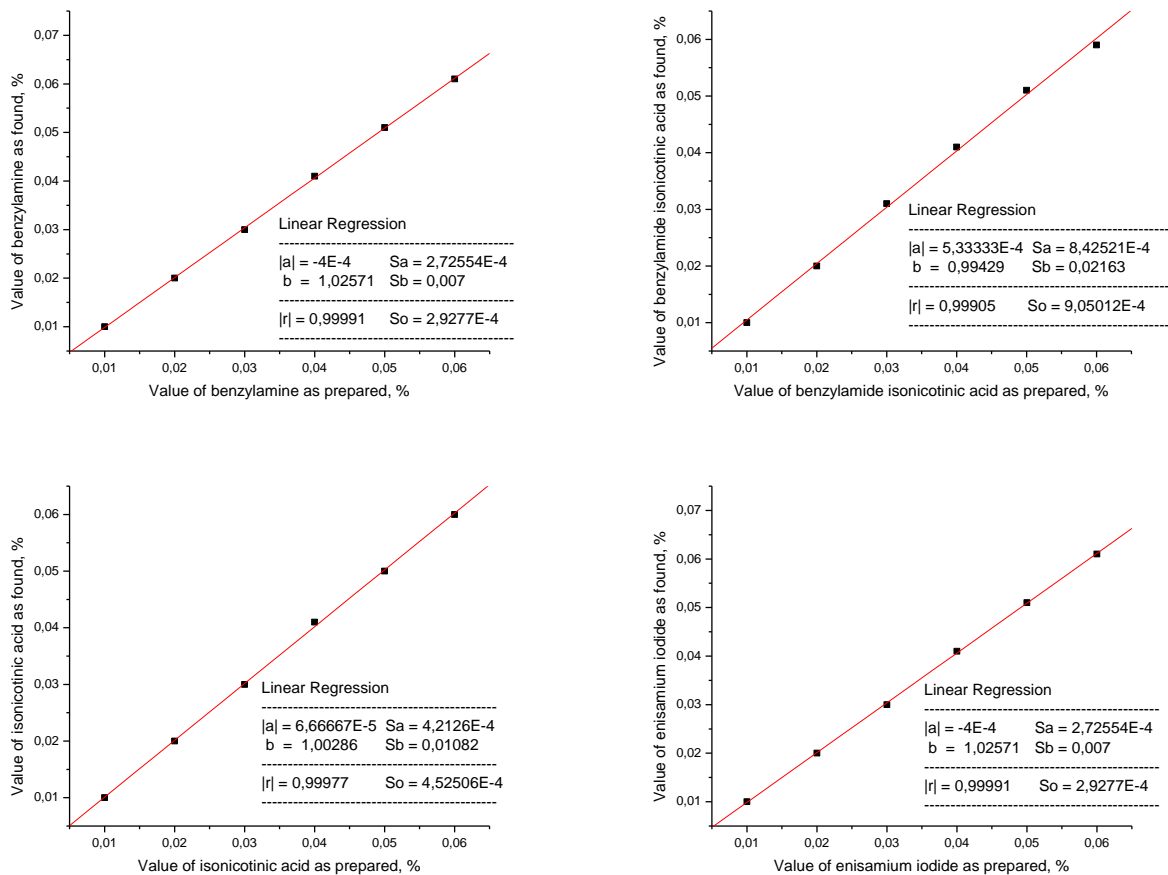


Рис. 3.16. Графіки лінійної залежності площ піків від концентрації аналітів (бензиламіну, бензиламіду ізонікотинової кислоти, ізонікотинової кислоти, енісаміуму йодиду)

Результати аналізу модельних сумішей для визначення домішок та їх статистична обробка наведено в табл. 3.6.

**Результати аналізу модельних сумішей та їх статистична обробка  
в умовах визначення супровідних домішок  
в АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Концентрація аналітів								
у модельній суміші, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 0,05$	знайдено за площами піків, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 0,05$				знайдено у % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$			
	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ
0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	100,0	100,0	100,0	100,0
0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	100,0	100,0	100,0	100,0
0,030	0,030	0,030	0,031	0,030	100,0	100,0	103,3	100,0
0,040	0,041	0,041	0,041	0,041	102,5	102,5	102,5	102,5
0,050	0,051	0,050	0,051	0,051	102,0	100,0	102,0	102,0
0,060	0,061	0,060	0,059	0,061	101,7	100,0	98,3	101,7
середнє, Z%					101,3	101,0	101,1	101,0
відносне стандартне відхилення, $RSD_z$ %					1,15	1,01	1,93	1,15
довірчий інтервал збіжності результатів, $\Delta_z \% = t(95\%, 5) \times RSD_z$					2,32	2,04	3,89	2,32
критичне значення для збіжності результатів, $\Delta_z \% \leq \Delta_{As} (\Delta_{As} = 5,0 \%)$					2,32 < 5,0	2,04 < 5,0	3,89 < 5,0	2,32 < 5,0
систематична похибка $\delta =  Z - 100 $					1,3	1,0	1,1	1,0
критерій незначущості систематичної похибки, $\delta \leq 0,32 \times \Delta_{As}$					1,3 < 1,6	1,0 < 1,6	1,1 < 1,6	1,0 < 1,6

Дані табл. 3.6 свідчать, що для домішок бензиламін, бензиламід ізонікотинової кислоти, ізонікотинова кислота, та власне енісаміуму йодиду методика аналізу характеризується достатньою прецизійністю. Знайдені значення відносного довірчого інтервалу величини  $Z$  менше критичного значення для збіжності результатів та не перевищують 5,0 %. Довірчий інтервал збіжності результатів не перевищує 5,0 %. Похибка  $\delta$  методики для визначення кожної домішки становить 1,3 % для бензиламіну та 1,0 % для інших визначуваних домішок.

МВ та МКВ ідентифікованих та неідентифікованих домішок було визначено за результатами лінійної регресії, використовуючи значення стандартного відхилення вільного члена лінійної залежності ( $S_a$ ) та кутового коефіцієнта для розрахованої регресійної прямої ( $b$ ):

$$\text{МВ (\%)} = 3,3 \cdot S_a / b, \quad (3.1)$$

$$\text{МКВ (\%)} = 10 \cdot S_a / b, \quad (3.2)$$

Керуючись даними, наведеними в табл. 3.5, встановлено МВ та МКВ. МВ та МКВ для визначуваних компонентів наведені в табл. 3.7.

*Таблиця 3.7*

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

Домішка	МВ, %	МКВ, %
Бензиламін	0,001	0,003
Ізонікотинова кислота	0,001	0,004
Бензиламід ізонікотинової кислоти	0,003	0,008
Неідентифіковані домішки (за піком енісаміуму)	0,001	0,003

Враховуючи те, що нормування вмісту ідентифікованої домішки та неідентифікованої домішки встановлено на рівні «не більше 0,05 %», то встановлені МВ та МКВ відповідають вимозі «не більше 0,03 %» [152].

Для оцінки правильності готували 3 модельні розчини з концентрацією ідентифікованих домішок та енісаміуму йодиду 0,03 %, 0,05 % та 0,06 % по відношенню до концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині в трьох паралельних дослідах для кожного концентраційного рівня. Отримані результати наведено в табл. 3.8.

Відносне стандартне відхилення між результатами для одного концентраційного рівня для всіх визначуваних домішок становить не більше 5,0 %. Довірчий інтервал ( $\Delta z$ ) становить 2,15 % для бензиламіну, 3,15 % для ізонікотинової кислоти, 2,58 % для бензиламід у ізонікотинової кислоти та 3,15 % для неідентифікованої домішки. Критерій статистичної незначущості ( $\delta$ ) становить 0,72 % для бензиламіну, 1,05 % для ізонікотинової кислоти, 0,86 % для бензиламід у ізонікотинової кислоти та 1,05 % для неідентифікованої домішки. Критерій практичної незначущості ( $\delta$ ) для всіх домішок становить 1,6 %. Систематична похибка ( $\delta$ ) аналітичної методики становить 1,78 % для бензиламіну, 0,77 % для ізонікотинової кислоти, 1,37 % для бензиламід у ізонікотинової кислоти та 0,96 % для неідентифікованої домішки.

Систематична похибка при визначенні всіх домішок становить нижче критерію статистичної та практичної незначущості ( $< 5,0$  %), тому правильність аналітичної методики підтверджена.

Правильність аналітичної методики знаходиться в межах критерію 95,0–105,0 %.

**Результати вивчення правильності методики визначення супровідних домішок у АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Концентрація аналітів								
у модельній суміші, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 0,05$	знайдено за площами піків, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 0,05$				знайдено в % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$			
	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ
0,030	0,030	0,030	0,031	0,031	100,0	100,0	103,3	103,3
0,030	0,031	0,031	0,031	0,031	103,3	103,3	103,3	103,3
0,030	0,031	0,031	0,030	0,030	103,3	103,3	100,0	100,0
0,050	0,051	0,051	0,050	0,050	102,0	102,0	100,0	100,0
0,050	0,051	0,050	0,051	0,051	102,0	100,0	102,0	102,0
0,050	0,051	0,050	0,051	0,050	102,0	100,0	102,0	100,0
0,060	0,061	0,060	0,060	0,061	101,7	100,0	100,0	101,7
0,060	0,061	0,060	0,061	0,060	101,7	100,0	101,7	100,0
0,060	0,060	0,059	0,060	0,059	100,0	98,3	100,0	98,3
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 0,03 %)					1,86	1,86	1,86	1,86
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 0,05 %)					0	1,15	1,14	1,15
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 0,06 %)					0,97	0,97	0,97	1,68
RSD між значеннями всіх концентраційних рівнів ( $Z_i$ ), %					1,16	1,69	1,39	1,69

Примітка.  $X_i$  та  $Y_i$  – нормалізовані значення «знайдено/введено»;  $Z_i$  – відношення «знайдено/введено» аналіту, у %;  $C_i$  – концентрація аналіту в  $i$ -ому аналізованому розчині;  $C_{st}$  – концентрація аналіту в розчині порівняння;  $S_i$  – площа визначуваного піка для  $i$ -того аналізованого розчину;  $S_{st}$  – площа визначуваного піка для розчину порівняння

Прецизійність вивчена на рівні збіжності та ВЛП. Для оцінки збіжності готували та аналізували 6 модельних сумішей, в яких були присутні ідентифіковані домішки в концентрації 0,05 % відносно концентрації субстанції у випробовуваному розчині (на максимально допустимому рівні домішок в присутності енісаміуму йодиду в концентрації 0,4 мг/мл) та 6 модельних розчинів енісаміуму йодиду в концентрації 0,05 % відносно концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині.

ВЛП підтверджували у порівнянні результатів з іншим аналітиком, аналізуючи 12 додаткових модельних сумішей наступного дня (6 модельних сумішей визначуваних домішок та 6 модельних розчинів енісаміуму йодиду).

Результати перевірки точності аналітичної методики наведено в табл. 3.9.

*Таблиця 3.9*

**Результати перевірки точності методики визначення супровідних домішок у АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Аналітик	Знайдений вміст, у %				
	№ зразка	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміум йодид
1	2	3	4	5	6
Перший	1	0,050	0,051	0,050	0,051
	2	0,051	0,050	0,050	0,050
	3	0,050	0,051	0,051	0,049
	4	0,051	0,051	0,051	0,050
	5	0,051	0,050	0,050	0,050
	6	0,050	0,050	0,051	0,049
	середнє	0,051	0,051	0,051	0,050
	RSD <sub>x</sub> , %	1,08	1,08	1,08	1,51
Другий	1	0,050	0,050	0,050	0,049
	2	0,051	0,051	0,051	0,050
	3	0,051	0,050	0,051	0,050
	4	0,050	0,050	0,051	0,049

Продовж. табл. 3.9

1	2	3	4	5	6
	5	0,050	0,051	0,050	0,050
	6	0,050	0,051	0,051	0,049
	середнє	0,050	0,051	0,051	0,050
	RSD <sub>x</sub> , %	1,03	1,08	1,02	1,11
–	RSD ВЛП, %	1,02	1,03	1,02	1,31
–	відносна різниця середніх значень	0,001	0	0	0,001

Як видно із табл. 3.9, відносне стандартне відхилення (RSD) отриманих результатів аналізу першого та другого аналітика, а також відносна різниця середніх значень результатів не перевищує 5,0 %, що свідчить про належну повторюваність результатів.

Робасність вивчали за стабільністю досліджуваних розчинів та надійністю хроматографічної методики.

Стабільність випробовуваних розчинів вивчалася за зміною площ піків під час зберігання розчинів за температури 25 °С. Результати вивчення стабільності розчинів наведено в табл. 3.10.

Експериментально встановлено, що випробовувані розчини стабільні протягом 48 год (в умовах зберігання не вище 25 °С).

Надійність аналітичної методики перевірялася за зміною швидкості потоку рухомої фази, температури термостату колонки, складу рухомої фази, рН буферного розчину. У випробуваннях робасності застосовували альтернативну хроматографічну колонку. Відповідно до цього проводили хроматографування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи, розчину порівняння та модельної суміші.

В табл. 3.11 наведено дані щодо вивчення робасності аналітичної методики.



Таблиця 3.10

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

Часова точка, в год	Кінцевий розчин порівняння				Модельна суміш, що містить 0,05 % енісаміуму йодиду у порівнянні до концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині
	площі піків, mAU×min				площа піка, mAU×min
	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміум	Енісаміум
0	32,1	19,9	37,1	38499	19,4
6	32,0	20,0	37,5	38383	19,3
12	32,2	19,9	37,3	38309	19,2
24	32,1	20,1	37,2	38330	19,2
48	32,0	19	37,6	38380	19,3
RSD, %	0,26	2,24	0,56	0,19	0,43

Таблиця 3.11

**Результати вивчення робастності методики визначення супровідних домішок у АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Умови, що змінюються		Вміст домішок/енісаміуму в модельній суміші (теоретичний вміст 0,05 %)			
		БА	ІНК	БАІНК	Енісаміум
1		2	3	4	5
Потік рухомої фази, мл/хв	0,45	0,050	0,050	0,049	0,048
	0,50	0,050	0,048	0,050	0,050
	0,55	0,049	0,049	0,049	0,049
	RSD, %	1,16	2,04	1,17	(RSD, %) 2,04

Продовж. табл. 3.11

1	2	3	4	5	6
Температура хроматографічної колонки, в °С	25	0,050	0,050	0,050	0,049
	30	0,050	0,048	0,050	0,050
	35	0,049	0,048	0,049	0,048
	RSD, %	1,16	2,37	1,16	(RSD, %) 2,04
Композиція рухомої фази: буферний розчин рН 2,5:вода:ацетонітрил (об/об/об)	28:44:28	0,050	0,050	0,049	0,051
	30:44:26	0,050	0,049	0,050	0,050
	32:44:24	0,049	0,049	0,049	0,049
	RSD, %	1,16	1,17	1,17	(RSD, %) 2,00
рН буферного розчину	рН 2,4	0,050	0,049	0,049	0,048
	рН 2,5	0,050	0,048	0,050	0,049
	рН 2,6	0,049	0,048	0,049	0,050
	RSD, %	1,16	1,19	1,17	(RSD, %) 2,04
Серійний номер хроматографічної колонки	B16099	0,049	0,048	0,050	0,050
	USYT001583	0,050	0,048	0,050	0,049
	RSD, %	1,43	0	0	(RSD, %) 1,43

Результати щодо вмісту кожної домішки підтверджують робастність аналітичної методики, адже варіабельність результатів для кожної із умов у порівнянні до початкових умов становить не більше 5 %.

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки було проведено, виходячи з даних, що наведені в табл. 3.12.

Таблиця 3.12

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки, що застосовується при визначенні супровідних домішок у АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Операція	Дані для розрахунку	Невизначеність, %
1	2	3
розчин порівняння		

Продовж. табл. 3.12

1	2	3
Зважування СЗ	з точністю до $\pm 0,0001$ г	0,1
Доведення до об'єму 100,0 мл	100,0 мл (3 колби)	0,12; 0,12; 0,12
Відбір аликвоти піпеткою Мора	10,00 мл	0,25
Відбір аликвоти піпеткою (проміжних розчинів домішок)	0,50 мл	1,23
випробовуваний розчин		
Зважування випробовуваної субстанції	з точністю до $\pm 0,0001$ г	0,1
Доведення до об'єму 100,0 мл	100,0 мл (2 колби)	0,12; 0,12
Відбір аликвоти піпеткою Мора	10,00 мл	0,25

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для розчину порівняння наведено нижче (3.3).

$$\Delta Sp = \sqrt{0,1^2 + 0,12^2 + 0,12 + 0,12 + 0,25^2 + 1,23^2} = 1,28 \%, \quad (3.3)$$

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для випробовуваного розчину наведено нижче (3.4).

$$\Delta Sp = \sqrt{0,1^2 + 0,24^2 + 0,25^2} = 0,32 \%, \quad (3.4)$$

Сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить (3.5):

$$\sqrt{1,28^2 + 0,32^2} = 1,32 \%, \quad (3.5)$$

Невизначеність пробопідготовки не перевищує допустимий рівень, оскільки прийнятний рівень становить  $0,32 \times \Delta_{Imp} = 0,32 \times 5 = 1,6 \%$  ( $1,32 < 1,6$ ) [151].

Прогноз загальної невизначеності аналізу  $\Delta_{As}$  проводили за наступним співвідношенням (3.6):

$$\Delta_{As} = \Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2, \quad (3.6)$$

де  $\Delta_{SP}$  – невизначеність пробопідготовки;

$\Delta_{FAO}$  – невизначеність кінцевої аналітичної операції (в даному випадку – ВЕРХ).

$\Delta_{FAO}$  розраховується із співвідношення (3.7):

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \times \frac{RSD_{\max} \times t_{95\%,n-1}}{\sqrt{n}}, \quad (3.7)$$

де  $\sqrt{2}$  – враховує наявність розчину порівняння та випробовуваного розчину;

$RSD_{\max}$  – відносне стандартне відхилення (%), що описане у вимогах до придатності хроматографічної системи;

$t_{95\%,n-1}$  – односторонній коефіцієнт Стьюдента для імовірності 95 %;

$n$  – число паралельних хроматограм.

Таким чином, виходячи із даних  $RSD$ ,  $\Delta_{FAO}$  становить:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \times \frac{2,0 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 4,8 \% , \quad (3.8)$$

Тоді,  $\Delta_{As}$  складає  $\sqrt{1,32^2 + 4,8^2} = 4,9 \% < 5,0 \%$

Таким чином, методика коректна та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною точністю [153]. Середні значення площ піків, що отримані при валідації методики визначення супровідних домішок в АФІ енісаміуму йодиду, наведені в дод. А.

### 3.3 Розробка та валідація методики кількісного визначення енісаміуму йодиду

У відповідності до рекомендацій ІСН Q2R [125], аналітична методика має бути валідована за наступними характеристиками: специфічність, правильність, прецизійність, лінійність, діапазон застосування, робасність, ВЛП. Методика визначення супровідних домішок в АФІ використана при розробці методики кількісного визначення основного компоненту в діючій речовині [154]. Для покращення характеристики піка було застосовано об'єм інжекції 10 мкл та довжину хвилі детектування 225 нм.

Перед початком проведення валідаційних робіт було перевірено придатність хроматографічної системи.

У табл. 3.13 наведено результати щодо придатності хроматографічної системи.

На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що придатність хроматографічної системи відповідає встановленим вимогам.

При дослідженні специфічності методики хроматографували розчин порівняння, випробовуваний розчин та розчинник (рухому фазу), в результаті чого встановлено, що на хроматограмі рухомої фази відсутні піки при часі виходу енісаміуму йодиду.

Таким чином, отримані результати доводять, що запропоновані умови хроматографування забезпечують специфічність визначення енісаміуму йодиду. Хроматограми рухомої фази, розчину порівняння та випробовуваного розчину наведено на рисунках 3.17–3.19.

**Дані, що підтверджують придатність хроматографічної системи при  
кількісному визначенні основного компонента в АФІ енісаміуму йодиду  
методом ВЕРХ**

Параметри придатності хроматографічної системи	Вимоги	Отримані значення
Відносне стандартне відхилення, розраховане для другого основного піка з хроматограм розчину порівняння	не більше 0,35 %	0,08 %
Симетрія другого піка енісаміуму йодиду	від 0,8 до 1,5	1,2
Число теоретичних тарілок для другого піка енісаміуму йодиду становить	не менше 3000	23542

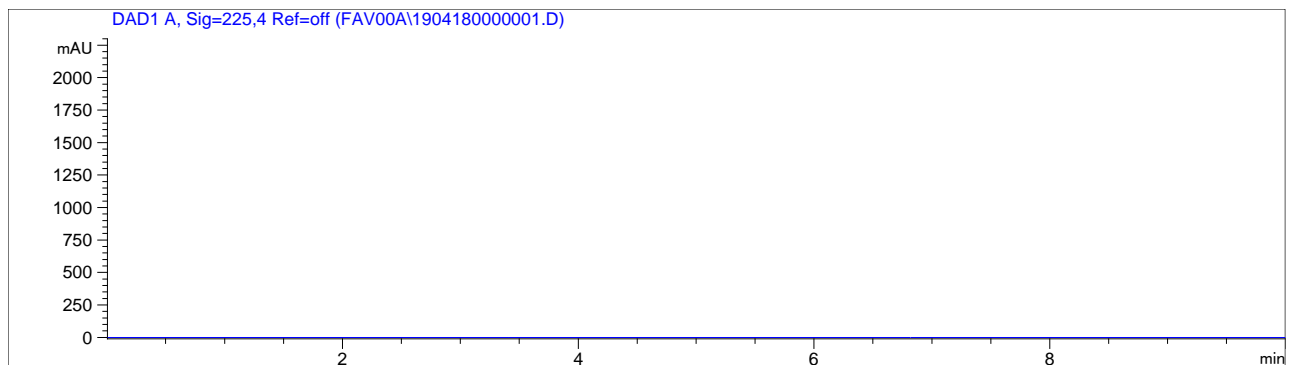


Рис. 3.17. Типова хроматограма рухомої фази, отримана в умовах кількісного визначення АФІ енісаміуму йодиду

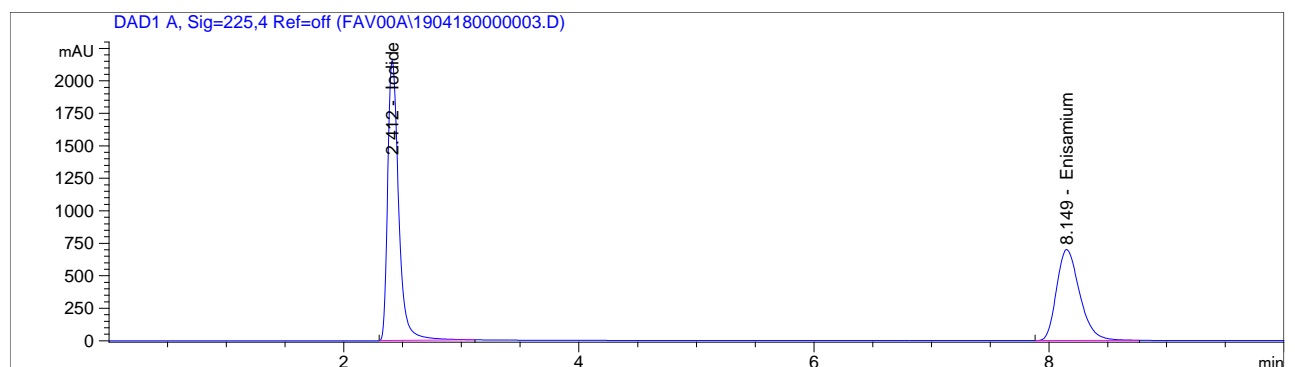


Рис. 3.18. Типова хроматограма розчину порівняння, отримана в умовах кількісного визначення АФІ енісаміуму йодиду

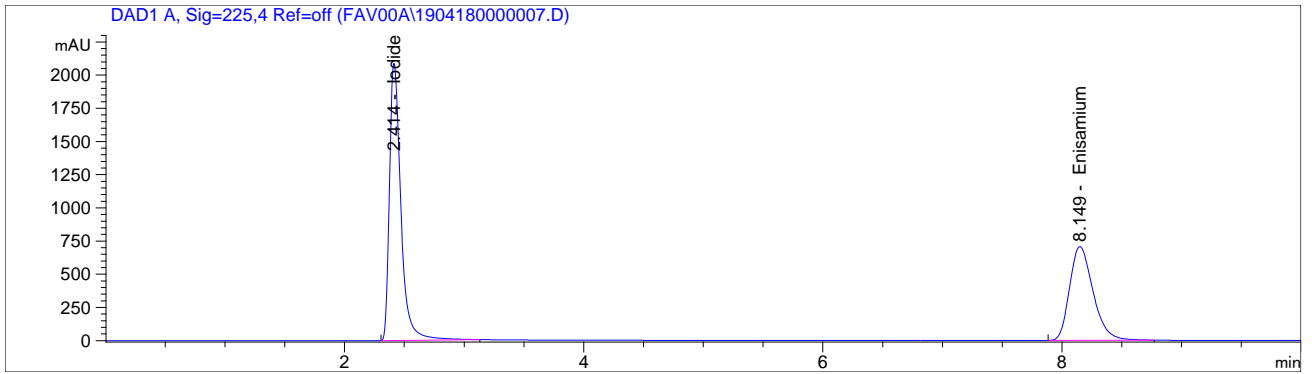


Рис. 3.19. Типова хроматограма випробовуваного розчину, отримана в умовах кількісного визначення АФІ енісаміуму йодиду

Вивчення лінійності аналітичної методики проводили на модельних сумішах, в яких концентрація енісаміуму йодиду лінійно змінювалася в діапазоні від 80 % до 120 % відносно номінальної концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині.

Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів [150]. Графік лінійної залежності наведено на рис. 3.20.

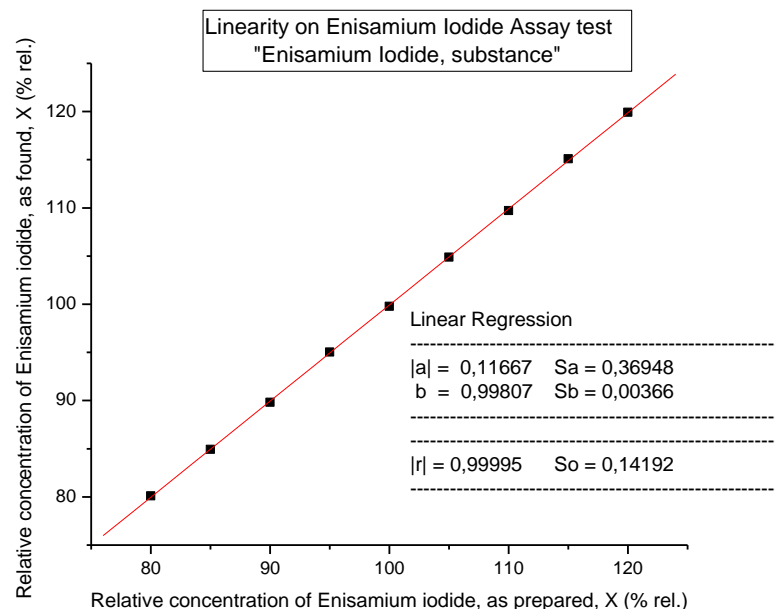


Рис. 3.20. Графік лінійної залежності площі другого піка енісаміуму від концентрації енісаміуму йодиду (в нормалізованих координатах)

Результати вивчення лінійності методики наведено в табл. 3.14. Як впливає із представлених даних, метрологічні характеристики лінійності відповідають вимогам прийнятності, які регламентовані ДФУ [151].

Таблиця 3.14

**Метрологічні характеристики лінійності методики кількісного визначення основного компонента в АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Параметр	Отримане значення	Критерій прийнятності
$b$	0,99807	–
$s_b$	0,00366	–
$ a $	0,11667	$\leq 2,6$
$s_a$	0,36948	–
$s_0$	0,14192	–
$s_0/b$	0,14219	$\leq 0,84$
$ r $	0,99995	$\geq 0,99981$

Результати аналізу модельних сумішей енісаміуму йодиду та їх статистична обробка наведено в табл. 3.15.

Прецизійність методики вивчали на рівнях збіжності та ВЛП.

Для оцінки збіжності готували та аналізували розчини порівняння та 6 випробовуваних розчинів з концентраціями діючої речовини на рівні 0,4 мг/мл. Розчини були приготовані із однієї і тієї ж серії АФІ.

ВЛП досліджували порівнюючи отримані дані з результатами, отриманими іншим аналітиком, який наступного дня аналізував додаткові розчини порівняння та випробовувані розчини.

Результати перевірки прецизійності аналітичної методики наведено в табл. 3.16.



**Результати аналізу модельних сумішей та їх статистична обробка в умовах  
кількісного визначення основного компонента в АФІ енісаміуму йодиду  
методом ВЕРХ**

Номер зразка	Концентрація енісаміуму йодиду		
	у модельній суміші відносно розчину порівняння, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100$	знайдено за площами піків, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 100$	знайдено у % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$
1	80,00	80,10	100,13
2	85,00	84,94	99,93
3	90,00	89,82	99,80
4	95,00	95,04	100,04
5	100,00	99,78	99,78
6	105,00	104,89	99,90
7	110,00	109,72	99,75
8	115,00	115,09	100,08
9	120,00	119,93	99,94
середнє, Z%			99,93
відносне стандартне відхилення, $RSD_z$ %			0,14
довірчий інтервал збіжності результатів $\Delta_z \% = t(95\%, 8) \times RSD_z = 1,8595 \times 0,14 =$			0,26
критичне значення для збіжності результатів $\Delta_z \% \leq \Delta_{As} (\Delta_{As} = 1,0 \%)$			виконується (0,26 < 1,0)
систематична похибка $\delta =  Z - 100 $			0,07
критерій незначущості систематичної похибки $\delta \leq 0,32 \times \Delta_{As}$			виконується (0,07 < 0,32)
загальний висновок щодо методики:			коректна

Таблиця 3.16

**Результати вивчення прецизійності методики кількісного визначення  
основного компонента в АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Розчин	Знайдено енісаміуму йодиду від введеного, %	
	1-й аналітик	2-й аналітик
1	100,1	100,0
2	99,8	99,8
3	100,2	100,2
4	100,1	100,1
5	100,3	99,6
6	100,4	100,1
середнє	100,1	100,0
RSD <sub>x</sub> , %	0,20	0,23
RSD ВЛП, %	0,23	
відносна різниця середніх значень, %	0,15	

Як видно із табл. 3.16, відносне стандартне відхилення (RSD) отриманих результатів для першого та другого аналітика, а також відносна різниця середніх значень результатів не перевищує 1,0 %, що свідчить про належну відтворюваність результатів.

При вивченні правильності запропонованої методики готували 3 серії модельних розчинів з концентрацією енісаміуму йодиду 80 %, 100 % та 120 % відносно концентрації енісаміуму йодиду у розчині порівняння в трьох повторюваностях для кожного концентраційного рівня. Результати визначення наведені в табл. 3.17.

Довірчий інтервал ( $\Delta Z$ ) становить 0,38 %, критерій статистичної незначущості ( $\delta$ ) – 0,13 %, критерій практичної незначущості ( $\delta$ ) – 0,48 %. Систематична похибка ( $\delta$ ) аналітичної методики становить 0,03 %.

Систематична похибка нижче критерію статистичної та практичної незначущості ( $0,03 < 0,13$ ;  $0,03 < 0,48$ ), тому можна стверджувати, що правильність аналітичної методики достатня.

Таблиця 3.17

**Результати вивчення правильності методики кількісного визначення  
основного компонента в АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Розчин	Концентрація енісаміуму йодиду			RSD ( $Z_i$ ), %
	введено, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100$	знайдено, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 100$	знайдено у % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$	
1	80,0	80,31	100,39	0,3
2	80,0	80,02	100,03	
3	80,0	79,81	99,76	
4	100,0	99,98	99,98	0,1
5	100,0	100,03	100,03	
6	100,0	100,12	100,12	
7	120,0	120,13	100,11	0,2
8	120,0	119,64	99,70	
9	120,0	120,16	100,13	
середнє значення			100,03	0,20

Робасність вивчали за стабільністю досліджуваних розчинів та надійністю хроматографічної методики.

Стабільність випробовуваного розчину та розчину порівняння вивчалася за зміною площ піків під час зберігання розчинів при температурі 25 °С. Було встановлено, що розчини порівняння та випробовувані розчини стабільні щонайменше протягом 24 год.

Надійність хроматографічної методики перевірялася за варіабельністю швидкості потоку рухомої фази, температури термостату колонки, складу

рухомої фази, рН буферного розчину та застосування альтернативної хроматографічної колонки (колонки з іншим серійним номером). Відповідно до цього проводили хроматографування розчину порівняння та випробовуваного розчину з подальшою оцінкою кількісного вмісту енісаміуму йодиду.

В табл. 3.18 наведено дані щодо робасності аналітичної методики.

Варіабельність результатів кількісного вмісту енісаміуму йодиду для кожної із умов у порівнянні до початкових умов становить не більше 1,0 %. Таким чином, аналітичну методику можна вважати робасною.

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки було проведено, виходячи з даних, що наведені в табл. 3.19.

Таблиця 3.18

**Результати вивчення робасності методики кількісного визначення основного компонента в АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Умови, що змінювались		Вміст енісаміуму йодиду в АФІ, %
1	2	3
Потік рухомої фази, в мл/хв	0,45	99,8
	0,50	100,2
	0,55	100,1
	RSD, %	0,21
Температура хроматографічної колонки, в °С	25	100,3
	30	100,1
	35	99,7
	RSD, %	0,31
Композиція рухомої фази: буферний розчин рН 2.5:вода:ацетонітрил (об/об/об)	28:44:28	100,0
	30:44:26	100,3
	32:44:24	99,9
	RSD, %	0,21

Продовж. табл. 3.18

1	2	3
рН буферного розчину	рН 2,4	99,7
	рН 2,5	100,2
	рН 2,6	100,1
	RSD, %	0,26
Серійний номер хроматографічної колонки	B16099	100,3
	USYT001583	99,8
	RSD, %	0,35

Таблиця 3.19

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки, що застосовується при кількісному визначенні основного компонента в АФІ енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Операція	Дані для розрахунку	Невизначеність, %
розчин порівняння		
Зважування СЗ	з точністю до $\pm 0,0002$ г	невизначеність зважування, при наважці 40 мг складає: $(0,2 \text{ мг}/40 \text{ мг} \times 100 = 0,5)$
Доведення об'єму розчину до 100,0 мл	колба на 100,0 мл	0,12
випробовуваний розчин		
Зважування випробовуваної субстанції	з точністю до $\pm 0,0002$ г	невизначеність зважування, при наважці 40 мг складає: $(0,2 \text{ мг}/40 \text{ мг} \times 100 = 0,5)$
Доведення об'єму розчину до 100,0 мл	колба на 100,0 мл	0,12

Розрахунок сумарної невизначеності для розчину порівняння:

$$\sqrt{0,5^2 + 0,12^2} = 0,51 \text{ \%}.$$

Розрахунок сумарної невизначеності для випробовуваного розчину:

$$\sqrt{0,5^2 + 0,12^2} = 0,51 \text{ \%}.$$

Сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить:

$$\Delta_{Sp} = \sqrt{0,51^2 + 0,51^2} = 0,72 \text{ \%}.$$

Прогноз загальної невизначеності аналізу  $\Delta_{As}$  проводили за співвідношенням (3.6), а  $\Delta_{FAO}$  за співвідношенням (3.7).

Таким чином, виходячи із даних RSD,  $\Delta_{FAO}$  становить:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \times \frac{0,35 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 0,83 \text{ \%}.$$

Тоді,  $\Delta_{As}$  складає  $\sqrt{0,72^2 + 0,83^2} = 1,1 \text{ \%} < 1,5 \text{ \%}$ .

Оскільки допустимі межі за кількісним визначенням субстанції становлять 98,5–101,5 %, то критерій загальної невизначеності аналізу ( $\Delta_{As}$ ) становить 1,5 %.

Прогноз загальної невизначеності аналізу  $\Delta_{As}$  не перевищує критичного значення (1,5 %), тому методика вважається коректною, та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною прецизійністю.

Таким чином, було розроблено та валідовано методику кількісного визначення енісаміуму йодиду в субстанції, використовуючи метод ВЕРХ [155]. Встановлено, що розроблена методика є коректною і відповідає вимогам ДФУ за специфічністю, правильністю, прецизійністю, робасністю в діапазоні концентрацій від 80 % до 120 % від номінального вмісту АФІ в субстанції.

Середні значення площ піків, що отримані при валідації методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в АФІ наведено в дод. Б.

### 3.4 Вивчення розчинності енісаміуму йодиду

Однією із важливих характеристик АФІ є його належність до певного класу БСК, яка була запропонована в 1995 році Amidon G. L. et al [156].

Для встановлення класу АФІ необхідні дані щодо проникності та розчинності АФІ в буферних розчинах з рН від 1,2 до 6,8.

У залежності від класу АФІ можна робити прогнози щодо його імовірного поведіння в організмі, наприклад, можна прогнозувати біодоступність.

У відповідності до БСК є чотири класи АФІ:

БСК клас I: «висока» розчинність – «висока» проникність

БСК клас II: «низька» розчинність – «висока» проникність

БСК клас III: «висока» розчинність – «низька» проникність

БСК клас IV: «низька» розчинність – «низька» проникність

У відповідності до БСК [157] АФІ вважається високорозчинним, якщо його максимальна разова доза розчиняється в менше ніж 250 мл буферного розчину з рН від 1,2 до 6,8 за 37 °С.

Щодо проникності, то, зазвичай, проникність вивчають на культурі клітин *Caco-2* [158–163].

У загальному, БСК достатньо вдалий спосіб характеристики АФІ щодо її розчинності та проникності [164–166].

Питання вивчення розчинності енісаміуму йодиду виникло у зв'язку із необхідністю класифікації АФІ відповідно до БСК.

Для встановлення концентрації розчиненої речовини, було застосовано метод ВЕРХ.

В табл. 3.20 наведено результати вивчення розчинності енісаміуму йодиду в мг/мл у чотирьох буферних розчинах для двох температурних режимів.

Графічне зображення розчинності субстанції енісаміуму йодиду наведено на рис. 3.21.

### Результати вивчення розчинності енісаміуму йодиду методом ВЕРХ

Серія	Розчинність АФІ, в мг/мл							
	рН 1,2		рН 4,5		рН 6,8		рН 7,5	
	25 °С	37 °С	25 °С	37 °С	25 °С	37 °С	25 °С	37 °С
170215	63,2	151,5	59,7	132,2	60,8	131,3	58,9	126,7
180215	63,5	155,0	59,3	132,7	59,5	128,0	59,2	129,9
190315	63,2	154,7	60,9	135,5	60,2	131,4	59,1	125,8
Середнє	63,3	153,7	60,0	133,5	60,2	130,3	59,1	127,5
RSD, %	0,22	1,26	1,34	1,32	1,07	1,47	0,27	1,70

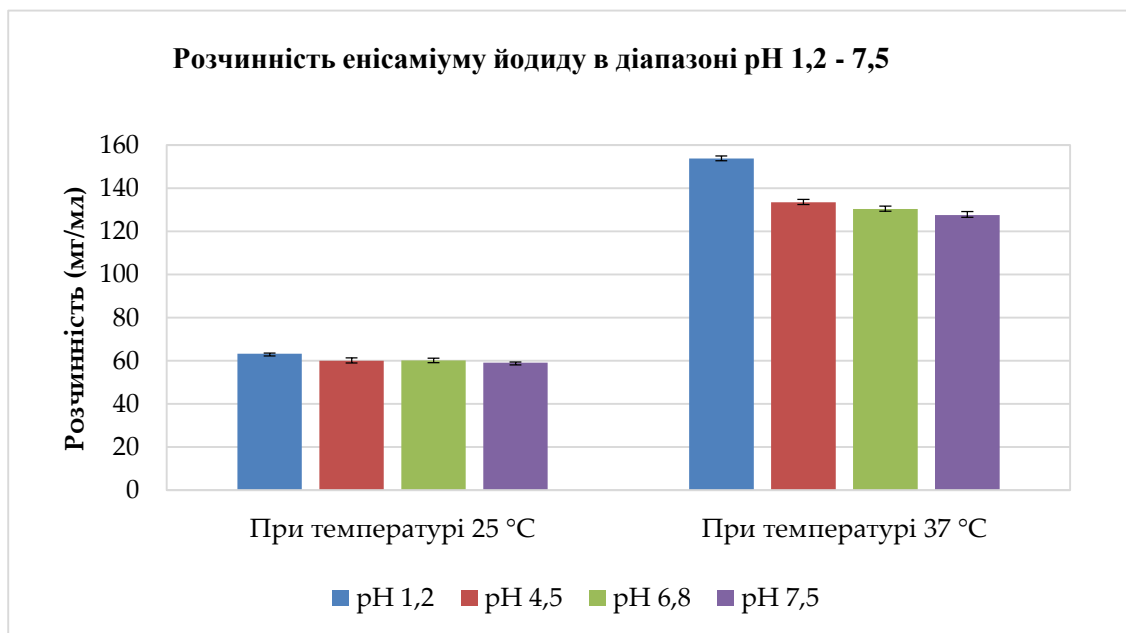


Рис. 3.21. Середні значення розчинності енісаміуму йодиду в чотирьох різних буферних розчинах за різних температур



Розчинність енісаміуму йодиду при 25 °С становить близько 60 мг/мл у всіх чотирьох буферних розчинах, а при 37 °С – від 130 мг/мл до 150 мг/мл, в залежності від значення рН буферного розчину. Оскільки вища разова доза субстанції становить 1 г, то мінімальна розчинність субстанції для її класифікації, як високорозчинної, у відповідності до БСК має бути не менше 4 мг/мл (1000 мг має розчинитися в 250 мл кожного буферного розчину). Таким чином, у відповідності до класифікації БСК субстанція енісаміум йодид має високу розчинність.

ВЕРХ-методика вивчення розчинності АФІ енісаміуму йодиду наведена у розділі 2 дисертаційної роботи. АФІ енісаміуму йодиду має високу розчинність та низьку проникність, у зв'язку з чим віднесений до III класу БСК [167].

## ВИСНОВКИ

1. Визначено, що можливими домішками енісаміуму йодиду є бензиламін, ізонікотинова кислота, бензиламід ізонікотинової кислоти та неідентифіковані домішки; встановлено нормування вмісту даних домішок у відповідності до діючих вимог фармацевтичної регуляції.

2. Розроблено ВЕРХ-методику одночасного визначення домішок (бензиламіну, ізонікотинової кислоти, бензиламиду ізонікотинової кислоти та неідентифікованих домішок) із застосуванням йон-парного реагента (натрій октан-1-сульфонат моногідрат) в рухомій фазі.

3. В розробленій методиці вибрано хроматографічну колонку Zorbax Eclipse XDB – C18 розміром 150 x 4,6 мм, що заповнена сорбентом октадецилсилільним, з розміром часток 5 мкм та застосовано дві довжини детектування: 205 нм і 265 нм. Швидкість потоку рухомої фази – 0,5 мл/хв. Температура термостату хроматографічної колонки – 30 °С, об'єм інжекції – 20 мкл.

4. Проведено стресові дослідження зразка енісаміуму йодиду в умовах розробленої методики, та підтверджено специфічність методики стосовно

визначення супровідних домішок; проведено валідацію запропонованої методики.

5. Методику визначення супровідних домішок адаптовано під завдання кількісного визначення АФІ, у зв'язку з чим встановлено додаткові вимоги щодо придатності хроматографічної системи (стосовно відносного стандартного відхилення площ піків, симетрії та числа теоретичних тарілок для піка енісаміуму). При адаптації методики визначено оптимальну концентрацію розчинів – 0,3 мг/мл, довжина хвилі детектування – 225 нм, а об'єм інжекції – 10 мкл.

6. Розроблено ВЕРХ-методику визначення енісаміуму йодиду в буферних розчинах, що застосовуються для вивчення розчинності у відповідності до БСК системи. Із застосуванням ВЕРХ-методики визначено, що енісаміум йодид має високу розчинність у відповідності до БСК, та відноситься до III класу БСК.

За матеріалами розділу опубліковано роботи [167, 154, 153, 155].

## РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ТАБЛЕТОК  
ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ

У відповідності до вимог української та міжнародної регуляторної документації у фармацевтичній галузі якість продукту має забезпечуватися не тільки на рівні контролю АФІ, але і ГЛФ. Наявні методики контролю якості не дозволяють забезпечити регуляторні вимоги. Наприклад, для забезпечення чутливості методики визначення супровідних домішок є необхідність заміни ТШХ методики на методику ВЕРХ. Крім того, валідація має бути проведена за такими характеристиками як: специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, діапазон застосування, робасність. У наведеному розділі описано хід розробки та валідація таких аналітичних методик як кількісне визначення, визначення супровідних домішок, вивчення розчинення та методика вивчення профілів розчинення. Детальний опис методик наведений у розд. 2.

## 4.1 Розробка та валідація методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках

При розробці методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках керувалися методикою визначення супровідних домішок субстанції енісаміуму йодиду [168]. Методика кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках описана у розд. 2.

У відповідності до рекомендацій ІСН Q2R [125], аналітична методика має бути валідована за наступними характеристиками: специфічність, правильність, прецизійність, лінійність, діапазон застосування, робасність, ВЛП.

Для підтвердження специфічності методики було приготовано розчин ДР, що входять до складу препарату, та розчин основних домішок, які можуть бути присутніми, виходячи з результатів вивчення стабільності у ГЛФ, з подальшою оцінкою систематичної похибки ( $\delta_{\text{noise}}$ , %). Приготування розчину ДР проводили

подібно до приготування випробовуваного розчину. Дані щодо специфічності методики кількісного визначення енісаміуму йодиду наведено в табл. 4.1.

Таблиця 4.1

**Специфічність СФ методики кількісного визначення  
енісаміуму йодиду в таблетках**

Абсорбція плацебо ( $A_{\text{PLACEBO}}$ )	Абсорбція розчину домішок ГЛФ ( $A_{\text{IMPS}}$ )	Абсорбція розчину порівняння ( $A_{\text{RS}}$ )	Знайдене значення $\delta_{\text{noise}}$ , (у %): $\frac{A_{\text{PLACEBO}} + A_{\text{IMPS}}}{A_{\text{RS}}} \times 100$	Критерій прийнятності
0,0006	0,0001	0,4422	0,16	не більше 0,5 %

Із наведених даних випливає, що абсорбція ДР та домішок за довжини хвилі 267 нм є незначною і не перевищує критерій прийнятності [169]. Вивчення лінійності аналітичної методики проводили на модельних сумішах, в яких концентрація енісаміуму йодиду лінійно змінювалася в діапазоні від 80 % до 120 % (0,016–0,024 мг/мл). Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів [150]. Графік лінійної залежності наведено на рис. 4.1.

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності ДФУ [151] (табл. 4.2). Як видно з табл. 4.2, виконуються всі вимоги до параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики кількісного визначення енісаміуму йодиду підтверджується у всьому діапазоні концентрацій (80–120 %). Високе значення коефіцієнту кореляції  $|r| = 0,99998$  задовольняє вимоги критерію ( $\geq 0,99981$ ) і підтверджує лінійність залежності між значенням «введено» та «знайдено» (табл. 4.3). Із табл. 4.3 видно, що виконується критерій незначущості систематичної похибки методики – значення якої дорівнює 0,11, та є практично незначущою. Аналітична методика характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 80 до 120 %.

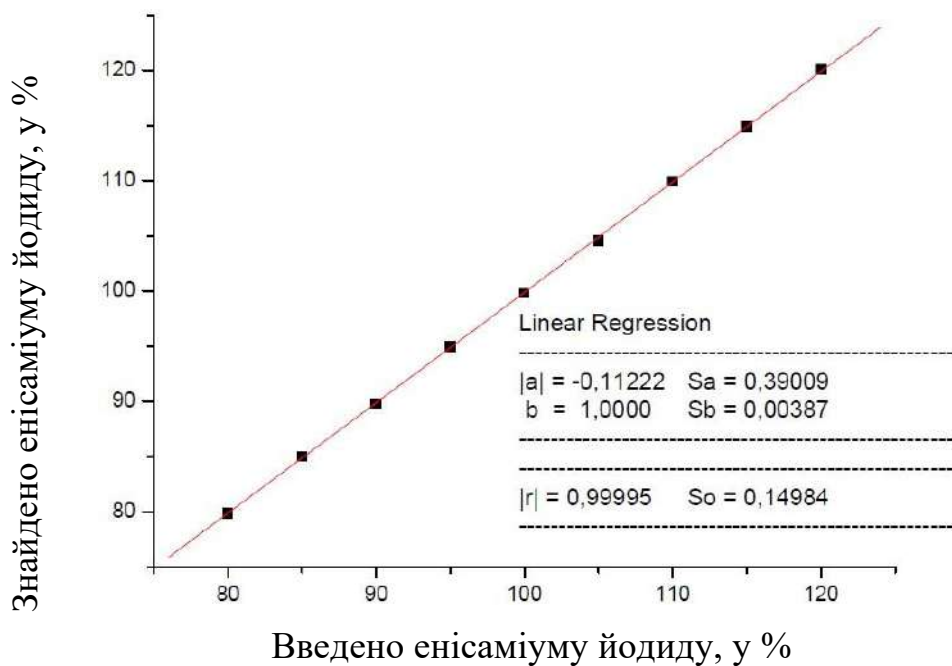


Рис. 4.1. Графік лінійної залежності абсорбції від концентрації енісаміуму йодиду (в нормалізованих координатах)

Таблиця 4.2

**Метрологічні характеристики лінійності СФ методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках**

Величина	Значення	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Висновки
b	1,0000	—	—
$s_b$	0,00378	—	—
a	0,11222	$\leq 2,6$	відповідає
$s_a$	0,39009	—	—
$s_0$	0,14984	—	—
$s_0/b$	0,14984	$\leq 0,84$	відповідає
r	0,99995	$\geq 0,99981$	відповідає

**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, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 100$	Знайдено у % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$
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
Середнє, Z%			99,89
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 $			0,11
$\delta \leq 0,32 \times \Delta_{As}$			(0,11 < 0,51)

Прецизійність вивчалася на двох рівнях: збіжність (повторюваність) та ВЛП.

Збіжність оцінювали, аналізуючи в умовах методики розчин порівняння та 6 випробовуваних розчинів, приготованих із однієї серії препарату, а ВЛП підтверджувалася іншим аналітиком, який аналізував таку ж кількість зразків тієї ж серії препарату наступного дня.

Результати перевірки точності аналітичної методики наведено в табл. 4.4.

Таблиця 4.4

**Результати перевірки точності методики визначення енісаміуму йодиду в  
таблетках методом СФ**

Номер зразка	Знайдений вміст енісаміуму йодиду (X), % від заявленого вмісту	
	1-й аналітик	2-й аналітик
1	100,3	100,7
2	99,9	100,1
3	99,7	100,4
4	100,4	100,3
5	100,3	99,9
6	100,5	100,5
середнє	100,2	100,3
RSD <sub>x</sub> , %	0,35	0,28
RSD ВЛП, %	0,31	
відносна різниця середніх значень, %	0,15	

Як видно з табл. 4.4, відносне стандартне відхилення (RSD) отриманих результатів для першого та другого аналітика, а також відносна різниця середніх значень результатів не перевищує 2,0 %, що свідчить про належну повторюваність результатів.

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).

Критерій загальної невизначеності аналізу ( $\Delta_{As}$ ) становить 1,6 %, оскільки допустимі межі за кількісним визначенням енісаміуму йодиду в ГЛФ становлять 95,0–105,0 %.

Довірчий інтервал ( $\Delta_Z$ ) становить 0,81 %, критерій статистичної незначущості ( $\delta$ ) – 0,27 %, критерій практичної незначущості ( $\delta$ ) – 0,51 %. Систематична похибка ( $\delta$ ) аналітичної методики становить 0,14 %.

Систематична похибка нижче критерію статистичної та практичної незначущості ( $0,14 < 0,27$ ;  $0,14 < 0,51$ ), тому можна стверджувати, що правильність аналітичної методики достатня.

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 %.

Отримані результати представлено в табл. 4.5.

Робасність аналітичної методики підтверджувалася, виходячи із даних зі стабільності випробовуваних розчинів та надійності методики вимірювання: зміна довжини хвилі детектування та варіювання складу компенсаційного розчину. Експериментально встановлено, що випробовувані розчини стабільні протягом 48 год в разі їх зберіганні за кімнатної температури.

Також встановлено, що зміна довжини хвилі детектування (від 265 нм до 269 нм) та зміна компенсаційного розчину (0,09 та 0,11 М розчин хлористоводневої кислоти) не мають значного впливу на результати аналізу.

Відхилення співвідношень абсорбції розчину порівняння та випробовуваного розчину у всіх експериментах з перевірки робасності методики не перевищувало 1,0 %.

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки було проведено, виходячи з даних, що наведені в табл. 4.6.



**Результати вивчення правильності СФ методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках**

Номер зразка	Введено відносно концентрації розчину порівняння, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100$	Знайдено відносно абсорбції розчину порівняння, % $Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100$	Знайдено по відношенню до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$	RSD ( $Z_i$ ), %
1	80,0	80,65	100,82	0,4
2	80,0	80,52	100,65	
3	80,0	80,07	100,08	
4	100,0	99,82	99,82	0,5
5	100,0	100,63	100,63	
6	100,0	99,73	99,73	
7	120,0	120,00	100,00	0,2
8	120,0	119,82	99,85	
9	120,0	119,64	99,70	
Середнє значення за всіма концентраційними рівнями				0,44

Таблиця 4.6

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки, що застосовується при кількісному визначенні енісаміуму йодиду в таблетках методом СФ**

Операція	Дані для розрахунку	Невизначеність, у %
1	2	3
розчин порівняння		
Зважування СЗ	200 мг (з точністю до $\pm 0,0001$ г)	невизначеність зважування, при наважці 250 мг складає: (0,2 мг/250 мг $\times 100 = 0,08$ )
Доведення до об'єму 100 мл	100	0,12

Продовж. табл. 4.6

1	2	3
Відбір аліквоти піпеткою Мора	1,00	0,98
Доведення до об'єму мірної колби	100,0	0,12
випробовуваний розчин		
Доведення до об'єму 100 мл	100	0,12
Відбір аліквоти піпеткою Мора	1,00	0,98
Доведення до об'єму мірної колби	50,00	0,17
Відбір аліквоти піпеткою Мора	5,00	0,6
Доведення до об'єму мірної колби	50,00	0,17

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для розчину порівняння:  

$$\Delta Sp = \sqrt{0,08^2 + 0,12^2 + 0,98^2 + 0,12^2} = 1,00 \%$$

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для випробовуваного розчину становить:  

$$\Delta Sp = \sqrt{0,12^2 + 0,98^2 + 0,17^2 + 0,6^2 + 0,17^2} = 1,18 \%$$

Сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить:  

$$\sqrt{1,00^2 + 1,18^2} = 1,55 \%$$

Невизначеність пробопідготовки перевищує допустимий рівень, оскільки прийнятний рівень становить,  $0,32 \times \Delta_{As} = 0,32 \times 1,6 = 0,51 \%$  ( $1,55 > 0,51$ ).

У відповідності до вимог ДФУ, у випадку, коли не виконується наведене вище співвідношення, то використовують критерій незначущості цієї систематичної похибки в порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу [151].

Прогноз загальної невизначеності аналізу  $\Delta_{As}$  проводили за співвідношенням (3.6), яке наведено в розділі 3 дисертаційної роботи.

$\Delta_{FAO}$  розраховується за формулою:

$$\Delta_{FAO} = 2 \cdot S_{sp} , \quad (4.1)$$

При розрахунку повної невизначеності аналізу необхідно використовувати максимально допустимі величини  $S_{sp}$ . У відповідності до характеристики спектрофотометра Specord 200 «Analytik Jena», Німеччина, величина  $S_{sp}$  не перевищує 0,20 %:  $\Delta_{FAO} = 2 \cdot 0,2 = 0,40$ , тоді,  $\Delta_{As}$  складає  $\sqrt{1,55^2 + 0,40^2} = 1,6 \% = 1,60 \%$ .

Таким чином, методика коректна та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною точністю.

Середні значення абсорбції, що отримані при валідації методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках наведено в дод. В.

#### 4.2 Розробка та валідація методики визначення супровідних домішок у таблетках

У відповідності до діючих вимог фармацевтичної практики, контроль супровідних домішок має проводитися в ГЛФ, не зважаючи на те, що такий контроль забезпечується на рівні вхідного контролю АФІ. Валідацію аналітичної методики проведено у відповідності до ДФУ [126, 127, 134, 135]. Аналітична методика наведена в розд. 2.

Основою для розробки методики контролю супровідних домішок в таблетках енісаміуму йодиду була методика визначення супровідних домішок в АФІ [154]. У наведеному розділі описано валідацію методики контролю супровідних домішок в таблетках, де продемонстровано відповідність методики вимогам ІСН.

Діапазон застосування – це інтервал між мінімальною і максимальною концентраціями аналізованої речовини в розчині, для якої доведено, що аналітична методика має достатню прецизійність, правильність, лінійність, МВ та МКВ.

Для тесту «Супровідні домішки» визначено діапазон застосування 10 – 150 % для неідентифікованих та ідентифікованих домішок (бензиламіну, бензиламідів ізонікотинової кислоти та ізонікотинової кислоти) відносно гранично допустимого вмісту кожної домішки.

Перед початком проведення валідаційних робіт було проаналізовано розчин для перевірки придатності хроматографічної системи. В табл. 4.7 наведено результати щодо придатності хроматографічної системи.

*Таблиця 4.7*

**Дані, що підтверджують придатність хроматографічної системи при визначенні супровідних домішок у таблетках енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Параметр придатності хроматографічної системи	Критерій	Отримані значення
Відношення висоти піка БАІНК до сідлової точки має бути не менше 1,1 за довжини хвилі 205 нм	$\geq 1,1$	9,0
Число теоретичних тарілок, розраховане за піком бензиламіну має бути не менше 2500 за довжини хвилі 205 нм	$\geq 2500$	27225
Відношення висоти піка ізонікотинової кислоти до сідлової точки має бути не менше 1,5, за довжини хвилі 265 нм	$\geq 1,5$	7,0

Як видно із результатів, наведених у табл. 4.7, придатність хроматографічної системи виконується.

Для підтвердження специфічності методики проводили хроматографування наступних розчинів: рухома фаза, модельний розчин із плацебо таблеток, розчин порівняння (а), розчин порівняння (b), розчин порівняння (с), розчин порівняння (е), розчин порівняння (f) та випробовуваний розчин.

Хроматограма розчину плацебо та випробовуваного розчину наведені на рис. 4.2-4.3.

Оскільки на хроматограмах відсутня інтерференція піків визначуваних домішок (бензиламін, бензиламід ізонікотинової кислоти, ізонікотинова кислота) між собою, з піками енісаміуму йодиду, плацебо та із піками рухомої фази, то можна стверджувати, що методика є специфічною.

Лінійність аналітичної методики вивчено для ідентифікованих (бензиламін, бензиламід ізонікотинової кислоти, ізонікотинова кислота) та неідентифікованих домішок в діапазоні концентрацій 0,01–0,15 % відносно номінальної концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині.

Хроматографування модельних розчинів проводили, отримуючи по 3 паралельні хроматограми.

Графіки лінійної залежності площ піків від концентрації компонентів наведені на рис. 4.4.

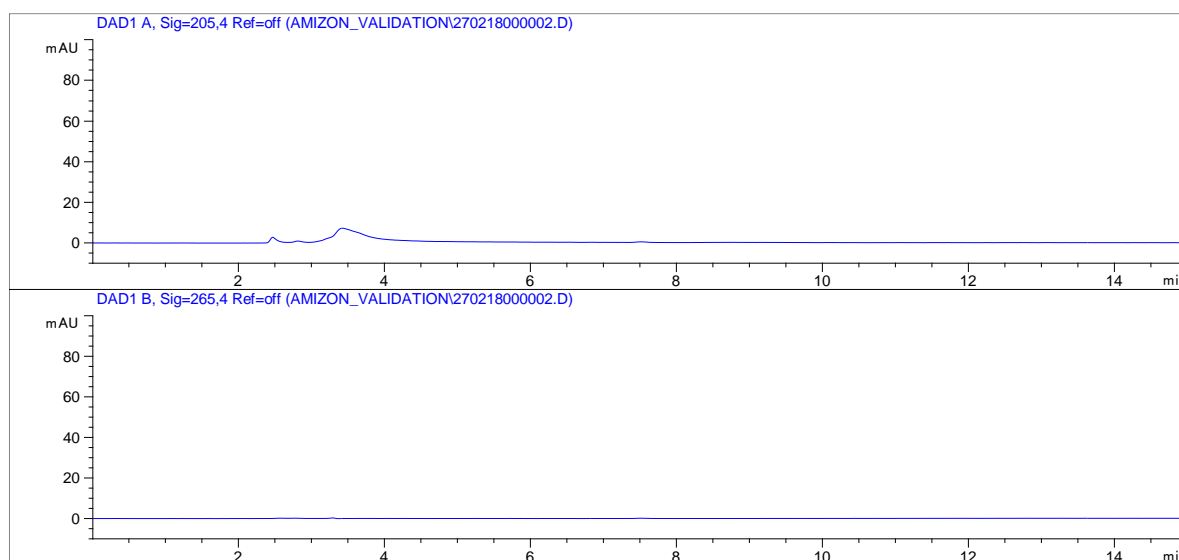


Рис. 4.2. Хроматограми розчину плацебо

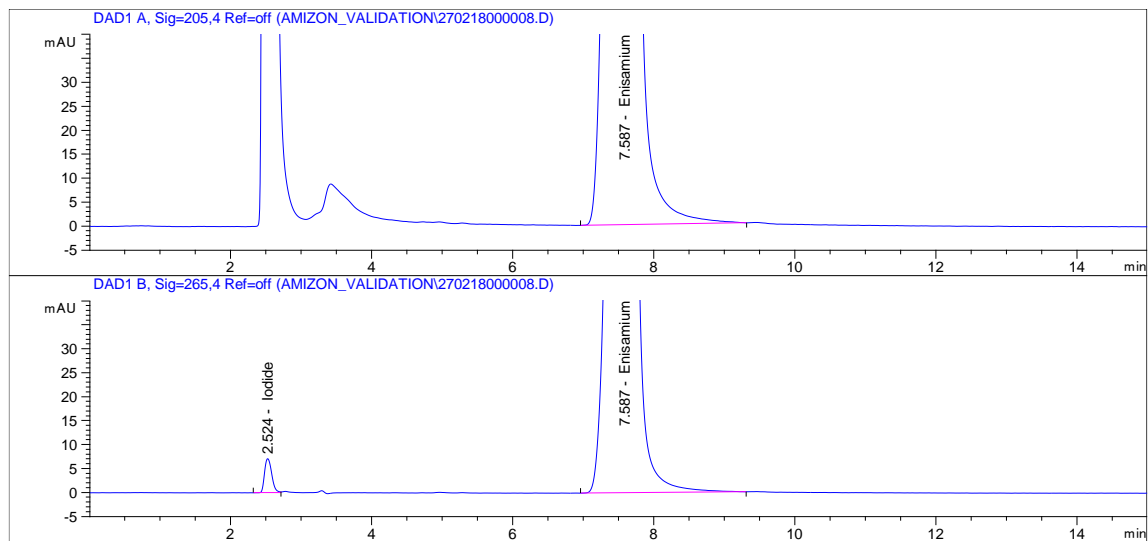


Рис. 4.3. Хроматограми випробовуваного розчину (при 205 нм та 265 нм)

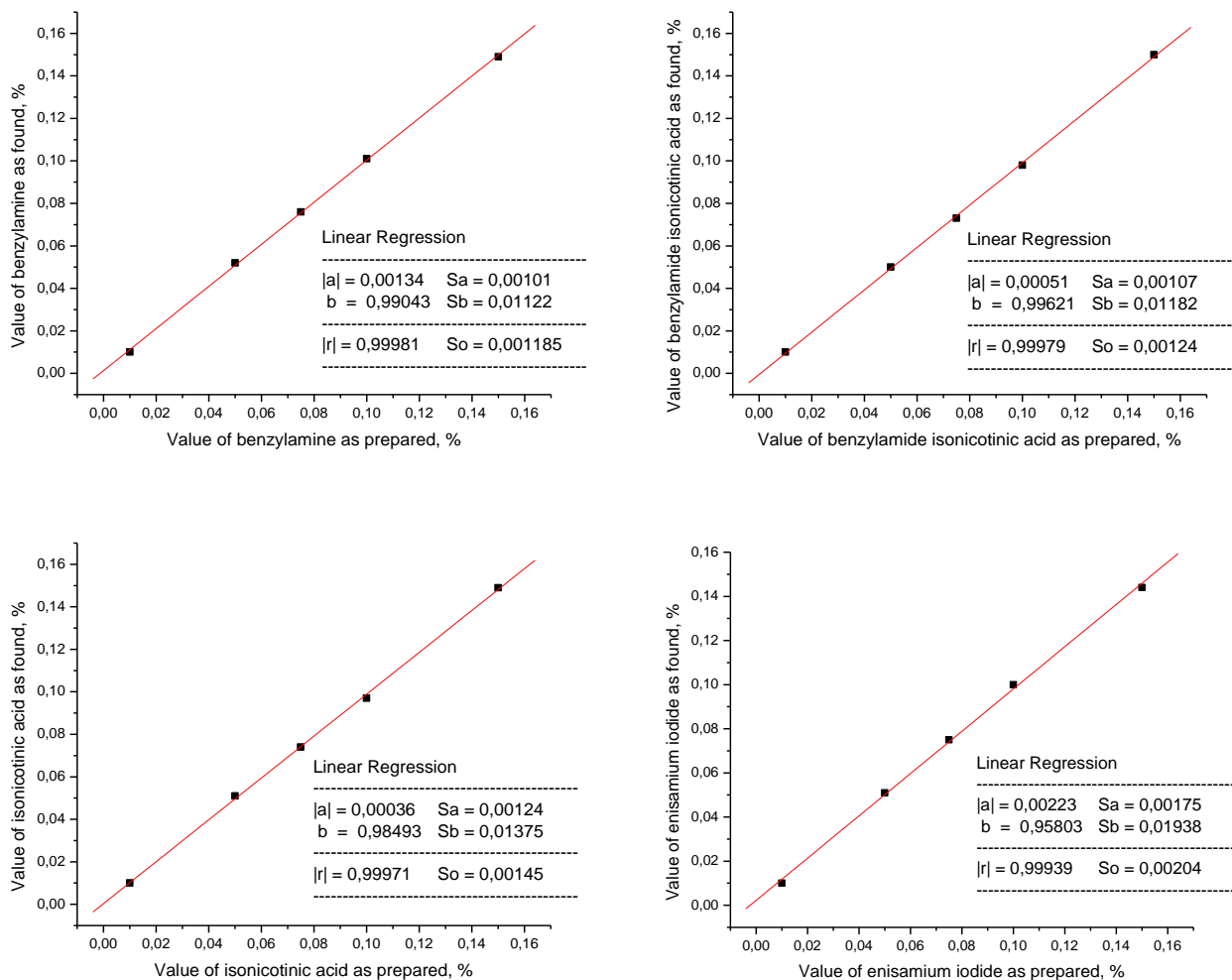


Рис. 4.4. Графіки лінійної залежності площі піків від концентрації аналітів (бензиламіну, бензиламиду ізонікотинової кислоти, ізонікотинової кислоти, енісаміуму йодиду)

Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів [150]. Отримані дані наведено в табл. 4.8.

Таблиця 4.8

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

Величина	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Отримані значення			
		Бензиламін	Ізонікотинова кислота	БАІНК	Енісаміум
$b$	–	0,99043	0,98493	0,99621	0,95803
$s_b$	–	0,01122	0,01375	0,01182	0,01938
$ a $	$\leq 5,0$	0,00134	0,00036	0,00051	0,00223
$s_a$	–	0,00101	0,00124	0,00107	0,00175
$s_0$	–	0,001185	0,00145	0,00124	0,00204
$s_0/b$	–	0,00120	0,00147	0,00124	0,00213
$ r $	$\geq 0,990$	0,99981	0,99971	0,99979	0,99939

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності, що регламентовані ДФУ [151]. Високі значення коефіцієнтів кореляції підтверджують лінійність залежності між «введеною» та «знайденою» кількістю введеної домішки. Вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої не перевищує 5,0.

Дані табл. 4.9 свідчать, що для домішок бензиламін, бензиламід ізонікотинової кислоти, ізонікотинова кислота, та власне енісаміуму йодиду методика аналізу характеризується достатньою прецизійністю. Знайдені значення відносного довірчого інтервалу величини  $Z$  менше критичного значення для збіжності результатів та не перевищують 5,0 %. Довірчий інтервал збіжності результатів не перевищує 5,0 %. Похибка  $\delta$  методики для визначення кожної домішки не перевищує 1,6 %.

**Результати аналізу модельних сумішей та їх статистична обробка  
в умовах визначення супровідних домішок в таблетках  
енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Концентрація аналітів								
у модельній суміші, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 0,05$	знайдено за площами піків, у % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 0,100$				знайдено у % до введенного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$			
	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ
0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	100,0	100,0	100,0	100,0
0,050	0,052	0,051	0,050	0,051	104,0	102,0	100,0	102,0
0,075	0,076	0,074	0,073	0,075	101,3	98,7	97,3	100,0
0,010	0,101	0,097	0,098	0,100	101,0	97,0	98,0	100,0
0,150	0,149	0,149	0,150	0,144	99,3	99,3	100,0	96,0
середнє, Z%					101,1	99,4	99,1	99,6
відносне стандартне відхилення, $RSD_z$ %					1,78	1,84	1,32	2,20
$\Delta_z \% = t(95\%, 4) \times RSD_z$					3,79	3,92	2,82	4,69
$\Delta_z \% \leq \Delta_{As} (\Delta_{As} = 5,0 \%)$					3,79 < 5,0	3,92 < 5,0	2,82 < 5,0	4,69 < 5,0
систематична похибка $\delta =  Z - 100 $					1,1	0,6	0,9	0,4
$\delta \leq 0,32 \times \Delta_{As}$					1,3 < 1,6	1,0 < 1,6	1,1 < 1,6	0,4 < 1,6

МВ та МКВ ідентифікованих та неідентифікованих домішок було визначено за результатами лінійної регресії, використовуючи значення стандартного відхилення вільного члена лінійної залежності ( $S_a$ ) та кутового коефіцієнта для розрахованої регресійної прямої (b): МВ та МКВ для визначуваних компонентів наведені в табл. 4.10.



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

Домішка	МВ, %	МКВ, %
Бензиламін	0,003	0,010
Ізонікотинова кислота	0,004	0,013
Бензиламід ізонікотинової кислоти	0,004	0,011
Неідентифіковані домішки (за піком енісаміуму)	0,006	0,018

Знайдена МКВ для ідентифікованих та неідентифікованих домішок відповідає критерію прийнятності «не > 0,05 %» [152].

Правильність для ідентифікованих (бензиламін, бензиламід ізонікотинової кислоти, ізонікотинова кислота) та неідентифікованих домішок оцінювали, аналізуючи 9 модельних розчинів з концентрацією 0,05 % (3 повтори), 0,10 % (3 повтори) та 0,15 % (3 повтори) відносно номінальної концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині.

Відносне стандартне відхилення між результатами для одного концентраційного рівня для всіх визначуваних домішок становить не більше 5,0 %. Отримані результати наведено в табл. 4.11, з якої видно, що довірчий інтервал ( $\Delta_z$ ) становить 3,39 % для бензиламіну, 2,69 % для ізонікотинової кислоти, 3,75 % для бензиламіду ізонікотинової кислоти та 4,77 % для неідентифікованої домішки. Критерій статистичної незначущості ( $\delta$ ) становить 1,13 % для бензиламіну, 0,90 % для ізонікотинової кислоти, 1,25 % для бензиламіду ізонікотинової кислоти та 1,59 % для неідентифікованої домішки. Критерій практичної незначущості ( $\delta$ ) для всіх домішок становить 1,6 %. Систематична похибка ( $\delta$ ) аналітичної методики становить 0,60 % для бензиламіну, 0,89 % для ізонікотинової кислоти, 0,00 % для бензиламіду ізонікотинової кислоти та 0,22 % для неідентифікованої домішки.

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

Концентрація аналітів								
у модельній суміші, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 0,05$	знайдено, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 0,10$				знайдено у % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$			
	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ
0,050	0,030	0,030	0,031	0,031	100,0	100,0	103,3	103,3
0,05	0,052	0,051	0,049	0,051	104,0	102,0	98,0	102,0
0,05	0,049	0,050	0,049	0,048	98,0	100,0	98,0	96,0
0,05	0,050	0,051	0,051	0,051	100,0	102,0	102,0	102,0
0,10	0,100	0,098	0,100	0,101	100,0	98,0	100,0	101,0
0,10	0,102	0,103	0,102	0,102	102,0	103,0	102,0	102,0
0,10	0,102	0,101	0,098	0,097	102,0	101,0	98,0	97,0
0,15	0,148	0,151	0,150	0,147	98,7	100,7	100,0	98,0
0,15	0,151	0,152	0,148	0,151	100,7	101,3	98,7	100,7
RSD (Z <sub>i</sub> ), % (для рівня 0,03 %)					3,04	1,15	2,32	3,47
RSD (Z <sub>i</sub> ), % (для рівня 0,05 %)					1,15	2,50	2,01	2,65
RSD (Z <sub>i</sub> ), % (для рівня 0,06 %)					1,16	2,13	1,02	1,41
RSD між значеннями всіх рівнів (Z <sub>i</sub> ), %					1,93	1,86	1,69	2,34

Систематична похибка при визначенні всіх домішок становить нижче критерію статистичної та практичної незначущості ( $< 5,0 \%$ ), тому можна стверджувати, що правильність аналітичної методики достатня.

Правильність аналітичної методики знаходиться в межах критерію 95,0–105,0 %. Прецизійність вивчена на рівні збіжності та ВЛП. Для оцінки збіжності готували та аналізували 6 модельних сумішей, в яких були присутні ідентифіковані домішки в концентрації 0,10 % відносно концентрації субстанції у випробовуваному розчині (на максимально допустимому рівні домішок в присутності енісаміуму йодиду в концентрації 0,4 мг/мл) та 6 модельних розчинів енісаміуму йодиду в концентрації 0,10 % відносно концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині.

ВЛП підтверджували у порівнянні результатів з іншим аналітиком, аналізуючи 12 додаткових модельних сумішей наступного дня (6 модельних сумішей визначуваних домішок та 6 модельних розчинів енісаміуму йодиду).

Результати перевірки прецизійності аналітичної методики наведено в табл. 4.12.

Робасність вивчали за стабільністю досліджуваних розчинів та надійністю хроматографічної методики.

Стабільність випробовуваних розчинів вивчалася за зміною площ піків під час зберігання розчинів за температури 25 °С. Результати вивчення стабільності розчинів наведено в табл. 4.13.

Експериментально встановлено, що випробовувані розчини стабільні протягом 48 год при їх зберіганні за температури не вище 25 °С. Підтверджена стабільність випробовуваного розчину та встановлено, що на хроматограмі випробовуваного розчину не спостерігалось утворення піків домішок при його зберіганні за температури 25 °С протягом 48 год. Після зберігання розчину для перевірки придатності хроматографічної системи протягом 48 год підтверджена можливість оцінки придатності хроматографічної системи.

Таблиця 4.12

**Результати перевірки прецизійності методики визначення супровідних  
домішок у таблетках енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Аналітик	Знайдений вміст, %				
	номер зразка	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміум йодид
Перший	1	0,100	0,098	0,100	0,101
	2	0,102	0,099	0,099	0,099
	3	0,100	0,101	0,103	0,098
	4	0,099	0,098	0,102	0,102
	5	0,101	0,102	0,098	0,099
	6	0,102	0,103	0,102	0,102
	середнє значення	0,101	0,100	0,101	0,100
	RSD <sub>x</sub> , %	1,20	2,13	1,95	1,72
Другий	1	0,097	0,101	0,099	0,099
	2	0,103	0,102	0,098	0,097
	3	0,101	0,099	0,100	0,102
	4	0,098	0,097	0,102	0,101
	5	0,102	0,103	0,099	0,101
	6	0,099	0,101	0,101	0,103
	середнє значення	0,100	0,101	0,100	0,101
	RSD <sub>x</sub> , %	2,37	2,16	1,47	2,16
–	RSD ВЛП, %	1,82	2,05	1,71	1,87
–	відносна різниця середніх значень	0,001	0,001	0,001	0,001

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

Часова точка, в год	Кінцевий розчин порівняння				Модельна суміш, що містить 0,10 % енісаміуму йодиду в порівнянні до концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині
	площі піків, mAU×min				площа піка, mAU×min
	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміум	Енісаміум
0	33,2	20,1	38,2	38509	40,1
6	32,5	20,5	38	38485	39,8
12	32,8	20,4	37,6	38410	38,8
24	32,7	20,0	37,4	38425	39,7
48	32	19,9	38,2	38490	38,4
RSD, %	1,35	1,28	0,96	0,11	1,84

Надійність хроматографічної методики перевірялася за варіабельністю швидкості потоку рухомої фази, температури термостату колонки, складу рухомої фази, рН буферного розчину та застосування альтернативної хроматографічної колонки (колонки з іншим серійним номером). Відповідно до цього проводили хроматографування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи, розчину порівняння, модельної суміші, що містила по 0,10 % кожної домішки та модельну суміш енісаміуму йодиду 0,10 % (відсоткові значення відносно концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині) з подальшою оцінкою вмісту речовин.

В табл. 4.14 наведено дані щодо вивчення робастності аналітичної методики.

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

Умови, що змінюються		Вміст домішок у модельній суміші (теоретичний вміст 0,10 % кожної)			Вміст енісаміуму у модельній суміші (теоретичний вміст 0,10 %)
		БА	ІНК	БАІНК	Енісаміум
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 °С	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
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	В16099	0,099	0,100	0,099	0,100
	USYT001583	0,101	0,098	0,101	0,099
	RSD, %	1,41	1,43	1,41	0,71

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

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки було проведено, виходячи з даних, що наведені в табл. 4.15.

Таблиця 4.15

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки, що застосовується при визначенні супровідних домішок у таблетках енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Операція пробопідготовки	Дані для розрахунку	Невизначеність, %
розчин порівняння (по БАІНК, як найбільш критичний)		
Зважування СЗ	з точністю до $\pm 0,0002$ г	$(0,2 \text{ мг} / 10 \text{ мг}) \cdot 100 = 2,00$
Доведення до об'єму 100,0 мл	100,0 мл (3 колби)	0,12; 0,12; 0,12
Відбір аліквоти піпеткою	10,00 мл	0,5
Відбір аліквоти піпеткою (проміжних розчинів домішок)	0,50 мл	1,00
випробовуваний розчин		
Зважування випробовуваної субстанції	з точністю до $\pm 0,0002$ г	$(0,2 \text{ мг} / 496 \text{ мг}) \cdot 100 = 0,04$
Доведення до об'єму 100,0 мл	10,00 мл (2 колби)	0,12; 0,12
Відбір аліквоти піпеткою	10,00 мл	0,5

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для розчину порівняння:

$$\Delta Sp = \sqrt{2,00^2 + 0,12^2 + 0,5^2 + 0,12^2 + 1,00^2 + 0,12^2} = 2,30 \%$$

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для випробовуваного розчину:

$$Sp = \sqrt{0,04^2 + 0,12^2 + 0,5^2 + 0,12^2} = 0,53 \%$$

Сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить:  
 $\sqrt{2,30^2 + 0,53^2} = 2,36 \%$ .

Прогнозована невизначеність пробопідготовки значна у порівнянні з повною невизначеністю методики, оскільки вона перевищує граничне значення  $0,32 \times \Delta_{As} = 0,32 \times 5 \approx 1,6 \%$ .

Невизначеність кінцевої аналітичної операції ( $\Delta_{FAO}$ ) та повна невизначеність результатів аналізу ( $\Delta_{As}$ ).

Прогноз загальної невизначеності аналізу  $\Delta_{As}$  проводили за формулою (3.6),  $\Delta_{FAO}$  розраховували за формулою (3.7) (розд. 3).

Таким чином, виходячи із даних RSD,  $\Delta_{FAO}$  становить:  
 $\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \cdot \frac{1,8 \cdot 2,92}{\sqrt{3}} = 4,29\%$ . Тоді,  $\Delta_{As}$  складає  $\Delta_{As} = \sqrt{2,36^2 + 4,29^2} = 4,90 < 5,0\%$ .

Таким чином, методика коректна та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною точністю.

#### 4.3 Розробка та валідація методики контролю якості таблеток за показником «Розчинення»

Валідацію аналітичної методики було проведено у відповідності до рекомендацій ІСН [125].

Для підтвердження специфічності методики було приготовано розчин ДР, що входять до складу препарату та розчин основних домішок, які можуть бути присутніми, виходячи з результатів вивчення стабільності у ГЛФ, з подальшою оцінкою систематичної похибки ( $\delta_{\text{noise}}$ , %).

Дані щодо специфічності методики визначення енісаміуму йодиду при вивченні показника «Розчинення» наведено в табл. 4.16. Із наведених даних випливає, що абсорбція ДР та домішок за довжини хвилі 267 нм є незначною і не перевищує критерій прийнятності (не більше 0,5 %).



**Специфічність СФ методики контролю таблеток енісаміуму йодиду за показником «Розчинення»**

Абсорбція плацебо ( $A_{\text{PLACEBO}}$ )	Абсорбція розчину домішок ГЛФ ( $A_{\text{IMPS}}$ )	Абсорбція розчину порівняння ( $A_{\text{RS}}$ )	Знайдене значення $\delta_{\text{noise}}$ , (%): $\frac{A_{\text{PLACEBO}} + A_{\text{IMPS}}}{A_{\text{RS}}} \times 100$	Критерій прийнятності
0,0004	0,0001	0,4420	0,11	не більше 0,5 %

Вивчення лінійності проводили на модельних сумішах, в яких концентрація енісаміуму йодиду лінійно змінювалася в діапазоні від 50 % до 130 % відносно номінальної концентрації (0,02 мг/мл) енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині. Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів. Графік лінійної залежності наведено на рис. 4.5.

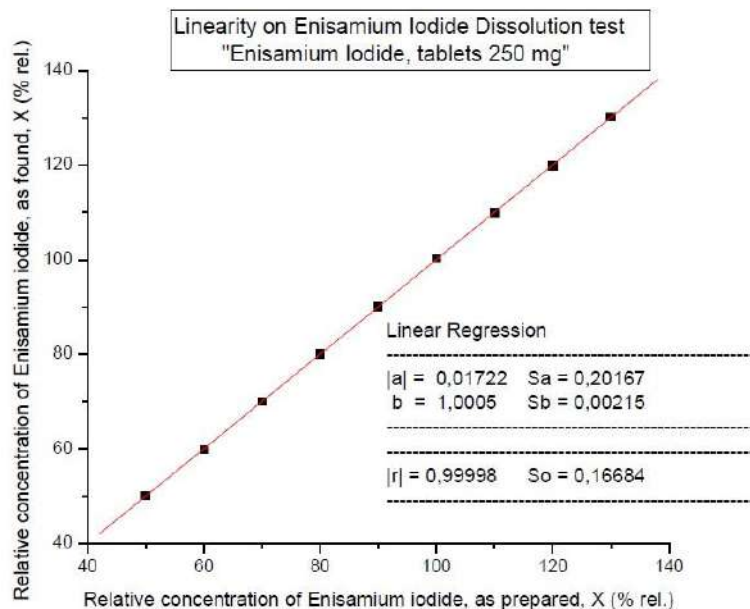


Рис. 4.5. Графік лінійної залежності абсорбції від концентрації енісаміуму йодиду

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності ДФУ [151], дані наведено в табл. 4.17.

Таблиця 4.17

**Метрологічні характеристики лінійності СФ методики контролю таблеток енісаміуму йодиду за показником «Розчинення»**

Величина	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Отримані значення
b	–	1,0005
s <sub>b</sub>	–	0,00215
a	≤ 5,0	0,01722
s <sub>a</sub>	–	0,20167
s <sub>0</sub>	–	0,16684
s <sub>0</sub> /b	–	0,16676
r	≥ 0,995	0,99998

Точність вивчена на рівні збіжності та ВЛП. Для оцінки збіжності готували та аналізували розчини порівняння та 6 випробовуваних розчинів з концентраціями енісаміуму йодиду на рівні 100 % його вивільнення з таблетки. Розчини були приготовані із однієї і тієї ж серії ГЛФ. ВЛП підтверджували у порівнянні з результатами другого аналітика (аналіз в інший день).

Як видно із табл. 4.18, відносне стандартне відхилення для отриманих результатів аналізу першого та другого аналітика, а також відносна різниця середніх значень результатів не перевищує 2,5 %, що свідчить про належну повторюваність результатів.

Для оцінки правильності було приготовано модельні розчини з концентрацією енісаміуму йодиду 50 % , 100 % та 130 % в трьох паралельних дослідах для кожного рівня концентрації (відносні відсотки до концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині). Отримані результати наведено в табл. 4.19.

**Результати перевірки точності СФ методики контролю таблеток  
енісаміуму йодиду за показником «Розчинення»**

Аналітик	Номер зразка	Знайдений вміст, %
Перший	1	99,7
	2	99,4
	3	99,8
	4	99,9
	5	100,8
	6	99,8
	середнє значення	99,9
	RSD <sub>x</sub> , %	0,5
Другий	1	99,5
	2	100,2
	3	100,1
	4	100,1
	5	99,7
	6	100,4
	середнє значення	100,0
	RSD <sub>x</sub> , %	0,3
—	RSD ВЛП, %	0,4
—	відносна різниця середніх значень	0,1

**Результати вивчення правильності СФ методики контролю таблеток  
енісаміуму йодиду за показником «Розчинення»**

Концентрація енісаміуму йодиду		
У модельній суміші, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100$	Знайдено, % $Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100$	Знайдено у % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$
50	50,06	100,11
50	50,26	100,52
50	49,78	99,57
100	100,59	100,59
100	100,16	100,16
100	99,86	99,86
130	129,04	99,26
130	129,67	99,75
130	130,19	100,15
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 50 %)		0,5
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 100 %)		0,4
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 130 %)		0,4
RSD між значеннями всіх рівнів ( $Z_i$ ), %		0,43

RSD між результатами для одного концентраційного рівня для енісаміуму становить не більше 2,0 %.

Правильність аналітичної методики знаходиться в межах критерію  $\pm 2\%$ .

Робасність аналітичної методики визначалася, виходячи із даних зі стабільності випробовуваних розчинів та надійності методики щодо зміни довжини хвилі детектування.

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) не має значного впливу на результати аналізу.

Відхилення співвідношень абсорбції розчину порівняння та випробовуваного розчину у всіх експериментах з вивчення робасності методики не перевищувало 1,0 %.

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки було проведено, виходячи з даних, що наведені в табл. 4.20.

Таблиця 4.20

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки, що застосовується при контролі таблеток енісаміуму йодиду за показником «Розчинення» методом СФ**

Операція	Дані для розрахунку	Невизначеність, %
розчин порівняння		
Зважування СЗ	200 мг (з точністю до $\pm 0,0001$ г)	невизначеність зважування, при наважці 100 мг складає: ( $0,2 \text{ мг}/100 \text{ мг} \times 100 = 0,2$ )
Доведення до об'єму 100 мл	100	0,12
Відбір аліквоти піпеткою	2,0	0,6
Доведення до об'єму мірної колби 100 мл	100	0,12
випробовуваний розчин		
Відмірювання об'єму середовища розчинення	мірний циліндр на 1000 мл	1,0
Відбір аліквоти піпеткою на 2 мл	2,0	0,6
Доведення до об'єму мірної колби	50	0,17

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для розчину порівняння:

$$\Delta Sp = \sqrt{0,2^2 + 0,12^2 + 0,6^2 + 0,12^2} = 0,65 \%$$

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta S_p$  для випробовуваного розчину становить:  $\Delta S_p = \sqrt{1,0^2 + 0,6^2 + 0,17^2} = 1,18 \%$ .

Сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить:  $\sqrt{0,65^2 + 1,18^2} = 1,35 \%$ .

Невизначеність пробопідготовки перевищує допустимий рівень, оскільки прийнятний рівень становить  $0,32 \times \Delta_{As} = 0,32 \times 3,0 = 0,96 \%$  ( $1,35 > 0,96$ ).

Прогноз загальної невизначеності аналізу  $\Delta_{As}$  проводили за формулою (3.6), яка наведена в розд. 3.  $\Delta_{FAO}$  розраховували за формулою (4.1), яка наведена в розд. 4.

При розрахунку повної невизначеності аналізу необхідно використовувати максимально допустимі величини  $S_{sp}$ . У відповідності до характеристики спектрофотометра Specord 200 «Analytik Jena», Німеччина, величина  $S_{sp}$  не перевищує 0,20 %:  $\Delta_{FAO} = 2 \cdot 0,2 = 0,40$ . Тоді,  $\Delta_{As}$  складає  $\sqrt{1,35^2 + 0,40^2} = 1,41 \%$   $< 3,0 \%$ . Таким чином, методика коректна та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною точністю.

#### 4.4 Розробка та валідація методики вивчення профілів вивільнення енісаміуму йодиду з таблеток

Одним із важливих напрямків характеристики твердих ЛФ є вивчення профілів розчинення. Такі дослідження проводяться як на етапі розробки ЛЗ, так і протягом його життєвого циклу. Також є необхідність перевірки профілів розчинення при внесенні змін до ГЛФ [170].

Визначення було проведено відповідно до вимог ДФУ [149] та ЄФ [171] за пунктами 2.9.3 та 2.2.29. Застосовано буферні розчини з рН 1,2; 4,5; 6,8, що приготовані згідно з ДФУ та ЄФ.

Об'єм середовища розчинення становив 900 мл, швидкість обертання лопаті 50 об/хв. Загальний час розчинення – 45 хв (з проміжними точками відбору).

За основу описаної методики була взята методика [154], що застосовується для визначення супровідних домішок енісаміуму йодиду. Було модифіковано склад рухомої фази з метою пришвидшення часу аналізу, також було модифіковано об'єм інжекції з метою запобігання розведення випробовуваного розчину під час виконання дослідження.

Підтверджено, що запропоновані умови хроматографування забезпечують селективність та достатньо короткий час хроматографування. Типова хроматограма розчину порівняння наведена на рис. 4.6.

Валідацію аналітичної методики було проведено у відповідності до рекомендацій ІСН [125].

Для підтвердження специфічності методики було приготовано розчин ДР, що входять до складу препарату, в результаті чого було підтверджено, що відсутня інтерференція піків визначуваного піка з піками ДР.

Вивчення лінійності аналітичної методики проводили на модельних сумішах, в яких концентрація енісаміуму йодиду лінійно змінювалася в діапазоні від 5 % до 130 % відносно номінальної концентрації (0,28 мг/мл) енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині.

Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів [150], дані наведено в табл. 4.21.

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності, що регламентовані ДФУ [151].

Точність вивчена на рівні збіжності та ВЛП.

Для оцінки збіжності готували та аналізували розчини порівняння та 6 випробовуваних розчинів з концентраціями діючої речовини на рівні 100 % вивільнення АФІ. Розчини були приготовані із однієї і тієї ж серії ГЛФ.

ВЛП підтверджували результатами другого аналітика, який наступного дня аналізував додаткові розчини порівняння та випробовувані розчини.

Результати перевірки точності аналітичної методики наведено в табл. 4.22.

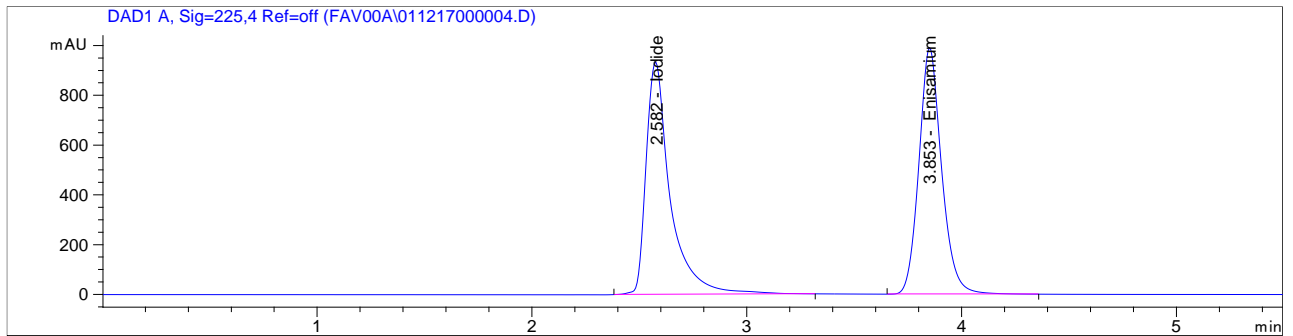


Рис. 4.6. Типова хроматограма розчину порівняння

Таблиця 4.21

**Метрологічні характеристики лінійності методики вивчення профілів розчинення таблеток енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Величина	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Отримані значення		
		pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
$b$	—	1,0002	0,9964	0,9953
$s_b$	—	0,00346	0,00162	0,00177
$ a $	$\leq 5,0$	0,27531	0,07551	0,21467
$s_a$	—	0,2727	0,1280	0,13297
$s_0$	—	0,35605	0,16707	0,18183
$s_0/b$	—	0,35598	0,16767	0,18269
$ r $	$\geq 0,995$	0,99998	0,99999	0,99999



**Результати вивчення точності методики дослідження профілів розчинення  
таблеток енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Аналітик	Знайдений вміст, %			
	номер зразка	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
Перший	1	99,7	99,3	98,8
	2	100,0	98,8	99,9
	3	103,2	99,3	99,2
	4	99,9	99,8	99,2
	5	99,9	99,6	99,1
	6	100,8	99,4	99,9
	середнє значення	100,6	99,4	99,4
	RSD <sub>x</sub> , %	1,3	0,3	0,5
Другий	1	100,1	98,5	99,0
	2	100,0	98,3	99,6
	3	99,9	98,7	99,7
	4	100,3	98,4	100,1
	5	100,0	97,6	100,5
	6	99,9	98,8	101,6
	середнє значення	100,0	98,4	100,1
	RSD <sub>x</sub> , %	0,2	0,4	0,9
–	RSD ВЛП, %	0,9	0,6	0,8
–	відносна різниця середніх значень	0,6	1,0	0,7

Як видно із табл. 4.22, відносне стандартне відхилення отриманих результатів аналізу першого та другого аналітика, а також відносна різниця середніх значень результатів не перевищує 2,0 %, що свідчить про належну повторюваність результатів.

Для оцінки правильності готували 3 групи модельних розчинів з концентрацією енісаміуму йодиду 5 %, 100 % та 130 % по відношенню до концентрації енісаміуму йодиду в розчині порівняння в трьох паралельних дослідах для кожного концентраційного рівня (в кожному середовищі розчинення). Отримані результати щодо правильності наведено в табл. 4.23.

Відносне стандартне відхилення між результатами для одного концентраційного рівня для енісаміуму становить не більше 2,0 %. Правильність аналітичної методики знаходиться в межах критерію 98,0–102,0 %. Робасність вивчали на основі даних зі стабільності досліджуваних розчинів та надійності хроматографічної методики. Стабільність випробовуваних розчинів вивчалася за зміною площ піків під час зберігання розчинів за температури 25 °С. Було встановлено, що розчини порівняння та випробовувані розчини стабільні щонайменше протягом 24 год.

Надійність хроматографічної методики перевірялася за варіабельністю швидкості потоку рухомої фази (0,45; 0,50; 0,55 мл/хв), температури термостату колонки (30; 25; 35 °С), складу рухомої фази (буферний розчин рН 2,5 – вода – ацетонітрил (30:35:35); (31:35:34); (29:35:36)), рН буферного розчину (2,5; 2,4; 2,6) та застосуванням альтернативної хроматографічної колонки (колонки з іншим серійним номером). Відповідно до цього проводили хроматографування розчинів порівняння та випробовуваних розчинів.

Варіабельність площ піків енісаміуму для кожної із умов у порівнянні до початкових умов становить не більше 2,0 %. Таким чином, аналітичну методику можна вважати робасною.

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки було проведено, виходячи з даних, що наведені в табл. 4.24.

**Результати вивчення правильності методики дослідження профілів  
розчинення таблеток енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Концентрація енісаміуму йодиду						
у модельній суміші відносно концентрації в розчині порівняння, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100$	знайдено за площами піків відносно концентрації в розчині порівняння, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 100$			знайдено у % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$		
	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
5	4,88	5,08	5,02	97,60	101,60	100,40
5	4,91	5,05	4,99	98,20	101,00	99,80
5	4,90	5,10	5,03	98,00	102,00	100,60
100	100,56	99,47	99,74	100,56	99,47	99,74
100	100,46	100,40	99,60	100,46	100,40	99,60
100	100,69	99,81	100,01	100,69	99,81	100,01
130	129,95	129,44	129,39	99,96	99,57	99,53
130	129,77	129,38	129,33	99,82	99,52	99,48
130	130,04	129,68	129,44	100,03	99,75	99,57
RSD (Z <sub>i</sub> ), % (для рівня 5 %)				0,3	0,5	0,4
RSD (Z <sub>i</sub> ), % (для рівня 100 %)				0,1	0,5	0,2
RSD (Z <sub>i</sub> ), % (для рівня 130 %)				0,1	0,1	0
RSD між значеннями всіх концентраційних рівнів (Z <sub>i</sub> ), %				1,2	1,0	0,4

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки методики дослідження профілів розчинення таблеток енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Операція	Дані для розрахунку	Невизначеність, %
розчин порівняння		
Зважування СЗ	з точністю до $\pm 0,0002$ г	при наважці 28 мг складає 0,71
Доведення об'єму розчину до 100,0 мл	колба на 100,0 мл	0,12
випробовуваний розчин		
Відмірювання об'єму середовища розчинення	мірний циліндр на 1000 мл	1,0

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для розчину порівняння:  
 $\Delta Sp = \sqrt{0,71^2 + 0,12^2} = 0,72$  %. Сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить:  $\sqrt{1,0^2 + 0,72^2} = 1,23$  %.

Невизначеність пробопідготовки перевищує допустимий рівень, оскільки прийнятний рівень становить  $0,32 \times \Delta_{As} = 0,32 \times 3,0 = 0,96$  % ( $1,23 > 0,96$ ).

У відповідності до вимог ДФУ [151], у випадку, коли не виконується наведено вище співвідношення, використовують критерій незначущості цієї систематичної похибки в порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу. Прогноз загальної невизначеності аналізу  $\Delta_{As}$  проводили за формулою (3.6),  $\Delta_{FAO}$  розраховували за формулою(3.7), (розд. 3).

Таким чином, виходячи із даних RSD,  $\Delta_{FAO}$  становить:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \times \frac{0,5 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 1,18 \text{ \%}. \text{ Тоді, } \Delta_{As} \text{ складає } \sqrt{1,23^2 + 1,18^2} = 1,70 \text{ \%} < 3,0 \text{ \%}.$$

Таким чином, аналітична методика вивчення профілів розчинення коректна та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною точністю.

Експериментальні дані вивчення профілів вивільнення енісаміуму йодиду із таблеток наведено на рис. 4.7–4.9.

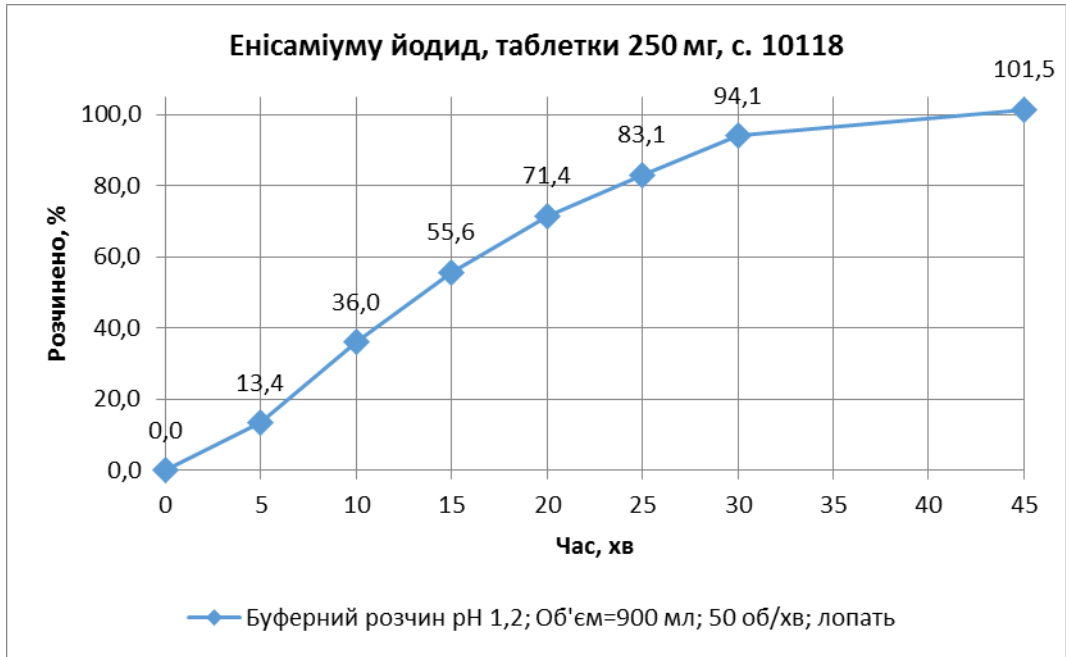


Рис. 4.7. Профілі вивільнення енісаміуму йодиду із таблеток в буферному розчині з рН 1,2

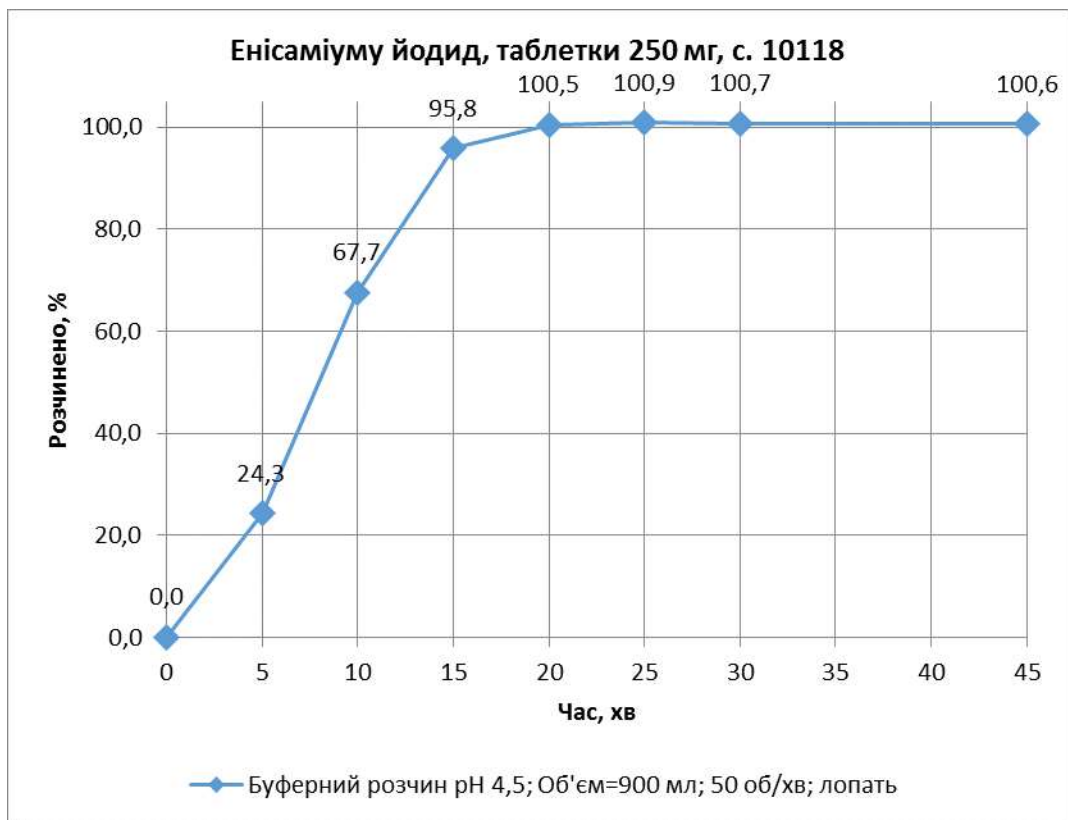


Рис. 4.8. Профілі розчинення енісаміуму йодиду із таблеток в буферному розчині з рН 4,5

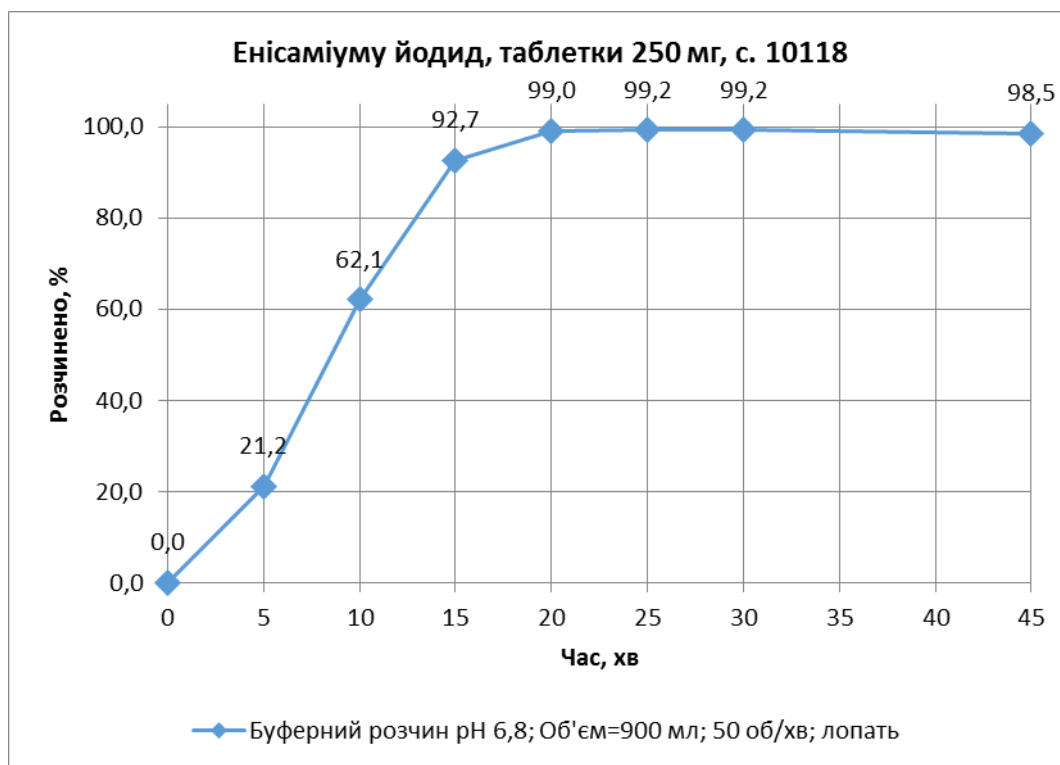


Рис. 4.9. Профілі розчинення енісаміуму йодиду із таблеток в буферному розчині з рН 6,8

Із профілів вивільнення можна зробити висновки, що відповідно до БСК таблетки енісаміуму йодиду не можна віднести до таких, що є швидко, або дуже швидко розчинними, оскільки в буферному розчині з рН 6,8 85 % вивільнення АФІ досягається лише після 25 хв [172].

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено СФ методику кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках; проведено валідацію розробленої методики. Коефіцієнт кореляції між введеним та знайденим значенням 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 критерії прийнятності  $\leq 2,6$ ).

2. Проведено валідацію ВЕРХ-методику визначення супровідних домішок в таблетках енісаміуму йодиду, де продемонстровано специфічність

аналітичної методики, та підтверджена відповідність всіх інших валідаційних параметрів; встановлено межі детектування та МКВ кожної домішки.

3. Розроблено та проведено валідацію СФ методики контролю таблеток за показником «Розчинення».

4. Розроблено та проведено валідацію ВЕРХ-методики вивчення профілів розчинення таблеток енісаміуму йодиду; вивчено профілі розчинення таблеток в буферних розчинах із рН 1,2; 4,5; 6,8. Підтверджена правильність, прецизійність, робасність аналітичної методики та стабільність випробовуваних розчинів та розчинів порівняння. Час хроматографування однієї проби становив не більше 5 хв, а пробопідготовка не потребує додаткової стадії розведення розчинів, таким чином методика є експресною та простою при вивченні профілів розчинення.

За матеріалами розділу опубліковано роботи [169, 177].

## РОЗДІЛ 5

### РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ КАПСУЛ ЕНІСАМІУМУ ЙОДИДУ

У наведеному розділі описано підходи щодо розробки та валідації аналітичних методик контролю якості. У розділі описано методику кількісного визначення, визначення супровідних домішок, методику вивчення розчинення та методику вивчення профілів розчинення. Необхідність такої розробки пов'язана із тим, що наявні методики контролю якості не дозволяють забезпечити ліміти виявлення супровідних домішок.

Крім того, валідація має бути проведена за такими характеристиками як: специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, діапазон застосування, робасність. У розділі описано хід розробки та валідація методик кількісного визначення, визначення супровідних домішок, вивчення розчинення та методика вивчення профілів розчинення. У розділі представлені профілі вивільнення АФІ у середовищах розчинення з рН 1,2; 4,5; 6,8. Детальний опис методик наведений у розд. 2.

#### 5.1 Розробка та валідація методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах

Оскільки у науковій літературі не описано методики контролю якості енісаміуму йодиду з використанням спектрофотометрії, виникає необхідність її розробки та валідації.

У відповідності до рекомендацій ICH Q2R [125], аналітична методика має бути валідована за наступними характеристиками: специфічність, правильність, прецизійність, лінійність, діапазон застосування, робасність, ВЛП.

Об'єктом дослідження були капсули енісаміуму йодиду с. 10916, виробництва АТ «Фармак».



Статистичну обробку результатів проводили у відповідності до вимог ДФУ [149] та ЄА [171].

Встановлено, що енісаміум йодид має два максимуми поглинання: при довжинах хвиль 223 та 267 нм. УФ спектр поглинання розчину енісаміуму йодиду наведено на рис. 5.1.

У випадку, коли речовина має більше одного максимуму поглинання, рекомендовано вибирати більшу довжину хвилі [173], в даному випадку – 267 нм. Як розчинник використано 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти.

У відповідності до розробленої методики проводили вимірювання випробовуваного розчину та розчину порівняння (концентрація обох становила 0,02 мг/мл) у кюветі з товщиною шару 10 мм. В якості компенсаційного розчину застосовано розчинник (0,1 М розчин хлористоводневої кислоти).

Для підтвердження специфічності методики було приготовано розчин ДР, що входять до складу препарату, та розчин основних домішок, які потенційно можуть бути наявними, виходячи з результатів стабільності ГЛФ. Оцінено систематичну похибку ( $\delta_{\text{noise}}$ , %).

Приготування розчину ДР проводили подібно до приготування випробовуваного розчину. Спектр розчину плацебо, розчину домішок та розчину порівняння наведено на рис. 5.2.

Дані щодо специфічності методики кількісного визначення енісаміуму йодиду наведено в табл. 5.1.

Із наведених у таблиці 5.1 даних випливає, що абсорбція ДР та домішок за довжини хвилі 267 нм є незначною і не перевищує критерій прийнятності (не більше 0,5 %).

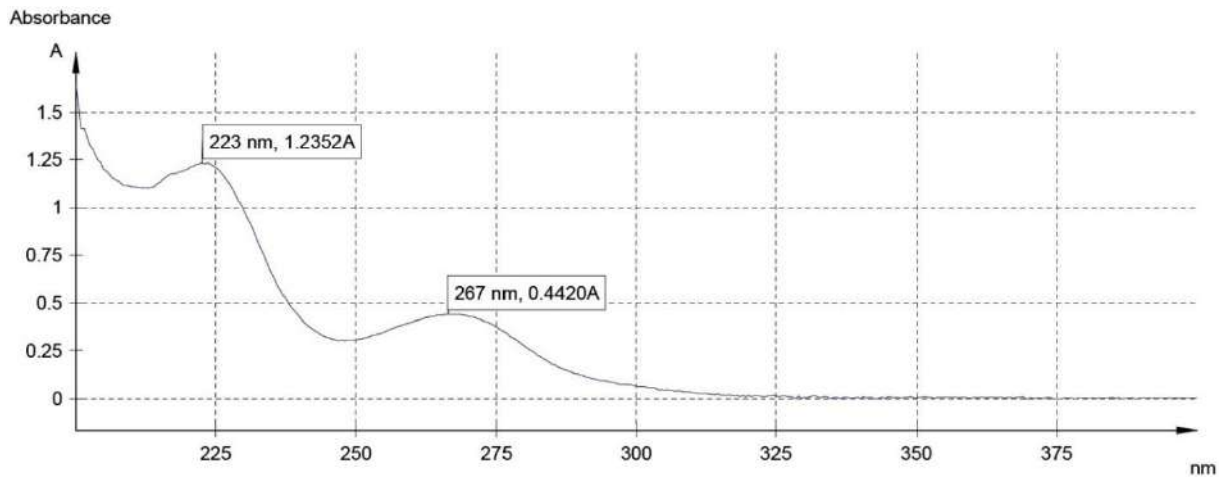


Рис. 5.1. УФ-спектр енісаміуму йодиду

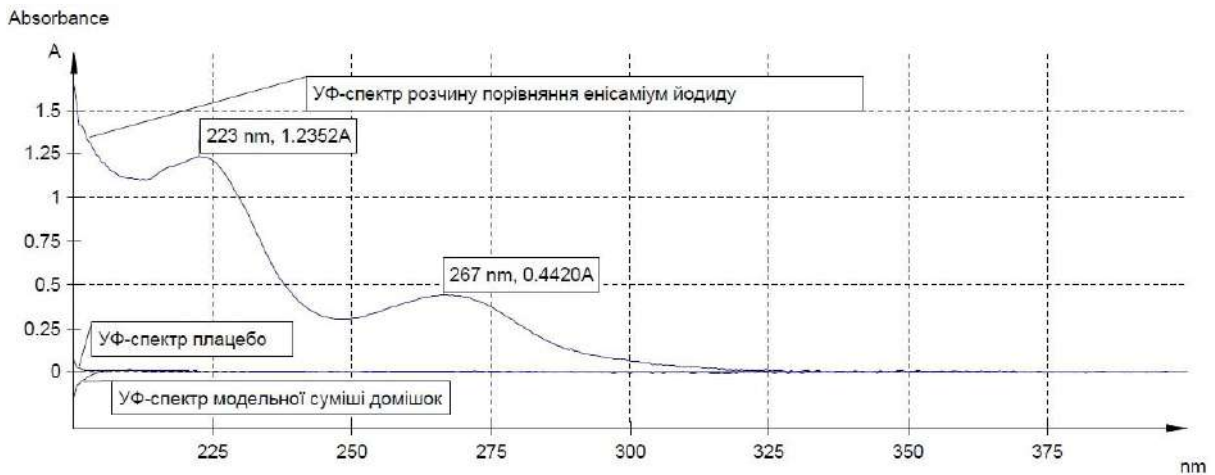


Рис. 5.2. УФ-спектр розчину плацебо, розчину домішок та розчину порівняння

Таблиця 5.1

**Специфічність СФ методики кількісного визначення  
енісаміуму йодиду в капсулах**

Абсорбція плацебо ( $A_{\text{PLACEBO}}$ )	Абсорбція розчину домішок ГЛФ ( $A_{\text{IMPS}}$ )	Абсорбція розчину порівняння ( $A_{\text{RS}}$ )	Знайдене значення $\delta_{\text{noise, (\%)}}$ : $\frac{A_{\text{PLACEBO}} + A_{\text{IMPS}}}{A_{\text{RS}}} \times 100$	Критерій прийнятності
0,0003	0,0001	0,4419	0,09	не більше 0,5 %

Вивчення лінійності аналітичної методики проводили на модельних сумішах, в яких концентрація енісаміуму йодиду лінійно змінювалася в діапазоні від 80 % до 120 % (0,016–0,024 мг/мл) відносно номінальної концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині.

Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів [150]. Графік лінійної залежності наведено на рис. 5.3.

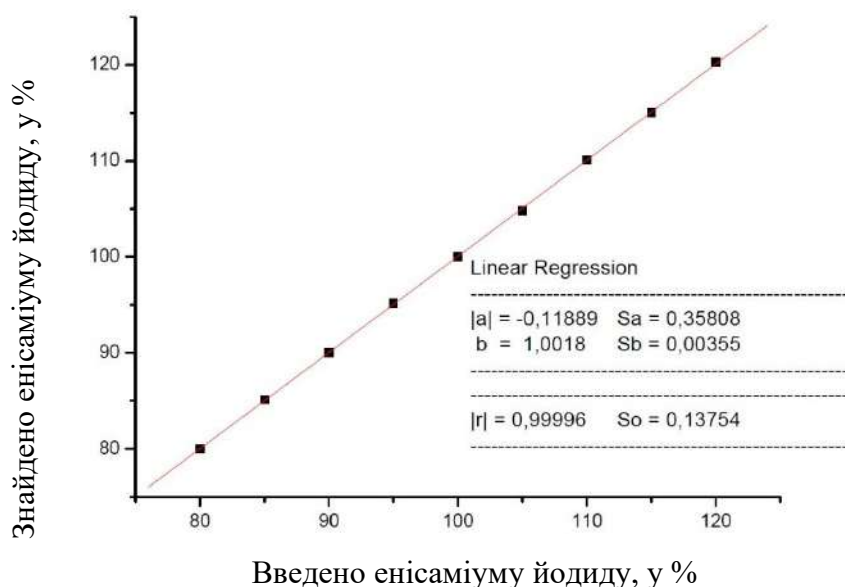


Рис. 5.3. Графік лінійної залежності абсорбції від концентрації енісаміуму йодиду (в нормалізованих координатах)

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності ДФУ [151]; дані наведено в табл. 5.2.

Результати аналізу модельних сумішей енісаміуму йодиду та їх статистична обробка наведено в табл. 5.3.

Прецизійність вивчалася на двох рівнях: збіжність (повторюваність) та ВЛП.

Збіжність оцінювали, аналізуючи в умовах методики розчин порівняння та 6 випробовуваних розчинів, приготованих із однієї серії препарату, а ВЛП підтверджувалася іншим аналітиком, який аналізував таку ж кількість зразків тієї ж серії препарату наступного дня.

Результати перевірки точності аналітичної методики наведено в табл. 5.4.

Таблиця 5.2

**Метрологічні характеристики лінійності СФ методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах**

Величина	Значення	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Висновки
$b$	1,0018	–	–
$s_b$	0,00355	–	–
$ a $	0,11889	$\leq 2,6$	відповідає
$s_a$	0,35808	–	–
$s_0$	0,13754	–	–
$s_0/b$	0,13729	$\leq 0,84$	відповідає
$ r $	0,99996	$\geq 0,99981$	відповідає

Таблиця 5.3

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

Номер зразка	Концентрація енісаміуму йодиду		
	у модельній суміші відносно розчину порівняння, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100$	знайдена за величиною абсорбції, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 100$	знайдено у % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$
1	2	3	4
1	80,00	80,00	100,01
2	85,00	85,13	100,15
3	90,00	90,03	100,03
4	95,00	95,18	100,18
5	100,00	100,02	100,02
6	105,00	104,80	99,81
7	110,00	110,07	100,06

Продовж. табл. 5.3

1	2	3	4
8	115,00	115,05	100,05
9	120,00	120,27	100,23
середнє, $Z\%$			100,06
відносне стандартне відхилення, $RSD_z \%$			0,12
довірчий інтервал збіжності результатів $\Delta_z \% = t(95\%, 8) \times RSD_z = 1,8595 \times 0,12 =$			0,23
критичне значення для збіжності результатів $\Delta_z \% \leq \Delta_{As} (\Delta_{As} = 1,6 \%)$			виконується (0,23 < 1,60)
систематична похибка $\delta =  Z - 100 $			0,06
критерій незначущості систематичної похибки $\delta \leq 0,32 \times \Delta_{As}$			виконується (0,06 < 0,51)
загальний висновок щодо методики:			коректна

Таблиця 5.4

**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
$RSD_{ВЛП}, \%$	0,4	
Відносна різниця середніх значень, %	0,14	

Як видно із табл. 5.4, 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.

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). Отримані результати представлені в табл. 5.5.

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 %.

Робасність аналітичної методики визначалася на основі даних зі стабільності випробовуваних розчинів та надійності аналітичної методики щодо зміни довжини хвилі детектування та варіювання складу компенсаційного розчину.

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), так само як і застосування компенсаційного розчину, в якості якого використовували 0,09 та 0,11 М розчин хлористоводневої кислоти, не має значного впливу на результати аналізу.

Відхилення співвідношень абсорбції розчину порівняння та випробовуваного розчину у всіх експериментах щодо робасності не перевищувало 1,0 %.

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки було проведено, виходячи з даних, що наведено в табл. 5.6.

**Результати вивчення правильності СФ методики кількісного визначення  
енісаміуму йодиду в капсулах**

Номер зразка	Введено відносно концентрації розчину порівняння, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100$	Знайдено відносно абсорбції розчину порівняння, % $Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100$	Знайдено по відношенню до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$	RSD (Z <sub>i</sub> ), %
1	80,0	81,15	101,43	0,8
2	80,0	80,54	100,67	
3	80,0	79,84	99,80	
4	100,0	99,75	99,75	0,3
5	100,0	99,30	99,30	
6	100,0	99,30	99,30	
7	120,0	118,54	98,78	0,4
8	120,0	119,26	99,38	
9	120,0	119,51	99,59	
Середнє значення за всіма концентраційними рівнями				0,81

Таблиця 5.6

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки, що застосовується при  
кількісному визначенні енісаміуму йодиду в капсулах методом СФ**

Операція	Дані для розрахунку	Невизначеність, %
1	2	3
розчин порівняння		
Зважування СЗ	200 мг (з точністю до ± 0,0001 г)	0,1
Доведення до об'єму 100 мл	100,0	0,12

Продовж. табл. 5.6

1	2	3
Відбір аліквоти піпеткою Мора	1,00	0,98
Доведення до об'єму мірної колби	100,0	0,12

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta S_p$  для розчину порівняння:  
 $\Delta S_p = \sqrt{0,1^2 + 0,12^2 + 0,98^2 + 0,12^2} = 1,00 \%$ .

Оскільки невизначеність пробопідготовки для випробовуваного розчину буде така ж, як і для розчину порівняння (однакова пробопідготовка), то сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить:  
 $\sqrt{1,00^2 + 1,00^2} = 1,41 \%$ .

Невизначеність пробопідготовки перевищує допустимий рівень, оскільки прийнятний рівень становить  $0,32 \times \Delta_{As} = 0,32 \times 1,6 = 0,51 \%$  ( $1,41 > 0,51$ ).

У відповідності до вимог ДФУ, у випадку, коли не виконується наведене вище співвідношення, то використовують критерій незначущості цієї систематичної похибки в порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу [151].

Прогноз загальної невизначеності аналізу  $\Delta_{As}$  проводили за формулою (3.6), яка наведена в розд. 3.  $\Delta_{FAO}$  розраховували за формулою (4.1), яка наведена в розд. 4.

При розрахунку повної невизначеності аналізу необхідно використовувати максимально допустимі величини  $S_{sp}$ . У відповідності до характеристики спектрофотометра Specord 200 «Analytik Jena», Німеччина, величина  $S_{sp}$  не перевищує 0,20 %:  $\Delta_{FAO} = 2 \cdot 0,2 = 0,40$ . Тоді,  $\Delta_{As}$  складає  
 $\sqrt{1,41^2 + 0,40^2} = 1,47 \% < 1,60 \%$ .

Таким чином, методика коректна та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною точністю.



## 5.2 Розробка та валідація методик визначення супровідних домішок в капсулах

У відповідності до діючих вимог фармацевтичної практики ГЛФ має контролюватися за показником «Супровідні домішки». Методика визначення супровідних домішок в АФІ була взята за основу для розробки методики контролю супровідних домішок в капсулах енісаміуму йодиду [154]. У наведеному розділі описано валідацію методики контролю супровідних домішок в капсулах, де продемонстровано відповідність методики вимогам ІСН. Методика описана в розділі 2 даної дисертації. В табл. 5.7 наведено результати щодо придатності хроматографічної системи.

Таблиця 5.7

### Дані, що підтверджують придатність хроматографічної системи при визначенні супровідних домішок у капсулах енісаміуму йодиду методом ВЕРХ

Параметр придатності хроматографічної системи	Критерій	Отримано	Відповідність
Відношення висоти піка БАІНК до сідлової точки має бути не менше 1,1 за довжини хвилі 205 нм	$\geq 1,1$	9,2	відповідає
Число теоретичних тарілок, розраховане за піком бензиламіну має бути не менше 2500 за довжини хвилі 205 нм	$\geq 2500$	26245	«-//-»
Відношення висоти піку ізонікотинової кислоти до сідлової точки має бути не менше 1,5, за довжини хвилі 265 нм	$\geq 1,5$	6,9	«-//-»
RSD для кожного визначуваного компоненту	$\leq 1,8$	0,4	«-//-»

Для тесту «Супровідні домішки» визначено діапазон застосування 10–150 % для неідентифікованих та ідентифікованих домішок (бензиламіну,

бензиламід ізонікотинової кислоти та ізонікотинової кислоти) відносно гранично допустимого вмісту кожної домішки.

*Лінійність* вивчено для ідентифікованих (бензиламін, бензиламід ізонікотинової кислоти, ізонікотинова кислота) та неідентифікованих домішок в діапазоні концентрацій 0,01–0,15 % відносно номінальної концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині.

Хроматографування модельних розчинів проводили, отримуючи по 3 паралельні хроматограми.

Графіки лінійної залежності площ піків від концентрації компонентів наведені на рис. 5.4.

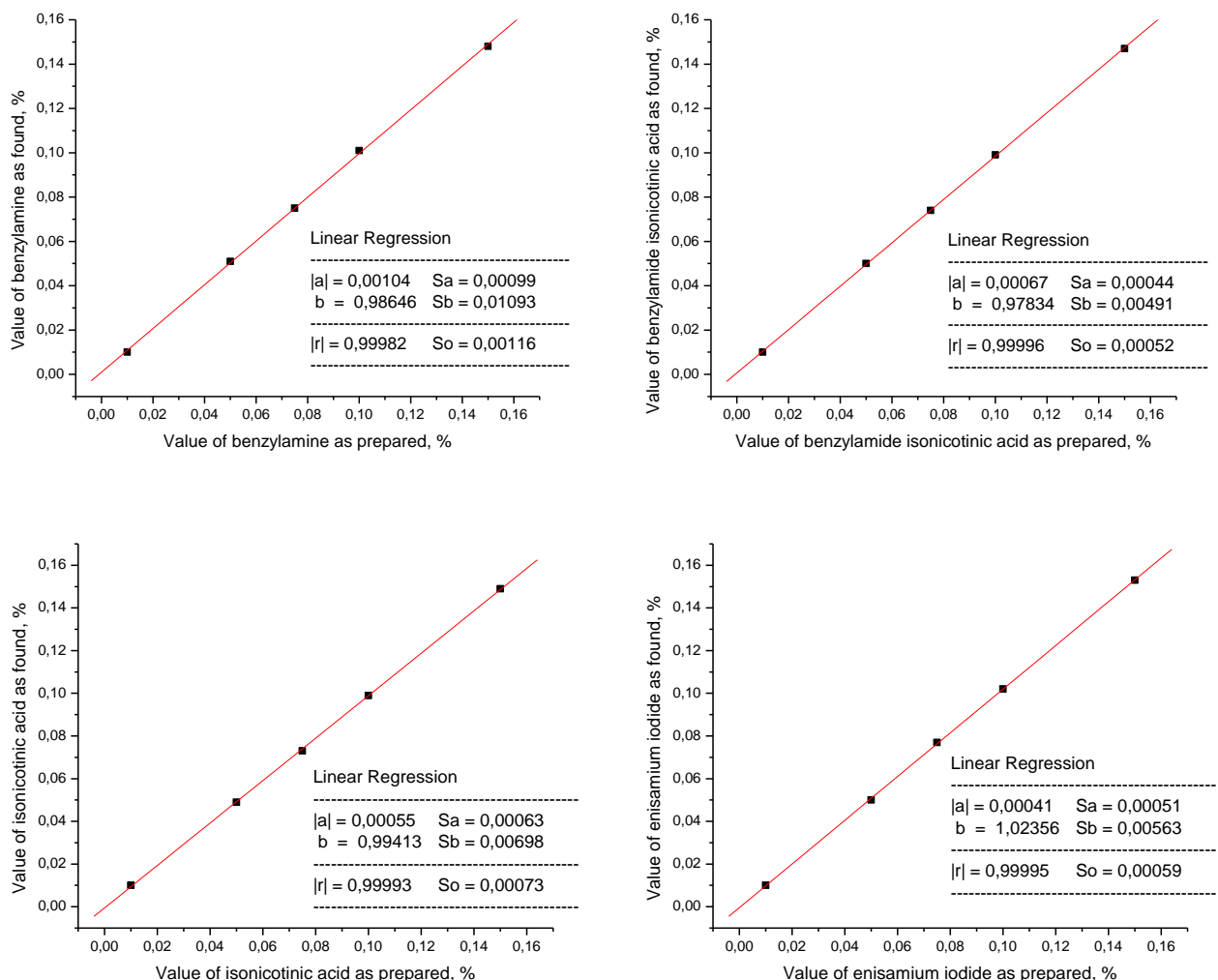


Рис. 5.4. Графік лінійної залежності площі піків від концентрації аналітів (бензиламіну, бензиламід ізонікотинової кислоти, ізонікотинової кислоти, енісаміуму йодиду)

Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів [150]. Отримані дані наведено в табл. 5.8.

Таблиця 5.8

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

Величина	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Отримані значення			
		Бензиламін	Ізонікотинова кислота	БАІНК	Енісаміум
$b$	-	0,98646	0,99413	0,97834	1,02356
$s_b$	-	0,01093	0,00698	0,00491	0,00563
$ a $	$\leq 5,0$	0,00104	0,00055	0,00067	0,00041
$s_a$	-	0,00099	0,00063	0,00044	0,00051
$s_0$	-	0,00116	0,00073	0,00052	0,00059
$s_0/b$	-	0,00118	0,00073	0,00053	0,00058
$ r $	$\geq 0,990$	0,99982	0,99993	0,99996	0,99995

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності, що регламентовані ДФУ [151].

Результати аналізу модельних сумішей для визначення домішок та їх статистична обробка наведено в табл. 5.9.

Виходячи з отриманих результатів, лінійність визначення вмісту неідентифікованих та ідентифікованих домішок (бензиламіну, бензиламід у ізонікотинової кислоти та ізонікотинової кислоти) підтверджена в досліджуваному діапазоні – знайдені параметри для лінійності відповідають критеріям прийнятності.

*МВ та МКВ.* МВ та МКВ ідентифікованих та неідентифікованих домішок було визначено за результатами лінійної регресії, використовуючи значення стандартного відхилення вільного члена лінійної залежності ( $S_a$ ) та кутового коефіцієнта для розрахованої регресійної прямої ( $b$ ) (табл. 5.10).

**Результати аналізу модельних сумішей та їх статистична обробка в умовах визначення супровідних домішок в капсулах енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Концентрація аналітів								
у модельній суміші, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 0,05$	знайдено за площами піків, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 0,100$				знайдено у % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$			
	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ
0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	100,0	100,0	100,0	100,0
0,050	0,051	0,049	0,050	0,050	102,0	98,0	100,0	100,0
0,075	0,075	0,073	0,074	0,077	100,0	97,3	98,7	102,7
0,010	0,101	0,099	0,099	0,102	101,0	99,0	99,0	102,0
0,150	0,148	0,149	0,147	0,153	98,7	99,3	98,0	102,0
середнє, Z%					100,3	98,7	99,1	101,3
відносне стандартне відхилення, $RSD_z$ %					1,23	1,08	0,87	1,24
довірчий інтервал збіжності результатів $\Delta_z \% = t(95\%, 4) \times RSD_z$					2,63	2,31	1,86	2,64
критичне значення для збіжності результатів $\Delta_z \% \leq \Delta_{As} (\Delta_{As} = 5,0 \%)$					2,63 < 5,0	2,31 < 5,0	1,86 < 5,0	2,64 < 5,0
систематична похибка $\delta =  Z - 100 $					0,3	1,3	0,9	1,3
критерій незначущості систематичної похибки $\delta \leq 0,32 \times \Delta_{As}$					0,3 < 1,6	1,3 < 1,6	0,9 < 1,6	1,3 < 1,6

Таблиця 5.10

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

Домішка	МВ, %	МКВ, %
1	2	3
Бензиламін	0,003	0,010

Продовж. табл. 5.10

1	2	3
Ізонікотинова кислота	0,002	0,006
Бензиламід ізонікотинової кислоти	0,001	0,005
Неідентифіковані домішки (за піком енісаміуму)	0,002	0,005

Знайдена МКВ для ідентифікованих та неідентифікованих домішок відповідає критерію прийнятності «не > 0,05 %».

Правильність для ідентифікованих (бензиламін, бензиламід ізонікотинової кислоти, ізонікотинова кислота) та неідентифікованих домішок оцінювали, аналізуючи 9 модельних розчинів з концентрацією 0,05 % (3 повтори), 0,10 % (3 повтори) та 0,15 % (3 повтори) відносно номінальної концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині. Отримані результати наведено в табл. 5.11.

Відносне стандартне відхилення між результатами для одного концентраційного рівня для всіх визначуваних домішок становить не більше 5,0 %.

Таблиця 5.11

**Результати вивчення правильності методики визначення супровідних домішок у капсулах енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Концентрація аналітів								
у модельній суміші, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 0,05$	знайдено за площами піків відносно концентрації у розчині порівняння, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 0,100$				знайдено у % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$			
	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ
1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,050	0,050	0,048	0,051	0,050	100,0	96,0	102,0	100,0
0,05	0,051	0,052	0,051	0,051	102,0	104,0	102,0	102,0

Продовж. табл. 5.11

1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,05	0,051	0,051	0,049	0,047	102,0	102,0	98,0	96,0
0,05	0,100	0,098	0,097	0,100	100,0	98,0	97,0	100,0
0,10	0,101	0,099	0,098	0,102	101,0	99,0	98,0	102,0
0,10	0,103	0,101	0,100	0,101	103,0	101,0	100,0	101,0
0,10	0,146	0,145	0,148	0,152	97,3	96,7	98,7	101,3
0,15	0,145	0,146	0,144	0,153	96,7	97,3	96,0	102,0
0,15	0,150	0,150	0,147	0,149	100,0	100,0	98,0	99,3
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 0,03 %)					1,15	4,19	2,34	3,04
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 0,05 %)					1,52	1,54	1,55	1,00
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 0,06 %)					1,75	1,77	1,42	1,40
RSD між значеннями всіх концентраційних рівнів ( $Z_i$ ), %					2,11	2,67	2,11	1,92

Правильність аналітичної методики знаходиться в межах критерію 95,0–105,0 %.

Прецизійність вивчена на рівні збіжності та ВЛП.

Для оцінки збіжності готували та аналізували 6 модельних сумішей, в яких були присутні ідентифіковані домішки в концентрації 0,10 % відносно концентрації субстанції у випробовуваному розчині (на максимально допустимому рівні домішок в присутності енісаміуму йодиду в концентрації 0,4 мг/мл) та 6 модельних розчинів енісаміуму йодиду в концентрації 0,10 % відносно концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині.

ВЛП підтверджували у порівнянні результатів з іншим аналітиком, аналізуючи 12 додаткових модельних сумішей наступного дня (6 модельних сумішей визначуваних домішок та 6 модельних розчинів енісаміуму йодиду).

Результати перевірки прецизійності аналітичної методики наведено в табл. 5.12.

**Результати перевірки прецизійності методики визначення супровідних  
домішок у капсулах енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Аналітик	Знайдений вміст, %				
	номер зразка	БА	ІНК	БАІНК	ЕЙ
Перший	1	0,100	0,099	0,099	0,101
	2	0,101	0,099	0,098	0,099
	3	0,103	0,098	0,097	0,098
	4	0,102	0,099	0,099	0,101
	5	0,101	0,100	0,098	0,102
	6	0,102	0,100	0,101	0,097
	середнє	0,102	0,099	0,099	0,100
	RSD <sub>x</sub> , %	1,03	0,76	1,38	1,97
Другий	1	0,101	0,098	0,098	0,101
	2	0,101	0,097	0,097	0,100
	3	0,098	0,101	0,099	0,098
	4	0,097	0,102	0,101	0,097
	5	0,102	0,099	0,100	0,099
	6	0,099	0,100	0,102	0,100
	середнє	0,100	0,100	0,100	0,099
	RSD <sub>x</sub> , %	1,97	1,88	1,88	1,48
—	RSD ВЛП, %	1,77	1,38	1,64	1,69
—	відносна різниця середніх значень	0,002	0,001	0,001	0,001

*Робасність* вивчали за стабільністю досліджуваних розчинів та надійністю хроматографічної методики.

Стабільність випробовуваних розчинів вивчалася за зміною площ піків під час зберігання розчинів за температури 25 °С. Результати вивчення стабільності розчинів наведено в табл. 5.13.

Експериментально встановлено, що випробовувані розчини стабільні протягом 48 год при їх зберіганні за температури не вище 25 °С. Підтверджена стабільність випробовуваного розчину та встановлено, що на хроматограмі випробовуваного розчину не спостерігалось утворення піків домішок при його зберіганні за температури 25 °С протягом 48 год. Після зберігання розчину для перевірки придатності хроматографічної системи протягом 48 год підтверджена можливість оцінки придатності хроматографічної системи.

*Таблиця 5.13*

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

Часова точка, в год	Кінцевий розчин порівняння				Модельна суміш, що містить 0,10 % енісаміуму йодиду в порівнянні до концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині
	площі піків, mAU×min				площа піка, mAU×min
	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміум	Енісаміум
0	33,1	20,4	39,1	38301	40,2
6	31,9	20,3	38,7	38355	40,4
12	32,4	20,7	38,2	38400	39,8
24	33,7	19,4	38,9	38401	39,6
48	32,5	19,2	39,4	38387	38,6
RSD, %	2,12	3,30	1,16	0,11	1,77



Надійність хроматографічної методики перевірялася за варіабельністю швидкості потоку рухомої фази, температури термостату колонки, складу рухомої фази, рН буферного розчину та застосування альтернативної хроматографічної колонки (колонки з іншим серійним номером). Відповідно до цього проводили хроматографування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи, розчину порівняння, модельної суміші, що містила по 0,10 % кожної домішки та модельну суміш енісаміуму йодиду 0,10 % (відсоткові значення відносно концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині) з подальшою оцінкою вмісту речовин.

В табл. 5.14 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.

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки проведено виходячи з даних, що наведені в табл. 5.15.

Таблиця 5.14

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

Умови, що змінюються		Вміст домішок у модельній суміші (теоретичний вміст 0,10 % кожної)		Вміст енісаміуму у модельній суміші (теоретичний вміст 0,10 %)	
		БА	ІНК	БАІНК	Енісаміум
1		2	3	4	5
Швидкість потоку рухомої фази, в мл/хв	0,45	0,101	0,097	0,098	0,099
	0,50	0,100	0,098	0,100	0,097
	0,55	0,099	0,098	0,101	0,097
	RSD, %	1,00	0,59	1,53	1,18
Температура термостату колонки, в °С	25	0,098	0,097	0,100	0,101
	30	0,100	0,098	0,100	0,097

Продовж. табл. 5.14

1	2	3	4	5	6
	35	0,097	0,101	0,100	0,101
	RSD, %	1,55	2,11	0,00	2,32
Склад рухомої фази: буферний розчин рН 2,5:вода:ацетонітрил (об/об/об)	28:44:28	0,101	0,099	0,098	0,097
	30:44:26	0,100	0,098	0,100	0,097
	32:44:24	0,100	0,100	0,103	0,100
	RSD, %	0,58	1,01	2,51	1,77
рН буферного розчину	рН 2,4	0,101	0,102	0,098	0,097
	рН 2,5	0,100	0,098	0,100	0,097
	рН 2,6	0,102	0,101	0,097	0,099
	RSD, %	0,99	2,07	1,55	1,18
Серійний номер хроматографічної колонки	B16099	0,101	0,102	0,101	0,101
	USYT001 583	0,100	0,098	0,100	0,097
	RSD, %	0,70	2,83	0,70	2,86

Таблиця 5.15

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки, що застосовується при  
визначенні супровідних домішок у капсулах енісаміуму йодиду методом  
ВЕРХ**

Операція пробопідготовки	Дані для розрахунку	Невизначеність, %
1	2	3
розчин порівняння (по БАІНК, як найбільш критичний)		
Зважування СЗ	з точністю до $\pm 0,0002$ г	$(0,2 \text{ мг} / 10 \text{ мг}) \cdot 100 = 2,00 \%$
Доведення до об'єму 100 мл	100,0 мл (3 колби)	0,12; 0,12; 0,12
Відбір аліквоти піпеткою	10,00 мл	0,5
Відбір аліквоти піпеткою (проміжних розчинів домішок)	0,50 мл	1,00

Продовж. табл. 5.15

1	2	3
випробовуваний розчин		
Зважування випробовуваної субстанції	з точністю до $\pm 0,0002$ г	$(0,2 \text{ мг} / 401 \text{ мг}) \cdot 100 = 0,05 \%$
Доведення до об'єму 100 мл	100,0 мл (2 колби)	0,12; 0,12
Відбір аліквоти піпеткою	10,00 мл	0,5

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для розчину порівняння:

$$\Delta Sp = \sqrt{2,00^2 + 0,12^2 + 0,5^2 + 0,12^2 + 1,00^2 + 0,12^2} = 2,30 \%$$

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для випробовуваного розчину:

$$\Delta Sp = \sqrt{0,05^2 + 0,12^2 + 0,5^2 + 0,12^2} = 0,53 \%$$

Сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить:

$$\sqrt{2,30^2 + 0,53^2} = 2,36 \%$$

Прогнозована невизначеність пробопідготовки значна у порівнянні з повною невизначеністю методики, так як вона перевищує граничне значення  $0,32 \times \Delta_{As} = 0,32 \times 5 \approx 1,6 \%$ .

Прогноз загальної невизначеності аналізу  $\Delta_{As}$  проводили за формулою (3.6),  $\Delta_{FAO}$  розраховували за формулою (3.7) (розд. 3). Таким чином, виходячи із

даних RSD,  $\Delta_{FAO}$  становить:  $\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \cdot \frac{1,8 \cdot 2,92}{\sqrt{3}} = 4,29\%$ . Тоді,  $\Delta_{As}$  складає

$$\Delta_{As} = \sqrt{2,36^2 + 4,29^2} = 4,90 < 5,0 \%$$

Таким чином, методика коректна та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною точністю.

### 5.3 Розробка та валідація методики контролю якості капсул за показником «Розчинення»

Для підтвердження специфічності методики було приготовано розчин ДР, що входять до складу препарату, та розчин домішок, які потенційно можуть бути присутніми, виходячи з даних зі стабільності ГЛФ, з подальшою оцінкою систематичної похибки ( $\delta_{\text{noise}}$ , %).

Дані для дослідження специфічності методики визначення енісаміуму йодиду при вивченні показника «Розчинення» наведено в табл. 5.16.

Таблиця 5.16

#### Специфічність СФ методики контролю капсул енісаміуму йодиду за показником «Розчинення»

Абсорбція плацебо ( $A_{\text{PLACEBO}}$ )	Абсорбція розчину домішок ГЛФ ( $A_{\text{IMPS}}$ )	Абсорбція розчину порівняння ( $A_{\text{RS}}$ )	Знайдене значення $\delta_{\text{noise}}$ , (%): $\frac{A_{\text{PLACEBO}} + A_{\text{IMPS}}}{A_{\text{RS}}} \times 100$	Критерій прийнятності
0,0003	0,0001	0,4425	0,09 %	не більше 0,5 %

Із наведених у табл. 5.16 даних випливає, що абсорбція ДР та домішок при довжині хвилі 267 нм є незначною і не перевищує критерій прийнятності. Вивчення лінійності проводили на модельних сумішах, в яких концентрація енісаміуму йодиду лінійно змінювалася в діапазоні від 50 % до 130 % відносно номінальної концентрації (0,02 мг/мл) енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині. Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів.

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності ДФУ, дані наведено в табл. 5.17.

Графік лінійної залежності наведено на рис. 5.5.

**Метрологічні характеристики лінійності СФ методики контролю капсул  
енісаміуму йодиду за показником «Розчинення»**

Величина	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Отримані значення
b	—	1,00147
s <sub>b</sub>	—	0,00646
a	≤ 5,0	0,26867
s <sub>a</sub>	—	0,60492
s <sub>0</sub>	—	0,50044
s <sub>0</sub> /b	—	0,49971
r	≥ 0,995	0,99985

Графік лінійної залежності наведено на рис. 5.5.

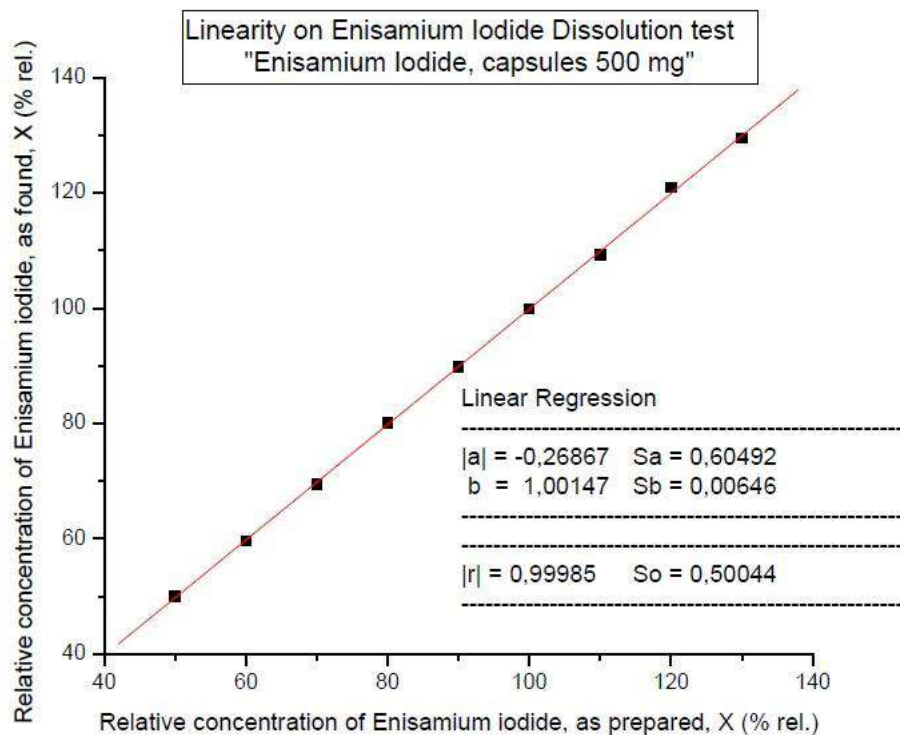


Рис. 5.5. Графік лінійної залежності абсорбції від концентрації енісаміуму йодиду при визначенні методом СФ

Точність вивчена на рівні збіжності та ВЛП. Для оцінки збіжності готували та аналізували розчини порівняння та 6 випробовуваних розчинів з концентраціями діючої речовини на рівні 100 % вивільнення енісаміуму йодиду. Розчини були приготовані із однієї і тієї ж серії ГЛФ. ВЛП підтверджено у порівнянні з результатами другого аналітика, який наступного дня аналізував додаткові розчини порівняння та випробовувані розчини. Результати перевірки точності аналітичної методики наведено в табл. 5.18.

Таблиця 5.18

**Результати перевірки точності СФ методики контролю капсул енісаміуму йодиду за показником «Розчинення»**

Номер зразка	Аналітик 1, знайдений вміст, %	Аналітик 2, знайдений вміст, %
1	100,2	99,7
2	100,5	100,0
3	99,6	99,7
4	100,4	99,8
5	100,1	100,1
6	99,6	100,2
Середнє значення	100,1	99,9
RSD <sub>x</sub> , %	0,4	0,2
RSD, ВЛП, %	0,3	
Відносна різниця середніх значень	0,15	

Як видно із табл. 5.18, RSD отриманих результатів аналізу двох аналітиків, а також відносна різниця середніх значень результатів не перевищує 2,5 %. Це свідчення щодо належної повторюваності результатів аналізу.

Для оцінки правильності готували 3 групи модельних розчинів з концентрацією енісаміуму йодиду 50 %, 100 % та 130 % по відношенню до концентрації енісаміуму йодиду у розчині порівняння в трьох паралельних

дослідах для кожного концентраційного рівня. Отримані результати наведено в табл. 5.19.

Таблиця 5.19

**Результати вивчення правильності СФ методики контролю капсул енісаміуму йодиду за показником «Розчинення»**

Концентрація енісаміуму йодиду		
Введено, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100$	Знайдено, % $Y_i = \frac{A_i}{A_{st}} \times 100$	Знайдено у % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$
50	50,06	100,11
50	49,74	99,48
50	49,49	98,98
100	99,46	99,46
100	100,38	100,38
100	100,14	100,14
130	129,24	99,42
130	130,35	100,27
130	130,01	100,01
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 50 %)		0,6
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 100 %)		0,5
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 130 %)		0,4
RSD між значеннями всіх рівнів ( $Z_i$ ), %		0,48

RSD між результатами для одного концентраційного рівня для енісаміуму становить не більше 2,0 %.

Правильність аналітичної методики знаходиться в межах критерію 98,0–102,0 %.

Робасність аналітичної методики визначалася на основі даних зі стабільності випробовуваних розчинів та надійності аналітичної методики щодо зміни довжини хвилі детектування.

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) не має значного впливу на результати аналізу.

Відхилення співвідношень абсорбції розчину порівняння та випробовуваного розчину у всіх експериментах в рамках вивчення робастності методики не перевищувало 1,0 %.

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки було проведено виходячи з даних, що наведені в табл. 5.20.

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для розчину порівняння:  

$$\Delta Sp = \sqrt{0,2^2 + 0,12^2 + 0,6^2 + 0,12^2} = 0,65 \%$$

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для випробовуваного розчину становить:  $\Delta Sp = \sqrt{1,0^2 + 0,6^2 + 0,17^2} = 1,18 \%$ .

Сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить:  

$$\sqrt{0,65^2 + 1,18^2} = 1,35 \%$$

Невизначеність пробопідготовки перевищує допустимий рівень, оскільки прийнятний рівень становить  $0,32 \times \Delta_{As} = 0,32 \times 3,0 = 0,96 \%$  ( $1,35 > 0,96$ ).

Прогноз загальної невизначеності аналізу  $\Delta_{As}$  проводили за співвідношенням (3.6), яке наведено в роз. 3.

$\Delta_{FAO}$  розраховували із співвідношення (4.1), яке наведено в розд. 4.

*Таблиця 5.20*

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки, що застосовується при контролі капсул енісаміуму йодиду за показником «Розчинення» методом СФ**

Операція	Дані для розрахунку	Невизначеність, %
1	2	3
розчин порівняння		
Зважування СЗ	200 мг	Невизначеність



Продовж. табл. 5.20

1	2	3
	(з точністю до $\pm 0,0001$ г)	зважування, при наважці 100 мг складає: (0,2 мг/100 мг $\times$ 100 = 0,2)
Доведення до об'єму 100 мл	100,0	0,12
Відбір аликвоти піпеткою	2,00	0,6
Доведення до об'єму мірної колби 100 мл	100,0	0,12
випробовуваний розчин		
Відмірювання об'єму середовища розчинення	мірний циліндр на 1000 мл	1,0
Відбір аликвоти піпеткою на 2,00 мл	2,00	0,6
Доведення до об'єму мірної колби	50,00	0,17

При розрахунку повної невизначеності аналізу необхідно використовувати максимально допустимі величини  $S_{sp}$ . У відповідності до характеристики спектрофотометра Specord 200 «Analytik Jena», Німеччина, величина  $S_{sp}$  не перевищує 0,20 %:  $\Delta_{FAO} = 2 \cdot 0,2 = 0,40$ . Тоді,  $\Delta_{As}$  складає  $\sqrt{1,35^2 + 0,40^2} = 1,41 \% < 3,0 \%$ .

Таким чином, методика вивчення параметру «Розчинення» капсул коректна та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною точністю.

Середні значення абсорбції, що отримані при валідації методики вивчення «Розчинення» капсул енісаміуму йодиду наведено в дод. Д.

#### 5.4 Розробка та валідація методики вивчення профілів вивільнення енісаміуму йодиду з капсул

Для можливості відслідковування/управління впливу змін на ГЛФ при запровадженні нових виробників ДР, при зміні технології виготовлення, зміні

складу препарату та інших процесах життєвого циклу ГЛФ, є необхідність розробки валідованих методик для вивчення профілів розчинення. Такі дослідження дозволяють оцінити ризики щодо можливої зміни біодоступності препарату. Основою для розробки методики була робота, що описує вивчення профілів розчинення в таблетках енісаміуму йодиду [172].

Визначення було проведено відповідно до вимог ДФУ [149] та ЄФ [171] за пунктами 2.9.3 та 2.2.29. У якості середовищ розчинення використовували буферні розчини з рН 1,2; 4,5; 6,8, що приготовані у відповідності до ДФУ та ЄФ.

Об'єм середовища розчинення становив 900 мл, швидкість обертання кошика – 100 об/хв, час розчинення – 45 хв з точками відбору: 5, 10, 15, 20, 30, 45 хв.

Підтверджено, що запропоновані умови хроматографічного визначення забезпечують специфічність. При хроматографуванні розчину порівняння та випробовуваного розчину час утримування першого піка енісаміуму йодиду становить близько 2,6 хв, другого піка – близько 3,8 хв [172].

Валідацію аналітичної методики було проведено у відповідності до рекомендацій ІСН.

Для підтвердження специфічності методики було приготовано розчин ДР, (ДР ГЛФ), в результаті чого було підтверджено, що відсутня інтерференція піків визначуваного піка з піками ДР.

Вивчення лінійності проводили на модельних сумішах, в яких концентрація енісаміуму йодиду лінійно змінювалася в діапазоні від 5 % до 130 % відносно номінальної концентрації (0,55 мг/мл) енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині.

Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів.

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності ДФУ, дані наведено в табл. 5.21.

**Метрологічні характеристики лінійності методики вивчення профілів  
розчинення капсул енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Величина	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Отримані значення		
		pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
b	–	0,9934	0,98741	0,99824
s <sub>b</sub>	–	0,01235	0,00586	0,00585
a	≤ 5,0	0,89146	0,68906	0,62748
s <sub>a</sub>	–	0,97295	0,46189	0,46062
s <sub>0</sub>	–	1,27033	0,60307	0,6014
s <sub>0</sub> /b	–	1,27877	0,61076	0,60246
r	≥ 0,995	0,99969	0,99993	0,99993

Графіки лінійної залежності площ піків від концентрації у фармакопейних буферних розчинах із рН 1,2; 4,5 та 6,5 наведено на рис. 5.6–5.8. Коефіцієнт кореляції у всіх випадках знаходить на рівні більше 0,995. Значення вільного члену лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої відповідає критерію прийнятності, і становить менше 5,0 у всіх досліджуваних розчинах з рН 1,2; 4,5 та 6,8.

Точність вивчена на рівні збіжності та ВЛП.

Для оцінки збіжності готували та аналізували розчини порівняння та 6 випробовуваних розчинів з концентраціями діючої речовини на рівні 100 % вивільнення АФІ. Розчини були приготовані із однієї і тієї ж серії ГЛФ.

ВЛП підтверджували у порівнянні з результатами другого аналітика, який наступного дня аналізував додаткові розчини порівняння та випробовувані розчини.

Результати перевірки точності аналітичної методики наведено в табл. 5.22.

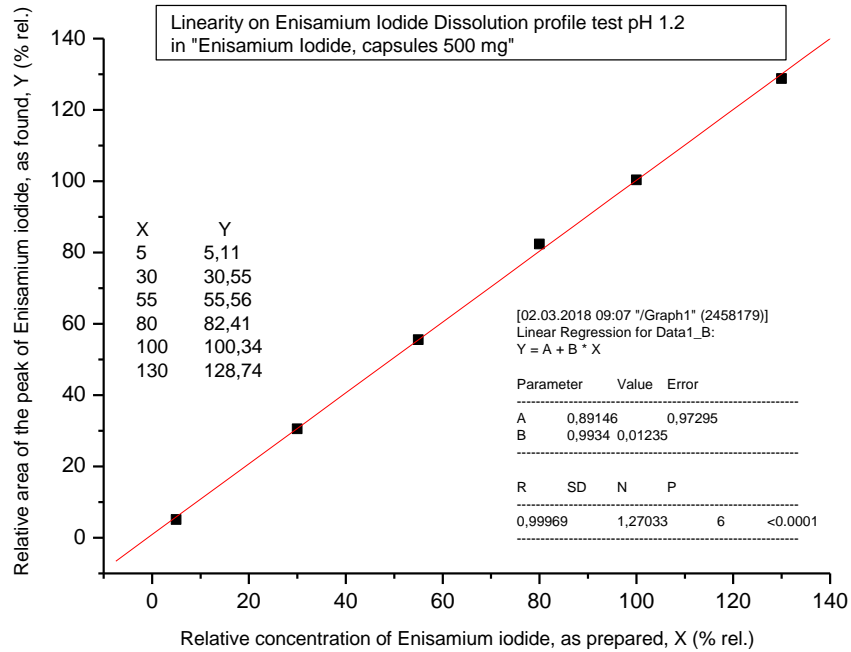


Рис. 5.6. Графік лінійної залежності площі піків від концентрації енісаміуму йодиду в буферному розчині з рН 1,2

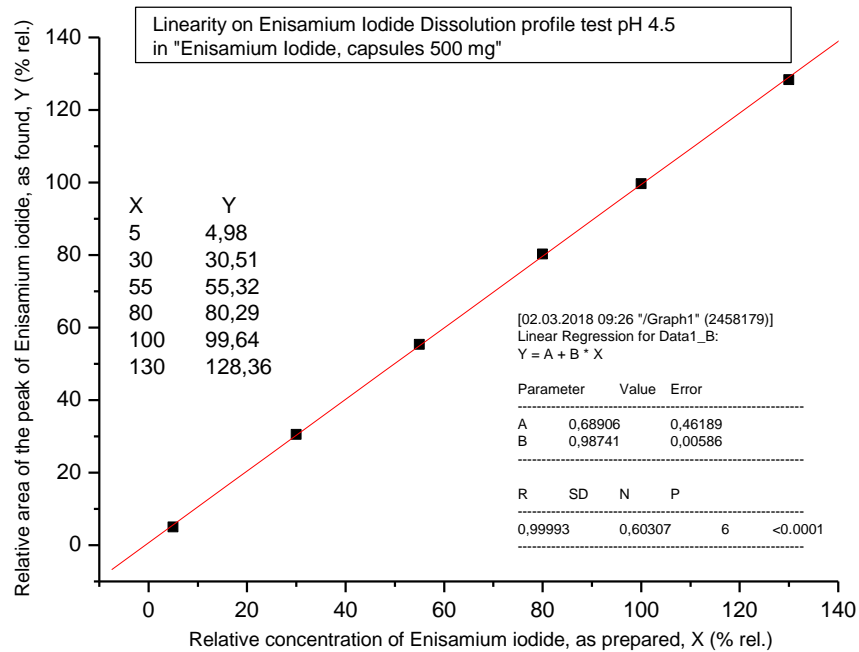


Рис. 5.7. Графік лінійної залежності площі піків від концентрації енісаміуму йодиду в буферному розчині з рН 4,5

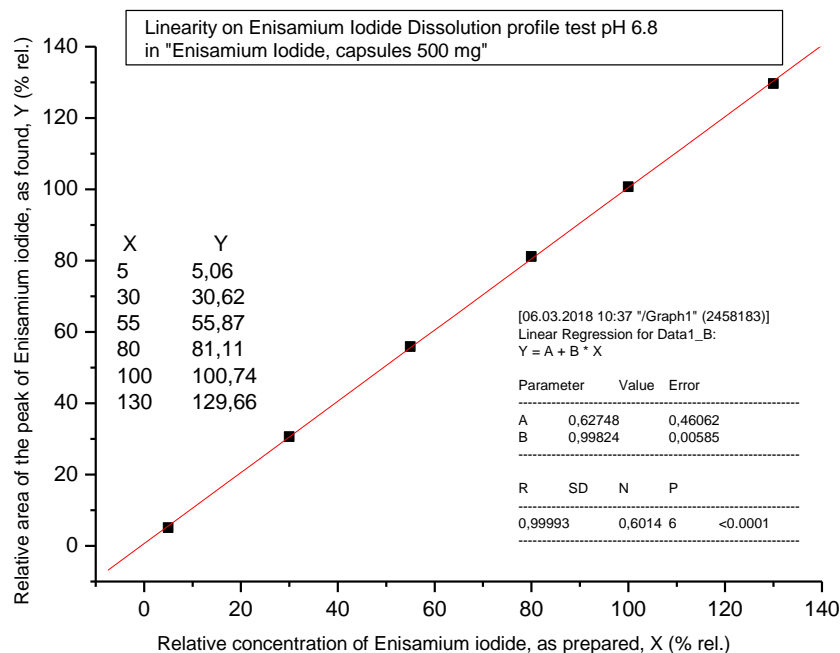


Рис. 5.8. Графік лінійної залежності площі піків від концентрації енісаміуму йодиду в буферному розчині з рН 6,8

Таблиця 5.22

**Результати вивчення точності методики дослідження профілів розчинення капсул енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Аналітик	Знайдений вміст, %			
	номер зразка	рН 1,2	рН 4,5	рН 6,8
1	2	3	4	5
Перший	1	102,0	98,1	99,8
	2	101,6	100,9	98,3
	3	100,2	100,5	100,5
	4	98,8	100,8	99,6
	5	102,7	101,9	98,7
	6	98,8	100,8	99,5
	середнє	100,7	100,5	99,4
	RSD <sub>x</sub> , %	1,7	1,3	0,8

Продовж. табл. 5.22

1	2	3	4	5
Другий	1	98,8	95,9	99,0
	2	99,4	100,7	100,4
	3	100,0	98,8	99,8
	4	100,6	97,1	99,3
	5	100,9	99,1	97,7
	6	101,1	97,8	99,3
	середнє	100,1	98,2	99,3
	RSD <sub>x</sub> , %	0,9	1,7	0,9
–	RSD, ВЛП, %	1,3	1,9	0,8
–	відносна різниця середніх значень	0,6	2,3	0,1

Як видно із табл. 5.22, відносне стандартне відхилення отриманих результатів аналізу обох аналітиків, а також відносна різниця середніх значень результатів не перевищує 2,5 %. Це свідчить про належну повторюваність результатів аналізу.

Для оцінки правильності готували модельні розчини з концентрацією енісаміуму йодиду 5 %, 100 % та 130 % по відношенню до концентрації енісаміуму йодиду у розчині порівняння в трьох паралельних дослідах для кожного концентраційного рівня (в кожному середовищі розчинення). Отримані результати наведені в табл. 5.23.

RSD між результатами для одного концентраційного рівня для енісаміуму становить не більше 3,5 %.

Правильність аналітичної методики знаходиться в межах критерію 96,5–103,0 %.

Робасність вивчали на основі даних зі стабільності досліджуваних розчинів та надійності хроматографічної методики.

**Результати вивчення правильності методики дослідження профілів  
розчинення капсул енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Концентрація енісаміуму йодиду						
у модельній суміші, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 100$	знайдено за площами піків відносно концентрації в розчині порівняння, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 100$			знайдено у % до введеного, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$		
	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
5	5,03	5,00	5,05	100,62	99,93	100,91
5	5,14	4,99	5,06	102,84	99,70	101,25
5	4,83	4,99	5,04	96,68	99,79	100,85
100	99,53	99,93	100,10	99,53	99,93	100,10
100	100,37	99,78	100,75	100,37	99,78	100,75
100	100,58	100,00	100,96	100,58	100,00	100,96
130	129,69	129,32	129,38	99,77	99,47	99,53
130	130,09	129,11	129,93	100,07	99,32	99,95
130	129,97	129,30	129,99	99,98	99,47	99,99
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 5 %)				3,1	0,1	0,2
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 100 %)				0,6	0,1	0,4
RSD ( $Z_i$ ), % (для рівня 130 %)				0,2	0,1	0,3
RSD між значеннями всіх концентраційних рівнів ( $Z_i$ ), %				1,6	0,2	0,6

Стабільність випробовуваних розчинів вивчалася за зміною площ піків під час зберігання розчинів за температури 25 °С. Було встановлено, що розчини порівняння та випробовувані розчини стабільні щонайменше протягом 24 год.

Надійність хроматографічної методики перевірялася за варіабельністю швидкості потоку рухомої фази (0,45; 0,50; 0,55 мл/хв), температури термостату

колонки (30; 25; 35 °С), складу рухомої фази (буферний розчин рН 2,5 – вода – ацетонітрил (30:35:35); (31:35:34); (29:35:36)), рН буферного розчину (2,5; 2,4; 2,6) та застосуванням альтернативної хроматографічної колонки (колонки з іншим серійним номером). Відповідно до цього проводили хроматографування розчинів порівняння та випробовуваних розчинів.

Варіабельність площ піків енісаміуму для кожної із умов у порівнянні до початкових умов становить не більше 2,0 %. Таким чином, аналітичну методику можна вважати робасною.

Розрахунок сумарної невизначеності операції пробопідготовки було проведено, виходячи з даних, що наведені в табл. 5.24.

Таблиця 5.24

**Розрахунок невизначеності пробопідготовки методики дослідження профілів розчинення капсул енісаміуму йодиду методом ВЕРХ**

Операція	Дані для розрахунку	Невизначеність, %
розчин порівняння		
Зважування СЗ	з точністю до $\pm 0,0002$ г	при наважці 55 мг складає 0,36
Доведення об'єму розчину до 100,0 мл	колба на 100,0 мл	0,12
випробовуваний розчин		
Відмірювання об'єму середовища розчинення	мірний циліндр на 1000 мл	1,0

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для розчину порівняння:

$$\Delta Sp = \sqrt{0,36^2 + 0,12^2} = 0,38 \%$$

Сумарна прогнозована невизначеність пробопідготовки становить:

$$\sqrt{1,0^2 + 0,38^2} = 1,07 \%$$

Невизначеність пробопідготовки перевищує допустимий рівень, оскільки прийнятний рівень становить  $0,32 \times \Delta_{As} = 0,32 \times 3,0 = 0,96 \%$  ( $1,07 > 0,96$ ).



У відповідності до вимог ДФУ [151], у випадку, коли не виконується наведене вище співвідношення, то використовують критерій незначущості цієї систематичної похибки в порівнянні з максимально припустимою невизначеністю аналізу.

Прогноз загальної невизначеності аналізу  $\Delta_{As}$  проводили за співвідношенням (3.6),  $\Delta_{FAO}$  розраховували із співвідношення (3.7) (розд. 3).

Таким чином, виходячи із даних RSD,  $\Delta_{FAO}$  становить:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \times \frac{0,5 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 1,19 \%$$

$$\text{Тоді, } \Delta_{As} \text{ складає } \sqrt{1,07^2 + 1,19^2} = 1,60 \% < 3,0 \%$$

Таким чином, методика коректна та може відтворюватися в інших лабораторіях з необхідною точністю.

Експериментальні дані вивчення профілів вивільнення енісаміуму йодиду із капсул наведено на рис. 5.9–5.11.

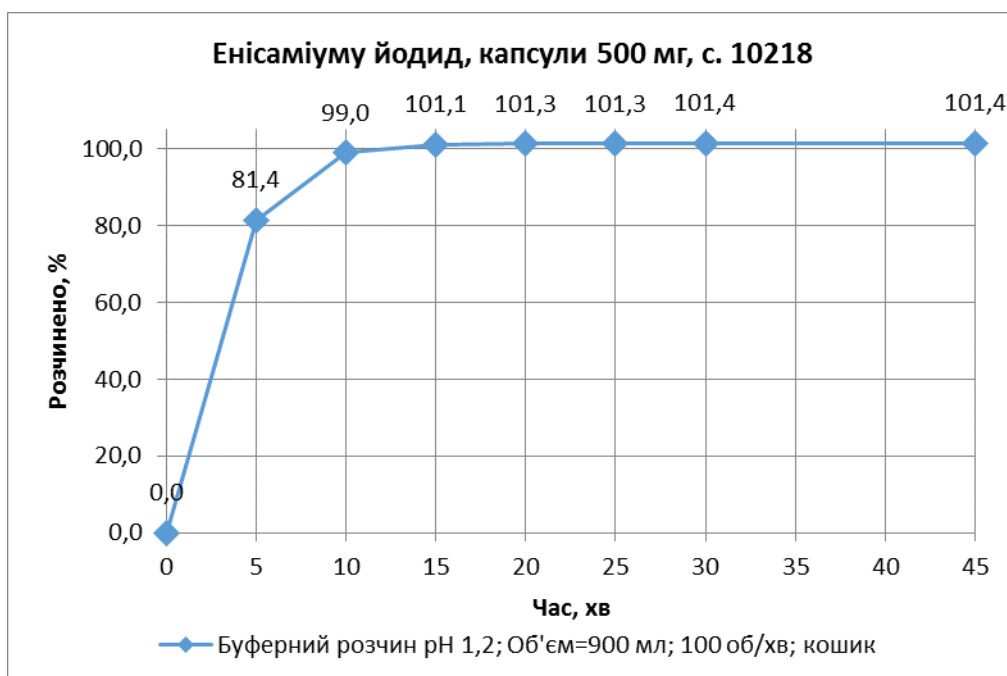


Рис. 5.9. Профілі розчинення енісаміуму йодиду із капсул в буферному розчині з рН 1,2

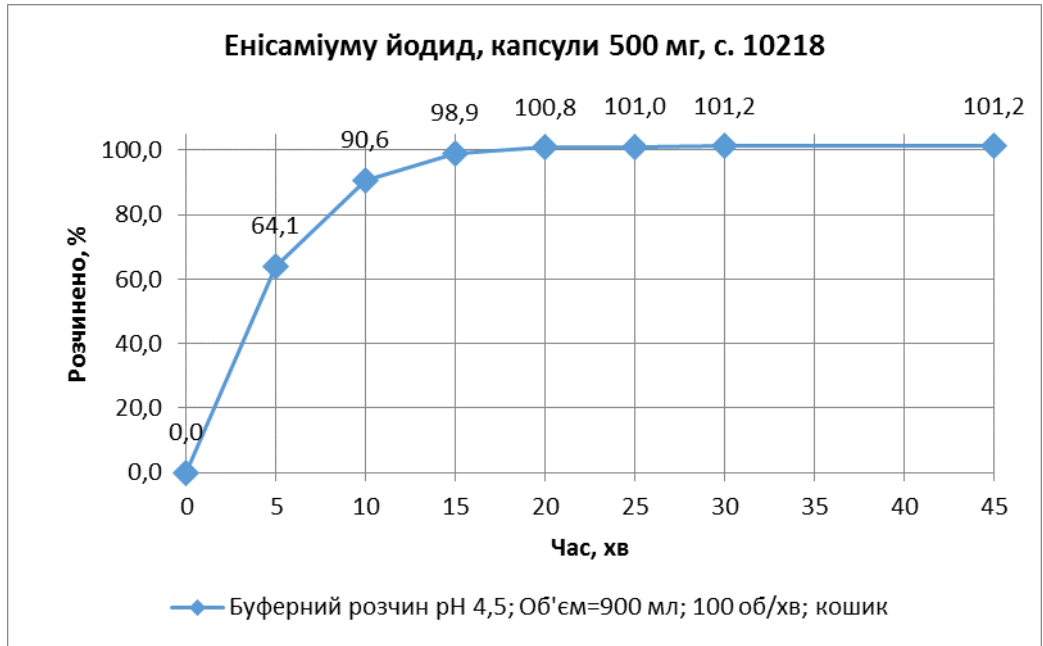


Рис. 5.10. Профілі розчинення енісаміуму йодиду із капсул в буферному розчині з рН 4,5

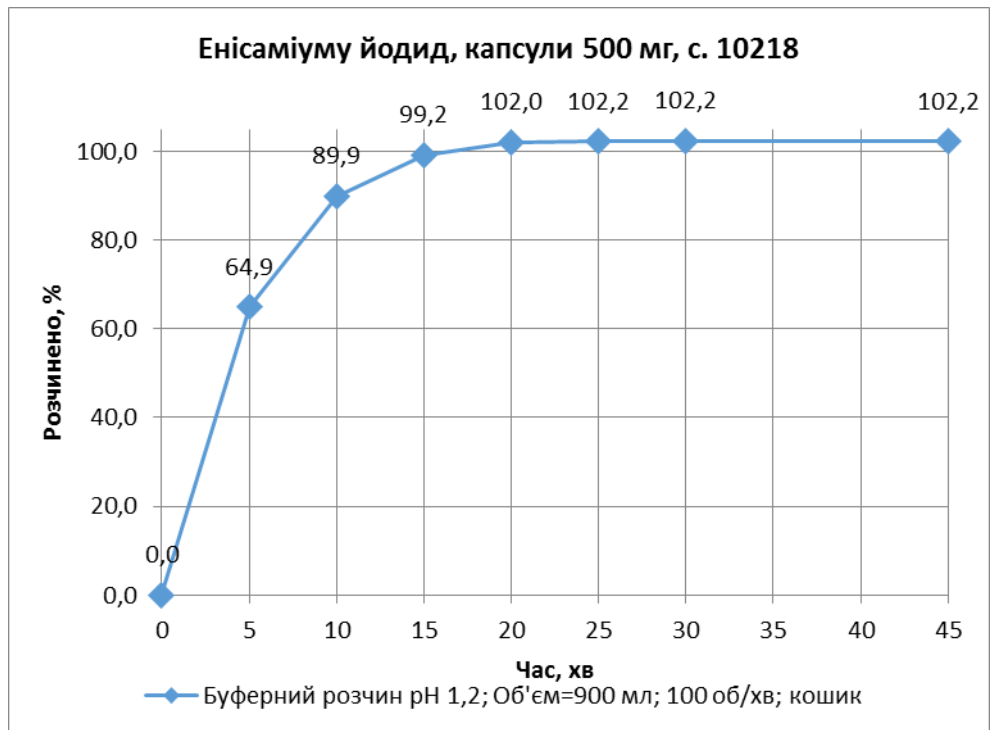


Рис. 5.11. Профілі розчинення енісаміуму йодиду із капсул в буферному розчині з рН 6,8

Із профілів розчинення капсул енісаміуму йодиду видно, що відсоток вивільнення активної речовини становить більше ніж 85 % у часовій точці 15 хв, у тому числі в середовищі розчинення з рН 1,2. На відміну від таблеток енісаміуму йодиду, капсули відповідно до БСК є дуже швидкорозчинними.

## ВИСНОВКИ

1. Розроблено методику кількісного визначення енісаміуму йодиду методом спектрофотометрії в капсулах, та продемонстровано, що оптимальна довжина хвилі становила 267 нм. В діапазоні концентрацій 0,016 – 0,024 мг/мл (80 % – 120 %) вивчено такі валідаційні характеристики методики: специфічність, правильність, прецизійність, лінійність, діапазон застосування, робасність, ВЛП у відповідності до рекомендацій ІСН. Коефіцієнт кореляції ( $r$ ) між введеним та знайденим значеннями для енісаміуму йодиду становив 0,99996, а відносний довірчий інтервал – ( $\Delta_z$ ) 0,23 %. Підтверджено стабільність розчинів при їх зберіганні при кімнатній температурі протягом 48 годин.

2. Проведено експериментальні дослідження, якими підтверджено, що методики контролю показників «Розчинення», «Супровідні домішки» та «Профілі розчинення», що розроблені для контролю якості таблеток, можуть бути застосовані для контролю якості капсул енісаміуму йодиду.

3. Проведено валідацію всіх розроблених методик контролю якості капсул енісаміуму йодиду.

4. Для ВЕРХ-методик підтверджена надійність хроматографічної методики, яка перевірялася за варіабельністю швидкості потоку рухомої фази, температури термостату колонки, складу рухомої фази, рН буферного розчину та застосуванням альтернативної хроматографічної колонки (колонки з іншим серійним номером).

За матеріалами розділу опубліковано роботи [168, 174].

## ЗАГАЛЬНІ 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 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).

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 Q3А та Q3В, вперше запропоновано нове нормування вмісту супровідних домішок в АФІ та ГЛФ енісаміуму йодиду, а саме: бензиламіну, бензиламід у ізонікотинової кислоти, ізонікотинової кислоти та неідентифікованих домішок, що можуть потенційно бути присутніми.

3. Вперше запропоновано чутливу, просту у виконанні методику ВЕРХ одночасного визначення бензиламіну, бензиламід у 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 підібраним складом рухомої фази з йон-парним реагентом натрію октансульфонату, а також з використанням колонки з сорбентом С18 150 мм х 4,6 мм, з розміром часток 5 мкм, двох довжин хвиль 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Principi N., Senatore L., Esposito S. Protection of young children from influenza through universal vaccination. *Hum Vaccin Immunother.* 2015. № 11. P. 2350-2358.
2. Paules C., Subbarao K. Influenza. *Lancet.* 2017. № 390. P. 697-708.
3. Socioeconomic impact of influenza on healthy children and their families / Principi N. et al. *Pediatr Infect Dis J.* 2003. Vol. 22, № 10. S. 207-210.
4. Chua J. V., Chen W. H. Bench-to-bedside review: vaccine protection strategies during pandemic flu outbreaks. *Crit Care.* 2010. № 14. P. 218.
5. Адаптована клінічна настанова, заснована на доказах ГРИП та гострі респіраторні інфекції / Голубовська О. А. та ін. 2014. *Додаток до наказу Міністерства охорони здоров'я України від 16.07.2014 № 499.* 109 с.
6. Razonable R. R. Antiviral Drugs for Viruses Other Than Human Immunodeficiency Virus. *Mayo Clin Proc.* 2011. Vol. 86, № 10. P. 1009-1026.
7. Davidson S. Treating Influenza Infection, From Now and Into the Future. *Front Immunol.* 2018. Vol. 10, № 9. P. 1946.
8. Drugs for Influenza Treatment: Is There Significant News? / Principi N. et al. *Front Med (Lausanne).* 2019. Vol. 28, № 6. P. 109.
9. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management / Hussain M. et al. *Infect Drug Resist.* 2017. Vol. 20, № 10. P. 121-134.
10. Rimantadine. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound-/rimantadine#section=Information-Sources>
11. Regional situation assessment-seasonal influenza. Influenza season 2019-2020: early situation assessment. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default-/files/documents/influenza-situation-assessment-18-December-2019.pdf>
12. Державний реєстр лікарських засобів. URL: <http://www.drlz.com.ua/>
13. Shie J. J., Fang J. M. Development of effective anti-influenza drugs: congeners and conjugates – a review. *J Biomed Sci.* 2019. Vol. 23, № 26 (1). P. 84.

14. Acylguanidine derivatives of Zanamivir and Oseltamivir: potential orally available Prodrugs against influenza viruses / Hsu P. H. et al. *Eur J Med Chem.* 2018. № 154. P. 314-323.

15. The use of antiviral drugs for influenza: Guidance for practitioners 2012/2013 / Aoki F. Y. et al. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2012. Vol. 23, № 4. P. e79-92.

16. Beran J., Šalapová E., Špajdel M. Isoprinosine Study (EWO ISO-2014/1) Team. Inosine pranobex is safe and effective for the treatment of subjects with confirmed acute respiratory viral infections: analysis and subgroup analysis from a Phase 4, randomised, placebo-controlled, double-blind study. *BMC Infect Dis.* 2016. Vol. 7, № 16 (1). P. 648.

17. Друге народження препарату Амизон®: результати міжнародних наукових досліджень підтверджують противірусну дію / Фролов А. Ф. та ін. *Український медичний часопис.* 2018. № 1 (4). С. 70-73.

18. Клинические аспекты применения амизона / Фролов А. Ф. та ін. *Український медичний часопис.* 2004. № 1. С. 69-74.

19. Фролов А. Ф., Фролов В. М. Эффективность Амизона в лечении и профилактике вирусных инфекций (к 10-летию применения препарата в клинической практике). *Український медичний часопис.* 2005. № 5 (49). С. 75.

20. Амизон: опыт применения в педиатрической практике. Фролов А. Ф. та ін. *Український медичний часопис.* 2000. № 2 (16). С. 97-100.

21. Марушко Ю. В., Сабадаш Е. Е. Клинико-экспериментальная характеристика препарата амизон и опыт его использования в клинической практике. *Здоровье ребенка.* 2015. № 6 (66). С. 51-6.

22. Ефективність застосування препарату «Амизончик» при гострих респіраторних захворюваннях у дітей віком 3-6 років / Марушко Ю. В. и др. *Современная педиатрия.* 2013. № 4 (52). С. 62-66.

23. Клиническая эффективность Амизона в терапии гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций Мельникова Т. И. и др. *Здоров'я України.* 2013. № 17 (318). С. 40-41.

24. Ольховская О. Н., Кузнецов С. В., Жаркова Т. С.. Эффективность применения препарата Амизончик в комплексной терапии детей, больных острыми респираторными вирусными инфекциями. *Педиатрия. Восточная Европа*. 2014. № 1. С. 92-99.

25. Antiviral activity of enisamium against influenza viruses in differentiated normal human bronchial epithelial cells / Boltz D. et al. *III antiviral congress*. Amsterdam, 2014. P. 12-14.

26. Antiviral effect of a derivative of isonicotinic acid enisamium iodide (FAV00A) against influenza virus / Boltz D. et al. *5th ISIRV AVG Conference*. Shanghai, 2017. P. 110.

27. Antiviral effect of a derivative of isonicotinic acid enisamium iodide (FAV00A) against influenza virus / Cocking D. et al. *Acta Virol*. 2018. Vol. 62, № 2. С. 191-195.

28. Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances [Internet]. Q6A. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland 1999. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical\\_en.pdf/](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-6-test-procedures-acceptance-criteria-new-drug-substances-new-drug-products-chemical_en.pdf/)

29. ICH Expert Working Group. Pharmaceutical Development Q8 (R2), ICH Harmonised Tripartite Guideline [Internet]. 2009. URL: [https://database.ich.org/sites/default/files/Q8\\_R2\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf).

30. Ekeblad P., Erne K. Non-aqueous acid-base titrations in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1954. Vol. 6, № 1. P. 433-439.

31. High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery / Attimarad M. et al. *Pharmaceutical methods*. 2011. Vol. 2, № 2. P. 71.

32. Farid N. F., Abdelaleem E. A. HPTLC method for the determination of paracetamol, pseudoephedrine and loratidine in tablets and human plasma. *Journal of chromatographic science*. 2016. Vol.12, № 54 (4). P. 647-652.



33. Chavhan M. L., Shirkhedkar A. A., Surana S. J. Development and validation of a stability indicating RP-TLC/densitometric method for determination of Loratadine in bulk and in tablets. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017. Vol. 1, № 10. S. 825-830.

34. Development and validation of a HPTLC method for analysis of Sunitinib malate / Hajmalek M. et al. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016. Vol. 52, № 4. P. 595-601.

35. Luitjen W. Gas Chromatography in the chemical and pharmaceutical industries. *Analisis*. 1998. Vol. 26, № 1. M. 24-27.

36. Gas chromatography. Monograph 2.2.28. European Pharmacopoeia. *Council of Europe*. 2017. № 1. P. 43-45.

37. Determination of residual solvents in linezolid by static headspace GC / Feng X. Z. et al. *Journal of chromatographic science*. 2015. Vol. 54, № 4. P. 487-491.

38. Optimization of HS-GC-FID-MS method for residual solvent profiling in active pharmaceutical ingredients using DoE / Poceva Panovska A. et al. *Journal of chromatographic science*. 2015. Vol. 54, № 2. P. 103-111.

39. Simultaneous Determination of Genotoxic Impurities in Fudosteine Drugs by GC-MS / Gooty A. R. et al. *Journal of chromatographic science*. 2016. Vol. 54, № 8. P. 1277-1281.

40. Determination of trace level genotoxic impurities in small molecule drug substances using conventional headspace gas chromatography with contemporary ionic liquid diluents and electron capture detection / Ho T. D. et al. *Journal of Chromatography A*. 2014. № 26 (1361). P. 217-228.

41. Chen L., Zhang W., Hu S. Determination of genotoxic epoxide at trace level in drug substance by direct injection GC/MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017. № 30 (146). P. 103-108.

42. Rapid and simultaneous determination of sulfonate ester genotoxic impurities in drug substance by liquid chromatography coupled to tandem mass

spectrometry: comparison of different ionization modes / Guo T. et al. *Journal of Chromatography A*. 2014. № 15 (1355). P. 73-79.

43. Novel sensitive determination method for a genotoxic alkylating agent, 4-chloro-1-butanol, in active pharmaceutical ingredients by LC-ICP-MS employing iodo derivatization Harigaya K. et al. *Analytical Sciences*. 2014. Vol. 30, № 3. P. 377-382.

44. Al Azzam K. M., Aboul-Enein H. Y. Recent advances in analysis of hazardous genotoxic impurities in pharmaceuticals by HPLC, GC, and CE. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2016. Vol. 39, № 1. P. 1-7.

45. Analytical method development and validation for determination of structure related genotoxic impurities in omeprazole drug by LC/MS / Chandra S. S. et al. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2016. № 5. P. 961-977.

46. Determination of five potential genotoxic impurities in dalfampridine using liquid chromatography / Jain M. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017. Vol. 30, № 133. P. 27-31.

47. Soni L. K., Sanjay J. Optimization and validation of RP-HPLC method for the estimation of meloxicam and paracetamol with its genotoxic impurity (p-amino phenol) in bulk and pharmaceutical drug product using PDA detector. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2016. Vol. 6, № 53. P. 21-26.

48. A Validated HPLC/MS Limit Test Method for a Potential Genotoxic Impurity in Cilostazol and its Quantification in the API and in the Commercially Available Drug Product / Bray L. et al. *Scientia pharmaceutica*. 2015. Vol. 83, № 2. P. 269.

49. A selective and sensitive pre-column derivatization HPLC method for the trace analysis of genotoxic impurity hydroxylamine in active pharmaceutical ingredients / Song M. et al. *Analytical Methods*. 2016. № 8 (47). P. 8352-8361.

50. Trace Level Quantification of the (–) 2-(2-amino-5-chlorophenyl)-4-cyclopropyl-1,1,1-trifluoro-3-butyn-2-ol Genotoxic Impurity in Efavirenz Drug

Substance and Drug Product Using LC–MS/MS / Jaishetty N. et al. *Scientia pharmaceutica*. 2015. Vol. 84, № 3. P. 456-66.

51. Identification and genotoxicity evaluation of two carbamate impurities in rasagiline / Sun Y. et al. *RSC Advances*. 2016. № 6 (108). P. 106268-106274.

52. Wang J., Yang S., Zhang K. A simple and sensitive method to analyze genotoxic impurity hydrazine in pharmaceutical materials. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2016. Vol. 15, № 126. P.141-147.

53. Rapid and Sensitive RP-HPLC Method for Determination of Potential Genotoxic Impurity in Dasatinib Drug Substance / Lanke S. V. et al. *International Journal of Chemical Sciences*. 2017. Vol. 15, № 4. P. 1-11.

54. Gangrade D., D'Souza J. A simple and sensitive rp-hplc method for trace-level quantification of methyl vinyl ketone, a potential genotoxic impurity, in drug substances. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017. Vol. 8, № 2. P. 706-712.

55. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method on core shell column for determination of degradation and process related impurities of apixaban-an anticoagulant drug / Landge S. B. et al. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2015. Vol. 06, № 06. P. 539-550.

56. Ramachandra B. Development of impurity profiling methods using modern analytical techniques. *Critical reviews in analytical chemistry*. 2017. Vol. 47, № 1. P. 24-36.

57. Development and validation of stability indicating HPLC method for determination of adrenaline tartrate / Kongkiatpaiboon S. et al. *Journal of King Saud University-Science*. 2017. Vol. 25.

58. Development and validation of a stability-indicating HPLC-UV method for the determination of Thiocolchicoside and its degradation products / Aprile S. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017. Vol. 5, № 132. P. 66-71.

59. Farid N. F., Abdelwahab N. S. Stability-indicating HPTLC method for studying stress degradation behavior of sulbutiamine HCl. *Journal of chromatographic science*. 2016. Vol. 11, № 54 (4). P. 609-617.

60. Abdulla S. A., Frag E. Y., Ahmed HE. Kinetic study of the alkaline degradation of imidapril hydrochloride using a validated stability indicating HPLC method. *RSC Advances*. 2016. Vol. 6, № 73. P. 69239-69250.

61. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs-A review / Blessy M. R. et al. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2014. Vol. 4, № 3. P. 159-65.

62. Development and validation of a stability indicating method for S-carboxymethyl-L-cysteine and related degradation products in oral syrup formulation / Fanigliulo A. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015. Vol. 10, № 115. P. 39-47.

63. Chen G., Svirskis D., Wen J. Development and validation of a stability indicating isocratic HPLC method for gemcitabine with application to drug release from poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles and enzymatic degradation studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2015. Vol. 67, № 11. P. 1528-1536.

64. Бернштейн Д. Полиморфизм молекулярных кристаллов. М. : Наука, 2007. 511 с.

65. Solid-state evaluation and polymorphic quantification of venlafaxine hydrochloride raw materials using the Rietveld method / Bernardi L. S. et al. *Talanta*. 2013. № 15 (117). P. 189-95.

66. Atici E. B., Karlığa B. Quantitative determination of two polymorphic forms of imatinib mesylate in a drug substance and tablet formulation by X-ray powder diffraction, differential scanning calorimetry and attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015. № 10 (114). P. 330-340.

67. Łaszcz M., Witkowska A. Studies of phase transitions in the aripiprazole solid dosage form. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2016. № 5 (117). P. 298-303.

68. Charoo N. A, Cristofolletti R., Kim S. K. Integrating biopharmaceutics risk assessment and in vivo absorption model in formulation development of BCS class I

drug using the QbD approach. *Drug development and industrial pharmacy*. 2017. Vol. 3, № 43 (4). P. 668-677.

69. Patel M. A., AbouGhaly M. H., Chadwick K. The discovery and investigation of a crystalline solid solution of an active pharmaceutical ingredient. *International journal of pharmaceutics*. 2017. Vol. 30, № 532 (1). P. 166-76.

70. Kommavarapu P., Maruthapillai A., Palanisamy K. Identification and quantitative determination of eletriptan hydrobromide polymorphs: Thermal, diffractometric and spectrometric studies. *Journal of Taibah University for Science*. 2015. Vol. 9, № 4. P. 586-593.

71. Estimating thermodynamic stability relationship of polymorphs of sofosbuvir / Qi M. H. et al. *Crystal Growth & Design*. 2015. Vol. 8, № 15 (10). P. 5062-5007.

72. Discriminatory dissolution method development and validation of etoricoxib tablets / Ashokraj Y. et al. *Dissolution Technol*. 2016. № 1. P. 30-34.

73. Investigating the discriminatory power of BCS-biowaiver in vitro methodology to detect bioavailability differences between immediate release products containing a class I drug / Colon-Useche S. et al. *Molecular pharmaceutics*. 2015. Vol. 26, № 12 (9). P. 3167-3174.

74. Meeting Report: Dissolution Testing: Current and Future Considerations / Santillo M. et al. *Dissolution Technologies*. 2017. Vol. 24, № 3. P. 62-68.

75. Cristofolletti R., Dressman J. B. Dissolution methods to increasing discriminatory power of in vitro dissolution testing for ibuprofen free acid and its salts. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2017. Vol. 106, № 1. P. 92-99.

76. Correlation of dissolution and disintegration results for an immediate-release tablet / Nickerson B. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2018. № 20 (150). P. 333-340.

77. Bredael G. M., Liang S., Hahn D. A Strategy for quality control dissolution method development for immediate-release solid oral dosage forms. *Dissolution Technologies*. 2015. Vol. 22, № 3. P. 10-16.

78. Biphasic dissolution method for quality control and assurance of drugs containing active substances in the form of weak acid salts / Franc A. et al. *Acta Pharmaceutica*. 2016. Vol. 66, № 1. P. 139-145.

79. Karkossa F., Klein S. Assessing the influence of media composition and ionic strength on drug release from commercial immediate-release and enteric-coated aspirin tablets. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017. Vol. 69, № 10. P. 1327-1340.

80. Use of bicarbonate buffer systems for dissolution characterization of enteric-coated proton pump inhibitor tablets / Shibata H. et al. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2016. Vol. 68, № 4. P. 467-474.

81. Development and validation of dissolution testings in acidic media for rabeprazole sodium delayed-release capsules / Tan Y. et al. *Drug development and industrial pharmacy*. 2016. Vol. 2, № 42 (10). P. 1669-1677.

82. Ultraviolet photolysis assisted mineralization and determination of trace levels of Cr, Cd, Cu, Sn, and Pb in isosulfan blue by ICP-MS / Dash K. et al. *Microchemical Journal*. 2011. Vol. 98, № 2. P. 312-316.

83. ICH guideline Q3D on elemental impurities [Internet]. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use\\_en-13.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-13.pdf).

84. 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.

85. Determination of toxic elements in tricyclic active pharmaceutical ingredients by ICP-MS: a critical study of digestion methods / Barin J. S. et al. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2014. Vol. 29, № 2. P. 352-358.

86. First experimental proof of asymmetric charge transfer in ICP-MS/MS (ICP-QQQ-MS) through isotopically enriched oxygen as cell gas / Böting K. et al. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2014. Vol. 29, № 3. P. 578-582.

87. Filipiak-Szok A, Kurzawa M, Szłyk E. Determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2015. № 1 (30). P. 54-58.

88. Flow injection combined with ICP-MS for accurate high throughput analysis of elemental impurities in pharmaceutical products according to USP< 232>/< 233 / Fischer L. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014. № 1 (95). P. 121-129.

89. Development and validation of an ICP-MS method for the determination of elemental impurities in TP-6076 active pharmaceutical ingredient (API) according to USP< 232>/< 233 / Chahrour O. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017. № 25 (145). P. 84-90.

90. Recent advances in quantitative LA-ICP-MS analysis: challenges and solutions in the life sciences and environmental chemistry / Limbeck A. et al. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2015. Vol. 1, № 407 (22). P. 6593-6617.

91. Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry (MIP OES) and Standard Dilution Analysis to Determine Trace Elements in Pharmaceutical Samples / Althoff A. G. et al. *Applied spectroscopy*. 2017. Vol. 71, № 12. P. 2692-2698.

92. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements / Muller A. L. et al. *Talanta*. 2015. № 1 (136). P. 161-169.

93. Rudovica V., Viksna A., Actins A. Application of LA-ICP-MS as a rapid tool for analysis of elemental impurities in active pharmaceutical ingredients. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2014. Vol. 25, № 91. P. 119-122.

94. Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters. / Støving C. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2013. № 84. P. 209-214.

95. Element determination in pharmaceuticals using direct solid analysis-electrothermal vaporization inductively coupled plasma optical emission

spectrometry / Kaczala S. et al. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2015. Vol. 26, № 3. P. 475-483.

96. Pharmacopeial requirements for elemental impurities: a novel approach to the trace determination of osmium by oxidative pressure vessel sample digestion and measurement using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after complexation and stabilisation / Venzago C. et al. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2013. Vol. 28, № 7. P. 1125-1129.

97. Potential metal impurities in active pharmaceutical substances and finished medicinal products-A market surveillance study / Wollein U. et al. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015. Vol. 18, № 77. P. 100-105.

98. Determination of Nickel and Manganese Contaminants in Pharmaceutical Iron Supplements Using Energy Dispersive X-ray Fluorescence / Cardoso P. et al. *Applied spectroscopy*. 2017. Vol. 71, № 3. P. 432-437.

99. Direct determination of cadmium and lead in pharmaceutical ingredients using anodic stripping voltammetry in aqueous and DMSO/water solutions / Rosolina S. M. et al. *Analytica chimica acta*. 2015. Vol. 17, № 893. P. 25-33.

100. Determination of palladium, platinum and rhodium in used automobile catalysts and active pharmaceutical ingredients using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis / Resano M. et al. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2015. № 105. P. 38-46.

101. Direct determination of chromium in empty medicine capsules by tungsten coil atomic emission spectrometry / Goncalves D. A. et al. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2015. Vol. 30, № 6. P. 1395-1399.

102. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review / Barin J. S. et al. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2016. Vol. 408, № 17. P. 4547-4566.

103. Near infra red spectroscopy: a tool for solid state characterization / Chavan R. B. et al. *Drug discovery today*. 2017. Vol. 22, № 12. P. 1835-1843.



104. Quantitative analysis of mebendazole polymorphs in pharmaceutical raw materials using near-infrared spectroscopy / Da Silva V. H. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015. Vol. 10, № 115. P. 587-593.

105. Da Silva V. H., da Silva J. J., Pereira C. F. Portable near-infrared instruments: Application for quality control of polymorphs in pharmaceutical raw materials and calibration transfer. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017. Vol. 5, № 134. P. 287-294.

106. In-line monitoring and optimization of powder flow in a simulated continuous process using transmission near infrared spectroscopy / Alam M. A. et al. *International journal of pharmaceutics*. 2017. Vol. 30, № 526 (1-2). P. 199-208.

107. Development, validation and comparison of near infrared and Raman spectroscopic methods for fast characterization of tablets with amlodipine and valsartan / Casian T. et al. *Talanta*. 2017. Vol. 15, № 167. P. 333-343.

108. Active content determination of pharmaceutical tablets using near infrared spectroscopy as Process Analytical Technology tool / Chavez P. F. et al. *Talanta*. 2015. № 144. P. 1352-1359.

109. Quality assessment of pharmaceutical tablet samples using Fourier transform near infrared spectroscopy and multivariate analysis. / Kandpal L. M. et al. *Infrared Physics & Technology*. 2017. № 85. P. 300-306.

110. Tewari J, Strong R, Boulas P. At-line determination of pharmaceuticals small molecule's blending end point using chemometric modeling combined with Fourier transform near infrared spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017. Vol. 15, № 173. P. 886-891.

111. Estimation of the critical quality attributes for hydroxypropyl methylcellulose with near-infrared spectroscopy and chemometrics / Guo Q. et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2017. Vol. 15, № 177. P. 158-163.

112. Near infrared spectroscopy for counterfeit detection using a large database of pharmaceutical tablets / Dégardin K. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2016. Vol. 5, № 128. P. 89-97.

113. A robust quantitative near infrared modeling approach for blend monitoring / Mohan S. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2018. Vol. 30, № 148. P. 51-57.

114. Determining particle size and water content by near-infrared spectroscopy in the granulation of naproxen sodium / Bär D. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2018. Vol. 20, № 151. P. 209-218.

115. Detailed analysis of the online near-infrared spectra of pharmaceutical blend in a rotary tablet press feed frame / Šašić S. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015. Vol. 25, № 103. P. 73-79.

116. Qualitative and simultaneous quantitative analysis of cimetidine polymorphs by ultraviolet-visible and shortwave near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and multivariate calibration models / Feng Y. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015. Vol. 10, № 104. P. 112-121.

117. Prediction of dissolution profiles by non-destructive near infrared spectroscopy in tablets subjected to different levels of strain / Hernandez E. et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2016. Vol. 5, № 117. P. 568-576.

118. Srivastava H. K., Wolfgang S., Rodriguez J. D. Expanding the analytical toolbox for identity testing of pharmaceutical ingredients: Spectroscopic screening of dextrose using portable Raman and near infrared spectrometers. *Analytica chimica acta*. 2016. Vol. 31, № 914. P. 91-99.

119. Smetiško J, Miljanić S. Dissolution assessment of allopurinol immediate release tablets by near infrared spectroscopy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017. Vol. 25, № 145. P. 322-330.

120. Schlegel L. B., Schubert-Zsilavec M., Abdel-Tawab M. Quantification of active ingredients in semi-solid pharmaceutical formulations by near infrared spectroscopy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017. Vol. 5, № 142. P. 178-189.

121. Кушнірук В. М., Георгіянц В. А., Бевз Н. Ю. Розробка та валідація методики кількісного визначення амізону : збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. 2015. № 24 (5). С. 332-336.

122. Structure and antiinflammatory activity of isonicotinic and nicotinic amides / Bukhtiarova T. A. et al. *Pharmaceutical chemistry journal*. 1997. Vol. 31, № 11. P. 597-599.

123. Георгіянц В. А., Кушнірук В. Н., Гарная Н. В. Валідація методики определения сопутствующих примесей в капсулах, содержащих амизон. *Республиканский научный журнал*. 2014. № 3 (68). P. 27-30.

124. Кількісне визначення амізону в плазмі крові методом високоефективної рідинної хроматографії / Ільченко О. В. та ін. *Медична хімія*. 2007. № 2 (9). P. 130-132.

125. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1) [Internet]. Geneva; 2005. P. 11-12. URL: [http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2\(R1\).PDF](http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/Q2(R1).PDF)

126. Георгієвський В. П. Аналітична хімія у створенні, стандартизації та контролі якості лікарських засобів : у 3-х т. X. : Вид-во «НТМТ», 2011. 520 с.

127. Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств. X. : «НТМТ», 2011. Т. 1. С. 934-1063.

128. Гризодуб А. И., Левашова О. Л., Борщевский Г. И. Стандартизованная процедура валидации методик атомно-абсорбционного количественного определения лекарственных средств в варианте калибровочного графика. *Фармаком*. 2011. № 4. С. 5-26.

129. Борщевский Г. И., Гризодуб А. И., Шевина В. Л. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения суммарных препаратов в варианте калибровочного графика. *Фармаком*. 2013. № 3. С. 24-33.

130. Стандартизована процедура валидації методики кількісного визначення при дослідженні біоеквівалентності *in vitro* / Гризодуб А. І. і др. *Фармаком.* 2013. № 4. С. 36-50.

131. Гризодуб А. І. Стандартизовані процедури валидації методик контролю якості ЛС. *Фармація Казахстан.* 2014. № 12. С. 18-25.

132. Стандартизована процедура валидації спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських засобів в варіанті методу показателя поглинання. Сообщение 1 / Гризодуб А. І. і др. *Фармаком.* 2014. № 1. С. 29-39.

133. Стандартизована процедура валидації спектрофотометричних методик кількісного визначення лікарських засобів в варіанті методу показателя поглинання. Сообщение 2. / Гризодуб А. І. і др. *Фармаком.* 2014. № 2. С. 45-53.

134. Гризодуб А. І. Стандартизовані процедури валидації методик контролю якості лікарських засобів. Х. : ГП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. 396 с.

135. Гризодуб А. І. Стандартні процедури валидації методик контролю якості лікарських засобів. *Фармаком.* 2006. № 1-2. С. 3-44.

136. Інструкції застосування препаратів, що доступні на офіційному сайті Державного експертного центру МОЗ України [Інтернет]. К. : Видавнича служба МОЗ України, 2004. URL: <http://mozdocs.kiev.ua>.

137. Лекарственное средство в виде таблеток, обладающее противовирусным и интерферогенным действием, и способ его получения : патент Российской Федерации 2449792 / Нестеренко Н. А. и др. 2012.

138.  $\alpha$ -Кристалічна форма карбабензпіриду : патент України 104102 / Жебровська Ф. І. та ін. 2013.

139. Георгиянц В. А., Кушнирук В. Н., Гарная Н. В. Обоснование выбора растворителя при промышленном производстве субстанции йодметилата бензиламида изоникотиновой кислоты. *Запорожский медицинский журнал.* 2014. № 4 (85). С. 86-89.

140. Способ получения N-метил-4-бензилкарбамидопиридиния йодида : патент Российской Федерации 2429230 / Сысолятин С. В. И др. 2011.

141. 4-(n-Бензил) амінокарбоніл-1-метилпіридиній йодид – знеболуючий засіб з інтерферогенними, протизапальними та жарознижуючими властивостями : патент України 6752 / Тринус Ф. П. и др. 1994.

142. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System [Internet]. 2000. URL: <http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/3618FNL.PDF>.

143. 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.

144. Коваленко Н. В. Компендиум – лекарственные препараты [Интернет]. К. : МОРИОН, 2016. 2416 с. URL: <http://compendium.com>.

145. Пономаренко С. А., Смоленков А. Д., Шпигун О. А. Закономерности удерживания 1,1-диметилгидразина и продуктов его разложения на силикагелях с привитыми алкильными группами в режиме ион-парной хроматографии. *Журнал физической химии*. 2009. № 3, С. 565-774.

146. Cecchi T., Pucciarelli F., Passamonti P. Extended thermodynamic approach to ion interaction chromatography. *Analytical chemistry*. 2001. Vol. 73, № 11. P. 2632-2639.

147. Guideline I. H. Photostability testing of new drug substance and products. *Fed. Register*. 1996. № 62. P. 27115-27122.

148. Бурмака О. В., Гуреева 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.

149. Державна Фармакопея України. 2-е вид. Х. : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2015. Т. 1. 1135 с

150. Державна Фармакопея України. 2-е вид. Х. : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2015. Т. 1. С. 891-893.

151. Державна Фармакопея України. 2-е вид. Х. : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2015. Т. 1. С. 924-925.

152. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Impurities in New Drug Substances Q3A(R2) [Internet]. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 2006. URL: [https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A\\_R2\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A_R2_Guideline.pdf).

153. Бурмака О. В., Гуреєва С. М., Маргітич В. М. Валідація методики визначення супровідних домішок в активній речовині противірусного засобу енісаміуму йодиду. *Запорозький медичинський журнал*. 2018. № 5. С. 708-716.

154. Бурмака А. В., Гуреева С. Н., Маргитич В. М. Разработка методики контроля сопутствующих примесей субстанции энисамиума йодида. *Фармаком*. 2017. № 3. С. 17-25.

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

156. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability / Amidon G. L. et al. *Pharmaceutical research*. 1995. Vol. 12, № 3. P. 413-420.

157. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for

Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System [Internet]. 2015. URL: [https://www.fip.org/files/fip/BPS/BCS/Biowaiver\\_guidance\\_revision\\_2015.pdf](https://www.fip.org/files/fip/BPS/BCS/Biowaiver_guidance_revision_2015.pdf).

158. Biopharmaceutic classification system: a scientific framework for pharmacokinetic optimization in drug research / Varma M. V. et al. *Current drug metabolism*. 2004. Vol. 1, № 5 (5). P. 375-388.

159. Lindenberg M., Kopp S., Dressman J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004. Vol. 58, № 2. P. 265-278.

160. Lennernäs H., Abrahamsson B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2005. Vol. 57, № 3. P. 273-285.

161. How multi-organ microdevices can help foster drug development / Esch M. B. et al. *Advanced drug delivery reviews*. 2014. Vol. 20, № 69. P. 158-169.

162. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics / Sambuy Y. et al. *Cell biology and toxicology*. 2005. Vol. 21, № 1. P. 1-26.

163. A new approach to predict human intestinal absorption using porcine intestinal tissue and biorelevant matrices / Westerhout J. et al. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014. Vol. 15, № 63. P. 167-77.

164. Validation of a differential in situ perfusion method with mesenteric blood sampling in rats for intestinal drug interaction profiling / Brouwers J. et al. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2010. Vol. 31, № 5-6. P. 278-85.

165. Butler J. M., Dressman J. B. The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2010. Vol. 99, № 12. P. 4940-54.

166. Kansy M., Senner F., Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive

absorption processes. *Journal of medicinal chemistry*. 1998. Vol. 26, № 41 (7). P. 1007-10.

167. In Vitro Bioavailability Study of an Antiviral Compound Enisamium Iodide / Haltner-Ukomadu E. et al. *Scientia Pharmaceutica*. 2018. Vol. 11, № 86 (1). P. 3.

168. Бурмака О. В., Гурєєва С. М., Маргітич В. М. Розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах. *Фармацевтичний часопис*. 2017. № 2 (42). С. 64-71.

169. 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.

170. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on the investigation of bioequivalence [Internet]. London : European Medicines Agency, 2010. URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf).

171. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. *European Pharmacopoeia*. 9th ed. 2016. Vol. 1. 1615 p.

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

173. Георгиевский В. П., Казаринов Н. А. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств. Х. : НТМТ, 2011. 1440 с.

174. Бурмака О. В., Гурєєва 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.

## Додаток А

**Середні значення площ піків, що отримані при валідації методики  
визначення супровідних домішок в АФІ енісаміуму йодид**

Таблиця А.1

**Валідаційний параметр «Лінійність»**

Концентрація аналіту у модельній суміші відносно концентрації в розчині порівняння, % (модельні суміші)	Середнє значення площ піків, mAU×min			
	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміуму
0,010	6,3	3,2	7,6	4,1
0,020	12,4	6,4	14,8	8,3
0,030	18,8	9,7	23,0	11,9
0,040	26,0	13,2	30,0	16,1
0,050	31,9	16,1	37,8	20,0
0,060	38,2	19,1	43,5	24,0
Розчин порівняння	31,4	16,0	37,0	39587,0

Таблиця А.2

**Валідаційний параметр «Правильність»**

Концентрація аналіту у модельній суміші відносно концентрації у розчині порівняння, % (модельні суміші)	Середнє значення площ піків, mAU×min			
	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміуму
1	2	3	4	5
0,030	19,1	9,7	23,2	12,3
	19,5	9,9	23,3	12,4
	19,3	9,9	22,5	12
0,050	31,9	16,2	37,2	19,9
	31,8	16,0	37,9	20,1

Продовж. дод. А

Продовж. табл. А.1

1	2	3	4	5
	32,2	16,1	37,7	19,7
0,060	38,5	19,2	44,1	24
	38,4	19,3	44,8	23,7
	37,9	19	44,2	23,3
Розчин порівняння	31,4		37,0	39587,0

Таблиця А.3

**Валідаційний параметр «Точність»**

Аналітик	Середнє значення площ піків, mAU×min				
	номер зразка	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміум
Перший	1	31,7	16,2	37,2	20
	2	32,2	16,1	37,1	19,7
	3	31,6	16,2	38,1	19,6
	4	32,3	16,3	37,8	19,7
	5	32,2	16,1	37,3	19,7
	6	31,6	16,1	37,9	19,5
	Розчин порівняння	31,4	16,0	37,0	39590
Другий	1	31,1	16,4	37,1	20,1
	2	32	16,1	37,2	19,8
	3	31,9	16,3	37,8	19,6
	4	31,1	16,4	37,7	19,9
	5	31,2	16	37,2	19,7
	6	31	16,1	38	19,5
	Розчин порівняння	31,2	16,1	37,2	39582

Продовж. дод. А

Таблиця А.4

## Валідаційний параметр «Робасність»

Умови, що змінюються		Середнє значення площ піків, mAU×min (випробовуваний розчин/розчин порівняння)			
		БА	ІНК	БАІНК	Енісаміум
Швидкість потоку рухомої фази, в мл/хв	0,45	35,1/35,2	22,1/22,0	40,2/41,4	27,6/28,7
	0,50	32,4/32,6	19,0/19,9	37,0/37,1	20,4/20,3
	0,55	29,1/29,6	18,1/18,4	33,2/33,9	18,7/19,0
Температура термостату колонки, в °С	25	32,0/32,0	18,4/18,4	37,1/37,3	27,3/28,0
	30	32,2/32,1	19,0/19,9	37,2/37,1	20,2/20,1
	35	31,1/31,5	17,1/17,7	37,3/37,7	34,0/35,1
Склад рухомої фази: буферний розчин рН 2,5:вода:ацетонітрил (об/об/об)	28:44:28	32,3/32,1	23,1/23,1	33,2/33,6	23,8/23,3
	30:44:26	32,0/32,1	19,4/19,9	37,0/37,1	20,2/20,1
	32:44:24	31,8/32,5	18,1/18,5	35,1/35,7	27,4/28,2
рН буферного розчину	2,4	31,0/31,3	19,0/19,4	36,0/36,4	38,0/39,2
	2,5	32,1/32,2	19,2/19,9	37,2/37,2	19,6/20,2
	2,6	31,2/31,7	20,1/20,9	38,1/38,9	48,2/48,0
Серійний номер хроматографічної колонки	В16099	32,1/32,6	17,0/17,7	37,0/37,0	20,4/20,3
	USYT001583	32,2/32,3	19,3/19,9	37,0/37,1	19,5/20,0

## Додаток Б

**Середні значення площ піків, що отримані при валідації методики  
кількісного визначення енісаміуму йодиду в АФІ**

Таблиця Б.1

**Валідаційний параметр «Лінійність»**

Концентрація енісаміуму йодиду у модельній суміші відносно розчину порівняння, %	Середнє значення площ піків енісаміуму, mAU×min
80,0	7898,3
85,0	8375,5
90,0	8856,7
95,0	9371,4
100,0	9838,8
105,0	10342,7
110,0	10818,9
115,0	11348,4
120,0	11825,7
Розчин порівняння	9860,5

Таблиця Б.2

**Валідаційний параметр «Правильність»**

Концентрація енісаміуму йодиду у модельній суміші відносно розчину порівняння, %	Середнє значення площ піків енісаміуму, mAU×min
1	2
80,0	7919,0
80,0	7890,4
80,0	7869,7

Продовж. дод. Б

Продовж. табл. Б.2

1	2
100,0	9858,5
100,0	9863,5
100,0	9872,3
120,0	11845,4
120,0	11797,1
120,0	11848,4
Розчин порівняння	9860,5

Таблиця Б.3

**Валідаційний параметр «Точність»**

Аналітик	Номер зразка	Середнє значення площ піків енісаміуму, mAU×min
Аналітик 1	1	9870,4
	2	9840,8
	3	9880,2
	4	9870,4
	5	9890,1
	6	9899,9
	Розчин порівняння	9860,5
Аналітик 2	1	9843,2
	2	9823,5
	3	9843,2
	4	9853,0
	5	9813,6
	6	9823,4
	Розчин порівняння	9843,2

Продовж. дод. Б

Таблиця Б.4

## Валідаційний параметр «Робасність»

Умови, що змінюються		Середнє значення площ піків енісаміуму, mAU×min	
		Випробовуваний розчин	Розчин порівняння
Швидкість потоку рухомої фази, в мл/хв	0,45	1015,8	1017,8
	0,50	9865,8	9846,1
	0,55	8813,0	8804,2
Температура термостату колонки, в °С	25	9866,8	9837,3
	30	9855,9	9846,1
	35	9820,3	9849,8
Склад рухомої фази: буферний розчин рН 2,5:вода:ацетонітрил (об/об/об)	28:44:28	9734,2	9734,2
	30:44:26	9875,6	9846,1
	32:44:24	1036,5	1037,5
рН буферного розчину	2,4	9803,6	9833,1
	2,5	9865,8	9846,1
	2,6	9862,0	9852,1
Серійний номер хроматографічної колонки	B16099	9875,6	9846,1
	USYT001583	9766,2	9785,8

## Додаток В

**Середні значення абсорбції, що отримані при валідації методики  
кількісного визначення енісаміуму йодиду в таблетках**

Таблиця В.1

**Валідаційний параметр «Лінійність»**

Концентрація енісаміуму йодиду у модельній суміші відносно розчину порівняння, %	Абсорбція розчину, абсорбційні одиниці
80,0	0,3452
85,0	0,3675
90,0	0,3883
95,0	0,4106
100,0	0,4314
105,0	0,4521
110,0	0,4751
115,0	0,4964
120,0	0,5189
Розчину порівняння	0,4322

Таблиця В.2

**Валідаційний параметр «Правильність»**

Концентрація енісаміуму йодиду у модельній суміші відносно розчину порівняння, %	Абсорбція розчину, абсорбційні одиниці
1	2
80,0	0,3581
80,0	0,3575
80,0	0,3555



Продовж. дод. В

Продовж. табл. В.2

1	2
100,0	0,4432
100,0	0,4468
100,0	0,4428
120,0	0,5328
120,0	0,5320
120,0	0,5312
Розчин порівняння	0,4440

Таблиця В.3

**Валідаційний параметр «Точність»**

Аналітик	Номер зразка	Абсорбція розчину, абсорбційні одиниці
Аналітик 1	1	0,4355
	2	0,4248
	3	0,4239
	4	0,4335
	5	0,4322
	6	0,4320
	Розчин порівняння	0,4377
Аналітик 2	1	0,4450
	2	0,4380
	3	0,4350
	4	0,4409
	5	0,4390
	6	0,4395
	Розчин порівняння	0,4498

Продовж. дод. В

Таблиця В.4

## Валідаційний параметр «Стабільність розчинів»

Назва розчину	Часова точка контролю, год	Абсорбція розчину, абсорбційні одиниці
Розчин порівняння	0	0,4419
	12	0,4455
	24	0,4446
	48	0,4482
Випробовуваний розчин	0	0,4306
	12	0,4332
	24	0,4321
	48	0,4374

Таблиця В.5

## Валідаційний параметр «Робасність»

Умови, що змінюються		Абсорбція розчину, абсорбційні одиниці	
		Випробовуваний розчин	Розчин порівняння
Зміна довжини хвилі детектування, в нм	265	0,4356	0,4394
	267	0,4385	0,4399
	269	0,4340	0,4362
Зміна концентрації компенсаційного розчину, розчин хлористоводневої кислоти	0,09 М	0,4377	0,4380
	0,10 М	0,4385	0,4399
	0,11 М	0,4380	0,4377

## Додаток Д

**Середні значення абсорбції, що отримані при валідації методики вивчення  
«Розчинення» капсул енісаміуму йодиду**

Таблиця Д.1

**Валідаційний параметр «Лінійність»**

Концентрація енісаміуму йодиду у модельній суміші відносно розчину порівняння, %	Абсорбція розчину, абсорбційні одиниці
50,0	0,2215
60,0	0,2641
70,0	0,3075
80,0	0,3545
90,0	0,3975
100,0	0,4421
110,0	0,4835
120,0	0,5349
130,0	0,5732
Розчин порівняння	0,4425

Таблиця Д.2

**Валідаційний параметр «Правильність»**

Концентрація енісаміуму йодиду у модельній суміші відносно розчину порівняння, %	Абсорбція розчину, абсорбційні одиниці
1	2
50,0	0,2215
50,0	0,2201
50,0	0,2190
100,0	0,4401

Продовж. дод. Д

*Продовж. табл. Д.2*

1	2
100,0	0,4442
100,0	0,4431
130,0	0,5719
130,0	0,5768
130,0	0,5753
Розчин порівняння	0,4425

*Таблиця Д.3***Валідаційний параметр «Точність»**

Аналітик	Номер зразка	Абсорбція розчину, абсорбційні одиниці
Аналітик 1	1	0,4397
	2	0,4321
	3	0,4284
	4	0,4382
	5	0,4363
	6	0,4325
	Розчин порівняння	0,4425
Аналітик 2	1	0,4329
	2	0,4300
	3	0,4245
	4	0,4310
	5	0,4320
	6	0,4305
	Розчин порівняння	0,4420

Продовж. дод. Д

Таблиця Д.4

**Валідаційний параметр «Стабільність розчинів»**

Назва розчину	Часова точка контролю, год	Абсорбція розчину, абсорбційні одиниці
Розчин порівняння	0	0,4421
	12	0,4445
	24	0,4432
	48	0,4501
Випробовуваний розчин	0	0,4319
	12	0,4321
	24	0,4347
	48	0,4398

Таблиця Д.5

**Валідаційний параметр «Робасність»**

Умови, що змінюються		Абсорбція розчину, абсорбційні одиниці	
		Випробовуваний розчин	Розчин порівняння
Зміна довжини хвилі детектування, в нм	265	0,4346	0,4385
	267	0,4381	0,4387
	269	0,4353	0,4352
Зміна концентрації компенсаційного розчину, розчин хлористоводневої кислоти	0,09 М	0,4364	0,4390
	0,10 М	0,4381	0,4387
	0,11 М	0,4389	0,4376

## Додаток Е.1



27.02.2020 № 19/1963

На № \_\_\_\_\_ від \_\_\_\_\_

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Технічний директор

АТ «Фармак»

*(Handwritten signature)*  
 А.М. Гой  
 « 21 » \_\_\_\_\_ 2020 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результати наукових досліджень співробітника АТ «Фармак» **Бурмаки Олексія Васильовича** (начальник сектора міжнародної регуляції, відділу фармацевтичної регуляції АТ «Фармак»), який є здобувачем кафедри управління та економіки фармації з технологією ліків Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України були покладені в основу проектів методів контролю якості (МКЯ) на активний фармацевтичний інгредієнт енісаміум йодид та його готові лікарські форми (таблетки та капсули).

Розроблені **Бурмакою Олексієм Васильовичем** методики високоефективної рідинної хроматографії (кількісного визначення, визначення супровідних домішок) включені до МКЯ на АФІ енісаміум йодид (номер реєстраційного посвідчення UA/15007/01/01).

До МКЯ на таблетки (0,125 г та 0,25 г) енісаміуму йодиду та капсули енісаміуму йодиду 500 мг включені спектрофотометричні методики (кількісне визначення, визначення розчинення) та хроматографічна методика (ВЕРХ) визначення супровідних домішок (номер реєстраційного посвідчення для таблеток 0,125 г UA/6493/01/02, номер реєстраційного посвідчення для таблеток 0,25 г UA/6493/01/01, номер реєстраційного посвідчення для капсул 500 мг UA/12415/01/01). Розроблені **Бурмакою Олексієм Васильовичем** методики відповідають вимогам Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів для людини (ICH).

Начальник,  
АТ «Фармак»,  
д. фарм. наук

*(Handwritten signature)*

С.М. Гурєєва

Керівник Департаменту  
досліджень та розробки  
АТ «Фармак»

*(Handwritten signature)*

Р.О. Смішко

00056662

## Додаток Е.2

ЗАТВЕРДЖЕНО

Наказ Міністерства охорони  
здоров'я України

28.03.2016 № 273

Реєстраційне посвідчення

№ UA/15007/01/01

Заявник, країна ПАТ «Фармак», Україна

Виробник, країна ПАТ «Фармак», Україна

**МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ  
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ****Amizon®  
(Enisamium iodide)****Амізон®  
(Енісаміум йодид)**

Кристалічний порошок (субстанція)

У мішках подвійних поліетиленових  
для фармацевтичного застосування**КОНТРОЛЬНИЙ**Методи контролю якості  
лікарського засобу  
відповідають матеріалам  
реєстраційного доось

Продовж. дод. Е.2

16

### УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

Зберігати в оригінальній упаковці при температурі не вище 25 °С.

### ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

2 роки.

Керівник ДзБТ



М.І. Борщевська  
» 01 2016 р.

Копія вірна

КОНТРОЛЬНИЙ

Методи контролю якості  
лікарського засобу  
відповідають матеріалам  
реєстраційного досьє



## Додаток Е.3

**ЗАТВЕРДЖЕНО**

Наказ Міністерства охорони  
здоров'я України  
28.04.2012 № 318  
Ресстраційне посвідчення  
№ UA/6493/01/02

**ЗМІНИ ВНЕСЕНО**  
Наказ Міністерства охорони  
здоров'я України  
02.10.2019 № 2004

Заявник, країна                    ПАТ «Фармак», Україна  
Виробник, країна                ПАТ «Фармак», Україна

**МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ  
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ****Amizon®****Амізон®**

таблетки, вкриті оболонкою, по 0,125 г

По 10 або 20 таблеток у блістері

По 1 блістеру в пачці



Продовж. дод. Е.3

9

### УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

Зберігати в захищеному від світла місці при температурі не вище 25 °С.

### ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ

3 роки.

Керівник ДДгаР



Р. О. Смішко  
«7» 08 2019 р.

Копія вірна:



## Додаток Е.4

<b>Заявитель, страна</b>	<b>Публичное акционерное общество «Фармак», Украина</b>
<b>Производитель, страна</b>	<b>Публичное акционерное общество «Фармак», Украина</b>

**АНАЛИТИЧЕСКАЯ НОРМАТИВНАЯ  
ДОКУМЕНТАЦИЯ  
(ДЛЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ)**

**Amizon**  
**Амизон®**

таблетки, покрытые оболочкой,  
по 0,125 г и 0,25 г

По 10 или 20 таблеток в блистере

По 1 блистеру в пачке

## Продовж. дод. Е.4

13

- $n$  – количество таблеток, взятых для испытания;
- $m_0$  – масса навески амизона, взятого для приготовления раствора сравнения, в граммах;
- $P$  – содержание основного вещества в амизоне в пересчете на сухое вещество, взятом для приготовления раствора сравнения, в процентах;
- $W_0$  – потеря в массе при высушивании образца амизона, взятого для приготовления раствора сравнения, в процентах.

Содержание амизона ( $C_{14}H_{15}IN_2O$ ) в одной таблетке должно быть от 0,119 г до 0,131 г (для таблеток с дозировкой 0,125 г).

Содержание амизона ( $C_{14}H_{15}IN_2O$ ) в одной таблетке должно быть от 0,238 г до 0,263 г (для таблеток с дозировкой 0,25 г).

**Примечание.** Реактивы, титрованные растворы и индикаторы, приведенные в этой АНД, описаны в соответствующих разделах ГФ РБ\*.

**УПАКОВКА**

По 10 или 20 таблеток в блистере из пленки поливинилхлоридной бесцветной и фольги алюминиевой печатной лакированной.

По 1 блистеру вместе с инструкцией по медицинскому применению (листком-вкладышем) помещают в пачку из картона.

**МАРКИРОВКА**

Соответствует предоставленному графическому изображению упаковки.

**УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ**

Хранить в защищенном от света месте при температуре не выше 25 °С.

**СРОК ГОДНОСТИ**

3 года.

Начальник ЦЛФР, д.фарм.н



С. Н. Гурсева

2018 г.

## Додаток Е.5

**ЗАТВЕРДЖЕНО**

Наказ Міністерства охорони  
здоров'я України  
26.07.2012 № 568

Реєстраційне посвідчення  
№ UA/12415/01/01

**ЗМІНИ ВНЕСЕНО**

Наказ Міністерства охорони  
здоров'я України

20.03.2017 № 295

Заявник, країна ПАТ «Фармак», Україна

Виробник, країна ПАТ «Фармак», Україна

**МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ  
ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ**

**Amizon® MAX**

**Амізон® МАКС**

капсули 0,5 г

По 10 капсул у блістері

По 1 блістеру у пачці

КОНТРОЛЬНИЙ

Продовж. дод. Е.5

11

**УПАКОВКА**

По 10 капсул у блістері із плівки полівінілхлоридної безбарвної і фольги алюмінієвої друкарської лакованої.

По 1 блістеру разом з інструкцією для медичного застосування поміщають у пачку з картону.

**МАРКУВАННЯ**

Відповідає наданому тексту маркування.

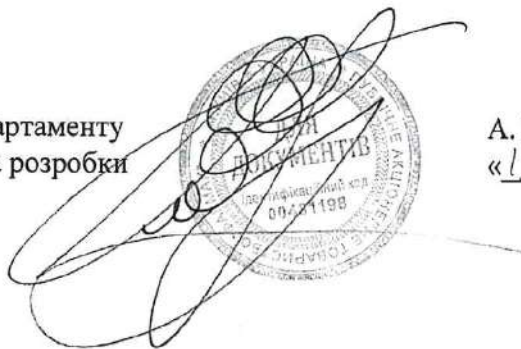
**УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ**

Зберігати в сухому, захищеному від світла місці при температурі не вище 25 °С.

**ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ**

2 роки.

Керівник департаменту  
досліджень та розробки



А. М. Гой  
«13» лютого 2017 р.

Копія вірна:

КОНТРОЛЬНИЙ

## Додаток Е.6

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи  
Львівського національного медичного  
університету ім. Данила Галицького  
проф. А.Й. Наконечний



03 2019 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

<b>Пропозиція до впровадження:</b>	методика визначення енісаміуму йодиду для вивчення профілів розчинення противірусного засобу.
<b>Установа, автори:</b>	ПАТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, здобувач Бурмака О.В.
<b>Джерела інформації:</b>	Бурмака О.В. Розробка та валідація методики визначення енісаміуму йодиду для вивчення профілів розчинення противірусного засобу / О. В. Бурмака // Фармацевтичний журнал. – 2018. – № 3-4. – С. 38–46. Запропонована методика визначення енісаміуму йодиду для вивчення профілів розчинення противірусного засобу. Проведена валідація аналітичної методики.
<b>Де впроваджено:</b>	кафедра фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького.
<b>Форма впровадження:</b>	науково-педагогічний процес кафедри.
<b>Результат впровадження:</b>	удосконалення знань студентів та науковців з питання визначення активного фармацевтичного інгредієнта для вивчення профілів розчинення на прикладі противірусного засобу енісаміуму йодид.
<b>Термін впровадження:</b>	2018-2019 н.р.

Завідувач кафедри фармацевтичної,  
органічної і біоорганічної хімії  
Львівського національного медичного  
університету ім. Данила Галицького,  
доктор фарм. наук, професор

Р.Б. Лесик

## Додаток Е.7

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи,  
міжнародних зв'язків та аспірантури  
Національного медичного університету  
імені О.О.Богомольця, професор  
Р.Л. Скрипник



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Пропозиція до впровадження:	методика визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті енісаміуму йодид.
Установа, автори:	ПАТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, здобувач Бурмака О.В., доктор фармацевтичних наук Гуреєва С.М., доктор медичних наук Маргітич В.М.
Джерела інформації:	Бурмака А.В. Разработка методики контроля сопутствующих примесей субстанции энисамиума йодида / А. В. Бурмака, С. Н. Гуреева, В. М. Маргитич // Фармаком. – 2017. – № 3. – С. 17–25; Запропонована методика визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті енісаміуму йодид.
Де впроваджено:	кафедра фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця.
Форма впровадження:	науково-педагогічний процес кафедри.
Результат впровадження:	удосконалення знань студентів та науковців з питань розробки методики визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті на прикладі енісаміуму йодиду.
Термін впровадження:	2018-2019 н.р.

Відповідальні за впровадження:

Завідувач кафедри фармацевтичної,  
біологічної та токсикологічної хімії  
Національного медичного університету ім.  
О.О. Богомольця, доктор медичних наук,  
професор

Доцент кафедри фармацевтичної,  
біологічної та токсикологічної хімії

І. В. Ніженковська

О.В.Афанасенко



## Додаток Е.8

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи  
Запорізького державного  
медичного університету  
проф. В.О. Туманський

01 березня 2019 р.



## Акт впровадження

<i>Пропозиція до впровадження:</i>	методика визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті енісаміуму йодид.
<i>Установа, автори:</i>	ПАТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, здобувач Бурмака О.В., доктор фармацевтичних наук Гурєєва С.М., доктор медичних наук Маргітич В.М.
<i>Джерела інформації:</i>	Бурмака О.В. Валідація методики визначення супровідних домішок в активній речовині протівірусного засобу енісаміуму йодиду / О. В. Бурмака, С. М. Гурєєва, В. М. Маргітич // Запоріжський медичний журнал. – 2018. – № 5. – С. 708–716.
<i>Де впроваджено:</i>	Запропонована методика визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті енісаміуму йодид. Проведена валідація аналітичної методики. кафедра фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету.
<i>Форма впровадження:</i>	науково-педагогічний процес кафедри.
<i>Результат впровадження:</i>	удосконалення знань студентів та науковців з питань валідації методики визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті на прикладі енісаміуму йодиду.
<i>Термін впровадження:</i>	09.2018-07.2019 н.р.

**Завідувач кафедри фармацевтичної хімії  
Запорізького державного медичного  
університету, доктор. фарм. наук, професор**



Л.І. Кучеренко

## Додаток Е.9

«Затверджую»

П.В.О. ректора Одеського національного  
медичного університету

проф. Ю.В. Сухін

02 2019 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

<b>Пропозиція до впровадження:</b>	методика визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті енісаміуму йодид.
<b>Установа, автори:</b>	ПАТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, здобувач Бурмака О.В., доктор фармацевтичних наук Гуреєва С.М., доктор медичних наук Маргітич В.М.
<b>Джерела інформації:</b>	1. Бурмака А.В. Разработка методики контроля сопутствующих примесей субстанции энисамиума йодида / А. В. Бурмака, С. Н. Гуреєва, В. М. Маргітич // Фармаком. – 2017. – № 3. – С. 17–25; 2. Бурмака О.В. Валідація методики визначення супровідних домішок в активній речовині притивірусного засобу енісаміуму йодиду / О.В. Бурмака, С. М. Гуреєва, В. М. Маргітич // Запорозький медичний журнал. – 2018. – № 5. – С. 708–716.
<b>Де впроваджено:</b>	Запропонована методика визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті енісаміуму йодид. Проведена валідація аналітичної методики.
<b>Форма впровадження:</b>	кафедра фармацевтичної хімії Одеського національного медичного університету.
<b>Результат впровадження:</b>	науково-педагогічний процес кафедри.
<b>Термін впровадження:</b>	удосконалення знань студентів та науковців з питань розробки та валідації методики визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті на прикладі енісаміуму йодиду.
<b>Термін впровадження:</b>	2018-2019 н.р.

Завідувач кафедри  
фармацевтичної хімії Одеського  
національного медичного  
університету, доктор хімічних  
наук, професор

В.О. ГЕЛЬМБОЛЬДТ

## Додаток Е.10

«Затверджую»

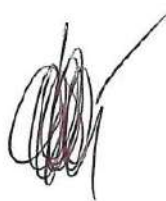
Проректор з наукової роботи  
Івано-Франківського національного  
медичного університету  
д. мед. наук, професор Вакалюк І.П.

«25» листопада 2019 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція до впровадження:** методика вивчення розчинності активного фармацевтичного інгредієнта енісаміуму йодид у відповідності до біофармацевтичної системи класифікації
2. **Установа, автори:** ПАТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна. Автори в рамках вивчення розчинності: здобувач Бурмака О.В., д. фарм. наук Гуреєва С.М., к. фарм. наук Гой А.М., к. фарм. наук Костюк Г.В. д-р мед. наук Маргітич В.М.
3. **Джерела інформації:** Haltner-Ukomadu. E. In Vitro Bioavailability Study of an Antiviral Compound Enisamium iodide / E. Haltner-Ukomadu, S.M. Gureyeva, O.V. Burmaka [et.al] // Stientia Pharmaceutica. – 2018. – Volume 86, Issue 1. – С. 1–10.  
Запропонована методика вивчення розчинності активного фармацевтичного інгредієнту енісаміуму йодид у відповідності до біофармацевтичної системи класифікації
4. **Де впроваджено:** кафедра фармації Івано-Франківського національного медичного університету
5. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес кафедри
6. **Результат впровадження:** удосконалення знань студентів та науковців з питань вивчення розчинності активного фармацевтичного інгредієнта у відповідності до біофармацевтичної системи класифікації на прикладі енісаміуму йодиду
7. **Термін впровадження:** 2018-2019 н.р.

Завідувач кафедри фармації  
Івано-Франківського  
національного  
медичного університету,  
доктор фарм. наук, професор



А.Р. Грицик

## Додаток Е.11

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи  
 Національного фармацевтичного  
 університету  
 проф. А.Л. Загайко  
 « / 2019 р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**Пропозиція до впровадження:** Методика визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті енісаміуму йодид.

**Установа, автори:** ПАТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, здобувач Бурмака О.В., доктор фармацевтичних наук Гурєва С.М., доктор медичних наук Маргітич В.М.

**Джерела інформації:** Бурмака А.В. Розробка методики контролю супутствующих примісей субстанції енісаміума йодида / А. В. Бурмака, С. Н. Гурєва, В. М. Маргітич // Фармаком. – 2017. – № 3. – С. 17–25;  
 Запропонована методика визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті енісаміуму йодид.

**Де впроваджено:** Кафедра фармацевтичної хімії НФаУ.

**Форма впровадження:** Науково-педагогічний процес кафедри.

**Результат впровадження:** Удосконалення знань студентів та науковців з питань розробки та валідації методики визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті на прикладі енісаміуму йодиду.

**Термін впровадження:** 2018-2019 н.р.

Завідувач кафедри фармацевтичної  
 хімії НФаУ, доктор фармацевтичних  
 наук, професор

В.А. Георгіянци

## Додаток Е.12

«Затверджую»



Проректор з наукової роботи  
Вінницького національного медичного  
університету ім. М.І. Пирогова  
проф. О.В. Власенко

» березень 2019 р.**Акт впровадження**

<b>Пропозиція до впровадження:</b>	спектрофотометрична методика кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах.
<b>Установа, автори:</b>	ПАТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, здобувач Бурмака О.В., доктор фармацевтичних наук Гурєєва С.М., доктор медичних наук Маргітич В.М.
<b>Джерела інформації:</b>	Бурмака О.В. Розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах / О. В. Бурмака, С. М. Гурєєва, В. М. Маргітич // Фармацевтичний часопис. – 2017. – № 2. – С. 64–71. Запропонована спектрофотометрична методика кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах. Проведена валідація аналітичної методики.
<b>Де впроваджено:</b>	кафедра фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.
<b>Форма впровадження:</b>	науково-педагогічний процес кафедри.
<b>Результат впровадження:</b>	удосконалення знань студентів та науковців з питань розробки та валідації спектрофотометричної методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах.
<b>Термін впровадження:</b>	вересень 2018 – березень 2019 н.р.

Відповідальний за впровадження,  
завідувач кафедри фармацевтичної  
хімії Вінницького національного  
медичного університету ім.  
М.І. Пирогова, кандидат хімічних  
наук, доцент

Т.І. ЮЩЕНКО

## Додаток Е.13

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**  
 Технічний директор  
 ПАТ «Фармак»



« 4 » 05 2019 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**1. Назва пропозиції для впровадження:** методика визначення енісаміуму йодиду для вивчення профілів розчинення противірусного засобу.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** ПАТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, начальник сектору міжнародної регуляції відділу фармацевтичної регуляції Бурмака О.В.

**3. Джерело інформації:** Бурмака О.В. Розробка та валдація методики визначення енісаміуму йодиду для вивчення профілів розчинення противірусного засобу / О. В. Бурмака // Фармацевтичний журнал. – 2018. – № 3-4. – С. 38-46.

**4. Інформація про об'єкт впровадження:** В центральній лабораторії фармацевтичної розробки Бурмаково О.В. були виконані роботи з розробки та валідації методики (високоєфективної рідинної хроматографії) визначення енісаміуму йодиду для вивчення профілів розчинення таблеток.

**5. Впроваджено:** в центральній лабораторії фармацевтичної розробки ПАТ «Фармак».

Начальник центральної лабораторії  
 фармацевтичної розробки  
 ПАТ «Фармак»



С.М. Гурєва

Керівник департаменту досліджень та  
 розробки ПАТ «Фармак»



Р.О. Смішко

## Додаток Е.14

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**  
 Технічний директор  
 ПАТ «Фармак»  
  
 А.М. Гой  
 « 4 » 03 2019 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

**1. Назва пропозиції для впровадження:** спектрофотометрична методика кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** ПАТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, начальник сектору міжнародної регуляції відділу фармацевтичної регуляції Бурмака О.В.

**3. Джерело інформації:**

Бурмака О.В. Розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах / О. В. Бурмака, С. М. Гуресва, В. М. Маргітєч // Фармацевтичний часопис. – 2017. – № 2. – С. 64–71.

**4. Інформація про об'єкт впровадження:** В центральній лабораторії фармацевтичної розробки Бурмакою О.В. були виконані роботи з розробки та валідації спектрофотометричної методики кількісного визначення енісаміуму йодиду в капсулах. Результати досліджень відображені в реєстраційних матеріалах, а методика використовується для контролю капсул енісаміуму йодиду.

**5. Впроваджено:** в процес контролю якості капсул енісаміуму йодиду (МКЯ UA/12415/01/01 від 20.03.2017).

Начальник центральної лабораторії  
 фармацевтичної розробки  
 ПАТ «Фармак»



С.М. Гуресва

Керівник департаменту досліджень та  
 розробки ПАТ «Фармак»



Р.О. Смішко

## Додаток Е.15

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Технічний директор

ПАТ «Фармак»

A blue circular stamp of ПАТ «Фармак» is visible, containing the text: «ФАРМАК» ПАТ «Фармак» А.М. Бойко 004417001 2019 р. The stamp is partially obscured by a large handwritten signature in blue ink.

« 4 » — 03

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

**1. Назва пропозиції для впровадження:** методика визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті енісаміуму йодид.

**2. Установа, її адреса, виконавці:** ПАТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, начальник сектору міжнародної регуляції відділу фармацевтичної регуляції Бурмака О.В.

**3. Джерела інформації:**

1. Бурмака А.В. Разработка методики контроля сопутствующих примесей субстанции энисамиума йодида / А. В. Бурмака, С. Н. Гуреева, В. М. Маргитич // Фармаком. – 2017. – № 3. – С. 17–25;

2. Бурмака О.В. Валідація методики визначення супровідних домішок в активній речовині противірусного засобу енісаміуму йодиду / О.В. Бурмака, С. М. Гуреева, В. М. Маргитич // Запорозький медичинський журнал. – 2018. – № 5. – С. 708–716.

**4. Інформація про об'єкт впровадження:** В центральній лабораторії фармацевтичної розробки Бурмакою О.В. були виконані роботи з розробки та валідації аналітичної методики визначення супровідних домішок в активному фармацевтичному інгредієнті енісаміум йодид. Результати досліджень відображені в реєстраційних матеріалах, а методика використовується для входного контролю АФІ енісаміуму йодид.

**5. Впроваджено:** в процес контролю якості активного фармацевтичного інгредієнта енісаміуму йодид (МКЯ UA/15007/01/01 від 28.03.2016).

Начальник центральної лабораторії  
фармацевтичної розробки  
ПАТ «Фармак»

A handwritten signature in blue ink, corresponding to С.М. Гуреева.

С.М. Гуреева

Керівник департаменту досліджень та  
розробки ПАТ «Фармак»

A handwritten signature in blue ink, corresponding to Р.О. Смішко.

Р.О. Смішко



## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

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.
2. Бурмака А. В., Гуреєва С. Н., Маргітич В. М. Разработка методики контроля сопутствующих примесей субстанции энисамиума йодида. *Фармаком*. 2017. № 3. С. 17–25.
3. Бурмака О. В. Розробка та валідація методики визначення енісаміуму йодиду для вивчення профілів розчинення противірусного 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 противірусного засобу енісаміуму йодиду. *Запорожский медицинский журнал*. 2018. Т. 20, № 5 (110). С. 708–716.
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.
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.

## Продовж. дод. Ж

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.

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.

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.

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.

## Додаток 3

## АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. II Міжнародна науково практична інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії», (м. Харків, 12-13 листоп. 2015 р., форма участі – публікація тез).

2. VIII Національний з'їзду фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи», (м. Харків, 13-16 верес. 2016 р., форма участі – публікація тез, усна доповідь).

3. VI науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (м. Тернопіль, 10-11 листоп. 2016 р., форма участі – публікація тез).

4. XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (м. Харків, 20-21 квіт. 2017 р., форма участі – публікація тез, усна доповідь).

5. VII науково-практична конференція з міжнародною участю (м. Тернопіль, 27-28 верес. 2018 р., форма участі – публікація тез)