

Оглавление

Введение.....	3
Перечень сокращений и обозначений	6
Глава 1 Литературный обзор в области разработок методик аналитического контроля лекарственных препаратов.....	7
1.1 Фармацевтический анализ качества лекарственных средств.....	7
1.2 Физические и физико-химические методы анализа в исследовании лекарственных препаратов.....	11
1.3 Физико-химические методы определения подлинности.....	12
1.4 Диосмин.....	14
1.5 Гесперидин.....	16
1.6 Технологическая схема процесса.....	18
Глава 2 Практическая часть.....	21
2.1 Исследование фармацевтических субстанций, написание методики испытания таблеток, покрытых пленочной оболочкой.....	21
2.2 Написание методики испытания таблеток, покрытых пленочной оболочкой лекарственного препарата «Венарус, (100 мг + 900 мг).....	26
Глава 3 Анализ результатов работы.....	39
3.1 Отчет о валидации методик определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания флавоноидов в лекарственном препарате «Венарус, (100 мг + 900 мг).....	39
Глава 4 Расчет эффективности производства лекарственного препарата «Венарус, (100 мг + 900 мг) после валидации аналитической методики.....	76
4.1 Штатная сетка предприятия.....	76
4.2 Стоимость производственных процессов.....	79
4.3 Итоги и выводы.....	83
Заключение.....	85
Список литературы.....	86
Приложение А.....	89

Введение

Актуальность и научная значимость настоящего исследования.

««Аналитическая методика» - методика проведения испытаний лекарственных средств, которая включает в себя подробное описание последовательности действий, необходимых для выполнения аналитического испытания (в том числе описание подготовки испытуемых образцов, стандартных образцов, реактивов, использования оборудования, построения градуировочной кривой, используемых расчетных формул)» [22].

Выбор валидационных характеристик напрямую зависит от назначения аналитических методик, которое должно быть четко определено. В некоторых случаях допускается использование сочетания нескольких аналитических методик для обеспечения качества фармацевтической субстанции или лекарственного препарата. При изучении линейности аналитической методики в первую очередь определяется диапазон ее применения, который зависит от назначения данной методики. В пределах диапазона применения методика должна обеспечивать требуемую линейность, правильность и прецизионность [3].

В соответствии с Федеральным законом от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», «качество лекарственного средства - это соответствие лекарственного средства требованиям фармакопейной статьи либо в случае ее отсутствия нормативной документации или нормативного документа» [7]. В соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 80 «Об утверждении Правил надлежащей дистрибьюторской практики в рамках Евразийского экономического союза», «обеспечение качества лекарственных средств - совокупность всех организационных мероприятий, проведенных в целях удовлетворения требованиям качества лекарственных средств в соответствии с их назначением» [4]. В настоящее время молодежь

тоже страдает хронической венозной недостаточностью, несмотря на то, что ранее эта болезнь возникала преимущественно у людей старшего поколения. На возникновение венозной недостаточности в первую очередь влияет малоподвижный образ жизни, сидячая работа в офисе, отсутствие правильного питания и недостаток физической нагрузки [17].

Объект исследования: противоварикозный лекарственный препарат «Венарус, (100 мг +900 мг)».

Предмет исследования: показатели качества подлинность, количественное определение, родственные примеси.

Цель исследования: написание методик по показателям качества: подлинность, родственные примеси, количественное определение для таблеток, покрытых пленочной оболочкой с торговым наименованием «Венарус», которые были зарегистрированы на территории Российской Федерации 21.07.2015 г. [6]. Благодаря данным методикам, препарат может выйти на зарубежный рынок, поскольку они написаны в соответствии с требованиями Британской и Американской фармакопей, и увеличить товарооборот и прибыль предприятия.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить методики анализа качества лекарственных средств.
2. Выявить физико-химические методы анализа, используемые в исследовании лекарственных препаратов.
3. Исследовать фармацевтические субстанции.
4. Исследовать методы контроля качества лекарственных средств.

Методы исследования: проведение анализа литературных источников, проведение экспериментальных исследований лекарственного препарата «Венарус, (100 мг + 900 мг)», расчетные методики.

Опытно-экспериментальная база исследования: исследования проводились в контрольно-аналитической лаборатории на базе АО «Алиум».

Научная новизна данной работы заключается в том, что лекарственные препараты, содержащие гесперидин и диосмин не описаны в ведущих зарубежных фармакопеях, однако включены монографии на субстанции. В ГФ РФ отсутствуют фармакопейные статьи как на данные субстанции, так и препараты. В связи с чем, каждый производитель лекарственного препарата должен разрабатывать спецификацию и методы анализа на лекарственные препараты. Это обуславливает актуальность работы по валидации методик анализа ЛП, на основании которой впоследствии возможно создание фармацевтической статьи.

Теоретическая значимость исследования заключается в детализированном анализе и расчете фармацевтических субстанций, написание методики для контроля показателя качества «Количественное определение» и написание методики испытания таблеток, покрытых пленочной оболочкой лекарственного препарата, «Венарус, (100 мг + 900 мг)».

Достоверность и обоснованность результатов исследования: обоснована экспериментальными исследованиями, расчетными данными и внедрением на предприятии.

Личное участие автора заключается в предложении совершенствования валидации методик определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания флавоноидов в лекарственном препарате «Венарус, (100 мг + 900 мг)».

Структура магистерской диссертации. Работа состоит из четырех глав, заключения, содержит 27 рисунков, 42 таблицы, список использованной литературы (28 источников), 1 приложение. Основной текст работы изложен на 90 страницах.

Перечень сокращений и обозначений

В работе применяются следующие обозначения и сокращения:

- АФС – активная фармацевтическая субстанция;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ГФ РФ – государственная фармакопея Российской Федерации;
- ЛП – лекарственный препарат;
- ЛС – лекарственное средство;
- НД – нормативная документация;
- ОФС – общая фармакопейная статья;
- ПФ – подвижная фаза;
- СО – стандартный образец;
- ТППО – таблетки, покрытые пленочной оболочкой;
- ХВН – хроническая венозная недостаточность;
- ЦФР – центр фармацевтической разработки;
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

Глава 1 Литературный обзор в области разработок методик аналитического контроля лекарственных препаратов

1.1 Фармацевтический анализ качества лекарственных средств

Основной целью исследования при фармацевтическом анализе качества лекарственных веществ является установление пригодности ЛС для медицинского применения и соответствие его НД на препарат.

«Фармацевтический анализ – это наука о химической характеристике и измерении биологически активных веществ на всех этапах производства: от контроля сырья до оценки качества полученного лекарственного вещества, изучения его стабильности, установления сроков годности и стандартизации готовой лекарственной формы» [9].

Особенностями фармацевтического анализа является его многогранность и многообразие веществ или их смесей, в том числе индивидуальные химические вещества, сложные смеси биологических веществ. В настоящее время при фармацевтическом анализе качества лекарственных средств преимущественно используют физико-химические и физические методы анализа, которые нуждаются в постоянном совершенствовании.

Фармацевтический анализ в зависимости от поставленных задач включает различные аспекты контроля качества лекарств:

- Фармакопейный анализ;
- Постадийный контроль производства лекарственных средств;
- Анализ лекарственных средств индивидуального изготовления.

Наиболее значимым является фармакопейный анализ, который включает в себя подтверждение пригодности: соответствие ЛС фармакопейному стандарту, статье или иному нормативному документу (НД). В связи с чем возникают требования к высокой специфичности, селективности, точности и достоверности анализа [14].

Качество лекарственного средства оценивается только на основании фармацевтического анализа пробы, которая является статистически достоверной выборкой. Порядок отбора пробы указан либо в частной статье, либо в общей статье Государственной Фармакопеи. Перед проведением фармацевтического анализа качества лекарственного средства следует провести многоступенчатый отбор проб для того, чтобы доказать его соответствие требованиям НД. Многоступенчатый отбор проб (выборка) заключается в том, что продукцию отбирают случайным образом в каждой ступени из единиц, отобранных на предыдущих ступенях. Число ступеней зависит от вида упаковки.

«первая ступень: отбор единиц упаковочной тары (ящиков, коробок);

вторая ступень: отбор упаковочных единиц, находящихся в упаковочной таре (коробок, флаконов, банок);

третья ступень: отбор образцов в первичной упаковке (ампул, флаконов, контурных упаковок)» [19].

Количество отбираемых упаковочных единиц рассчитывается по формуле 1:

$$N = 0,4\sqrt{n}, \quad (1)$$

где n — общее количество упаковочных единиц одной серии (партии).

Значение, полученное в формуле 1 принято округлять в большую сторону до целого числа, оно должно быть не менее 3 и не более 30.

Конкретный порядок формирования выборки подробно описан в ГФ XIV издания ОФС.1.1.0004.15 Отбор проб [1]. Для того, чтобы результаты фармацевтического анализа качества лекарственных средств можно было считать достоверными, необходимо провести анализ не менее 4-х проб и доказать воспроизводимость полученных результатов.

При выполнении анализа стоит уделить внимание таким показателям, как избирательность, чувствительность, точность, время выполнения и количество пробы, поскольку эти условия индивидуальны для различных целей анализа аналитических методик.

Например, при проведении анализа сложных препаратов, состоящих из нескольких действующих веществ, как «Венарус, 100+900 мг» особое внимание уделяют избирательности методики, так как необходимо подобрать условия для количественного определения каждого из этих веществ.

В зависимости от объектов и целей анализа используют различные методы и предъявляют требования к точности и чувствительности, а также важным фактором является время выполнения. При испытании чистоты ЛС или примесей используют высокочувствительные методы.

Одним из важных показателей является предел чувствительности аналитической методики, который характеризует наименьшее содержание/концентрацию, при которых данное возможно обнаружение исследуемого вещества. К наименее чувствительным относятся химические методы анализа и качественные реакции. Следует отметить, что среди часто используемых самые чувствительные – радиохимический, каталитический и флуоресцентный методы (до 10^{-9} %); спектрофотометрический метод (10^{-3} – 10^{-6} %); потенциометрический (10^{-2} %).

Термин «точность анализа» подразумевает под собой рассмотрение сразу 2-х валидационных характеристик – воспроизводимость и правильность.

Воспроизводимость характеризует рассеяние результатов анализа по сравнению со средним значением.

Правильность отражает разность между действительным и найденным содержанием вещества. Чаще всего точность анализа зависит от качества приборов и опытности аналитика, она имеет определенное значение для каждого из методов [5].

При фармацевтическом анализе качества лекарственных средств важно иметь представление о следующих понятиях:

При обнаружении грубых ошибок результаты анализа следует считать недостоверными, так как они сильно искажены. Причиной возникновения таких ошибок могут явиться нарушения выполнения аналитической методики, невнимательность и неверные расчеты исполнителя.

В ходе работы также могут возникнуть систематические ошибки, которые систематически искажают результаты измерений на определенное постоянное значение. Такие ошибки отражают правильность результатов фармацевтического анализа, избежать их можно калибровкой прибора или введением поправок на это постоянное значение.

При оценке воспроизводимости результатов анализа возможно обнаружение случайных ошибок, которые возникают вследствие изменения условий, неконтролируемых исполнителем. Случайные ошибки имеют место быть при измерении, и в том числе при любом аналитическом определении, как бы тщательно оно ни проводилось. Среднее арифметическое случайных ошибок стремится к нулю. При обработке результатов испытания следует использовать значения не одной пробы, а нескольких параллельных измерений, что будет нивелировать случайные ошибки и давать достоверные результаты.

Абсолютная ошибка – разность между полученным результатом и истинным значением, выражается в тех же единицах, что и определяемая величина.

Относительная ошибка определения является одним из основных показателей, она равна отношению абсолютной ошибки к истинному значению определяемой величины, выражают ее обычно в процентах или долях.

Относительная ошибка зависит от выбранного метода анализа и состава исследуемого вещества. При исследованиях индивидуальных веществ спектрофотометрическим методом она равна 2-3 %, ИК-

спектрофотометрией – 5-12 %, жидкостной хроматографией – 3-4 %, потенциометрией – 0,3-1 %. При использовании одновременно нескольких методов, точность анализа снижается. Относительная ошибка биологических методов анализа приближается к 50 %, что делает их наименее точными среди остальных.

1.2 Физические и физико-химические методы анализа в исследовании лекарственных препаратов

Идентификацию (подлинность) действующих веществ в лекарственном препарате или субстанции принято считать важнейшим показателем, для ее определения используют ряд многочисленных методов фармацевтического анализа качества. Изначально основными методами были химические методы определения подлинности с помощью качественных цветных реакций, которые позволяют определять наличие определенных ионов и функциональных групп. Наряду с химическими методами анализа широко использовались и физические методы [11]. В настоящее время в ведущих фармакопеях преимущественно используются физико-химические методы.

Одним из основных физических методов фармацевтического контроля качества лекарственных средств определения чистоты и подлинности вещества является температура плавления. Описание использования данного метода есть в ГФ РФ XIV издания. Этот показатель широко используется для стандартизации субстанций лекарственных веществ. При проведении анализа с помощью данной методики наблюдается эффект смешения пробы, поскольку при добавлении примесей в чистое вещество, его температура плавления существенно снижается. При наличии стандартного образца этот эффект позволяет установить подлинность исследуемого лекарственного средства. Достоинством данного метода является возможность его использования как для определения чистоты исследуемого образца, так и его подлинности.

Стоит отметить, что определение подлинности некоторых препаратов также проводят с помощью температуры затвердевания, температуры кипения или температурных пределов перегонки [2]. Температурным пределом перегонки пользуются при анализе жидких веществ, например, этилового спирта. Использование температуры кипения для определения подлинности лекарственного средства затруднено следующими факторами: атмосферное давление, которое влияет на изменение данного показателя, и возможность образования смесей или азеотропов.

Для определения подлинности лекарственного средства также используют показатели плотности и вязкости, которые также относятся к физическим методам анализа и описаны в ГФ РФ. Ориентировочной характеристикой лекарственного препарата может являться растворимость. Она является универсальным параметром для установления подлинности и чистоты практически всех лекарственных веществ. В ГФ РФ есть таблица обозначения растворимости фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, в соответствии с которой к очень легко растворимым относятся вещества, для растворения 1 г которых необходимо до 1 мл растворителя включительно. Легко растворимыми считаются те вещества, для растворения 1 г которых потребуется от 1 до 10 мл растворителя включительно. Растворимыми считают вещества, 1 г которых растворяется в 10 – 30 мл растворителя включительно, умеренно растворимыми – 30 – 100 мл растворителя включительно, мало растворимыми – 100 – 1000 мл растворителя включительно, очень мало растворимыми – 1000 – 10000 мл растворителя включительно. Практически нерастворимыми считают соединения, для растворения 1 г которых понадобится более 10 000 мл растворителя.

При этом растворившимся считается вещество, в растворе которого в проходящем свете не наблюдается частиц вещества.

1.3 Физико-химические методы определения подлинности

В настоящее время физико-химические методы анализа принято считать наиболее информативными при определении подлинности веществ [21]. К физико-химическим методам относятся:

Спектральные методы:

- ультрафиолетовая спектроскопия;
- спектроскопия в видимом свете;
- инфракрасная спектроскопия;
- флуоресцентная спектроскопия;
- атомно-абсорбционная спектроскопия;
- рентгеновские методы анализа;
- ядерный магнитный резонанс;
- рентгеноструктурный анализ;

Сорбционные методы анализа:

- тонкослойная хроматография;
- газожидкостная хроматография;
- высокоэффективная жидкостная хроматография;
- элетрофорез;
- ионофорез;
- гель-хроматография.

Массовые методы анализа:

- масс-спектрометрия;
- хромато-масс-спектрометрия.

Электрохимические методы анализа:

- полярография;
- электронный парамагнитный резонанс.

Использование стандартных образцов

Для определения подлинности лекарственных веществ наиболее достоверным методом фармацевтического анализа является использование низкочастотной области ИК – спектроскопии, где с помощью полос поглощения можно определить наличие того или иного вещества, что и подтверждает подлинность при использовании данной методики. Недостатком метода является обязательное наличие стандартного образца, относительно которого будут проводить сравнение полученных инфракрасных спектров. Следует отметить, что использование УФ и видимой спектроскопии дает менее достоверные результаты, так как характер спектра не является индивидуальным для исследуемого соединения. Атомно-абсорбционная спектроскопия и рентгеновская спектроскопия используются для анализа неорганических соединений и для идентификации химических элементов [19]. Недостатками ЯМР метода является сложность приборов, дороговизна оборудования и наличие высококвалифицированного персонала, хотя он отлично подходит для установления структуры органических соединений. Флуоресцентная спектроскопия является очень избирательным методом, так как подходит только для определения флуоресцирующих веществ. Его чаще используют для количественного определения, особенно малых количеств, поскольку он является одним из наиболее чувствительных.

Рентгеноструктурный анализ используется в научных целях для подтверждения химической структуры исследуемого вещества [12].

1.4 Диосмин

Диосмин – химическое соединение, молекулярная формула которого $C_{28}H_{32}O_{15}$. Он относится к группе флавоноидов, его агликоном является диосметин.

Диосмин является полусинтетическим препаратом, производное гесперидина.

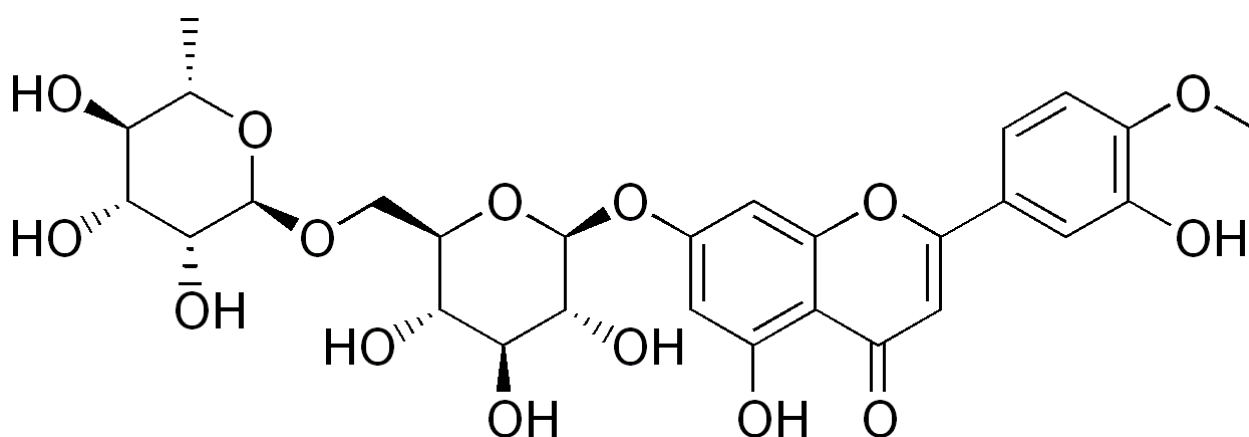


Рисунок 1 - Структурная формула диосмина

Лекарственные средства, содержащие диосмин вводят энтеральным путем через рот (орально). Данный препарат используют при лечении венозных заболеваний, при остром или хроническом геморрое, совместно с лигированием варикозных узлов или в качестве терапии в целях снижения вторичного кровотечения. Наиболее распространено его использование совместно с гесперидином, например, для контроля внутренних симптомов геморроя.

В настоящее время опубликовано достаточно статей и проведено множество клинических испытаний, в результате которых доказана эффективность применения диосмина при лечении на всех стадиях венозной недостаточности, включая венозные язвы [22].

В некоторых европейских странах диосмин является рецептурным лекарственным средством с фирменными названиями Dio-PP, Venotec, Daflon и другие, а также он продается в качестве пищевой добавки в Соединенных Штатах.

«Диосмин эффективен в уменьшении гипергликемии у диабетических крыс» [24]. «Предположительно, диосмин может иметь потенциал в лечении нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, и его противовоспалительная и анти-апоптотическая активность была продемонстрирована в нейронных клетках *in vitro*» [26].

Главное фармакологическое действие диосмина заключается в том, что он увеличивает сосудосуживающее действие норадреналина на венозные стенки, это ведёт к повышению венозного тонуса. В результате такого действия препарата снижается венозная емкость, растяжимость и застой. Обнаружено, что у людей, страдающих ХВН, наблюдается венозное гипердавление, которое удается снизить с помощью приема лекарственного препарата, содержащего диосмин, а также это позволяет увеличить венозный отток.

«Диосмин улучшает лимфатический дренаж, увеличивая частоту и интенсивности сокращения лимфатических сосудов и увеличивает общее количество функциональных лимфатических капилляров. Кроме того, диосмин вместе с гесперидином уменьшает диаметр лимфатических капилляров и интролимфатическое давление» [8].

На уровне микроциркуляции, диосмин уменьшает проницаемость капилляров и увеличивает резистентность капилляров, защищая микроциркуляцию от повреждающих процессов.

Диосмин уменьшает экспрессию эндотелиальных молекул адгезии (ICAM1, VCAM1) и ингибирует адгезию, миграцию и активацию лейкоцитов на капиллярном уровне. Это приводит к уменьшению высвобождения воспалительных медиаторов.

1.5 Гесперидин

Гесперидин – это гликозид флаванона, содержащийся в citrusовых фруктах. Своя форма агликона вызвана гесперетином. Его название происходит от слова «гесперидиум», означающего плод, производимый citrusовыми деревьями.

Гесперидин был впервые выделен в 1828 году французским химиком Лебретоном из белого внутреннего слоя кожуры citrusовых (мезокарп, альbedo) [15, 23].

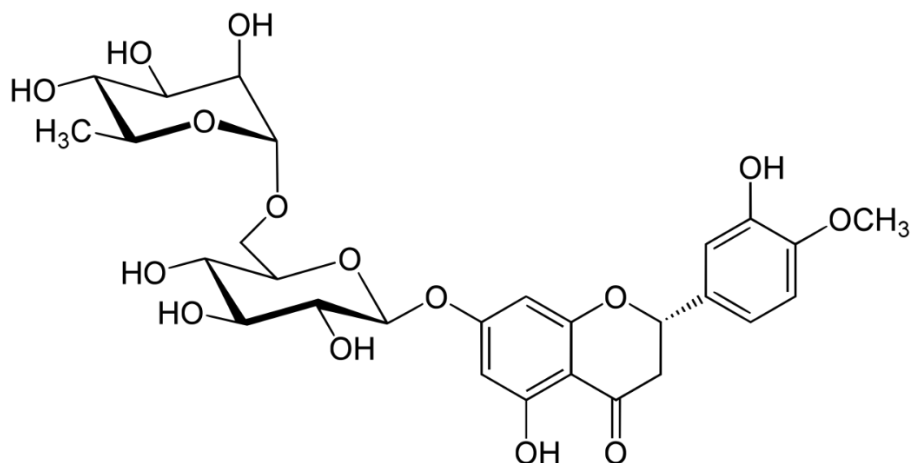


Рисунок 2 - Структурная формула гесперидина

Как флаванон, содержащийся в кожуре цитрусовых фруктов (таких как апельсины или лимоны), гесперидин находится в стадии предварительных исследований на предмет его возможных биологических свойств *in vivo*. Один обзор не нашел доказательств того, что гесперидин влияет на уровень липидов в крови или гипертонию [16], другой обзор показал, что гесперидин может улучшить функцию эндотелия у людей, но общие результаты были неубедительными [25].

Его молекулярная формула $C_{28}H_{34}O_{15}$. Химически он состоит из агликона (форма, не имеющая сахарных остатков, называемая гесперетин) и сахарного рутинозида: гесперетин-7-рутинозид.

Гесперидин является естественным глюкозидом большинства цитрусовых, встречающимся по большей части в альbedo фруктов (внутренний белый рыхлый слой кожуры цитрусовых). Его агликонная форма называется гесперетин. Название происходит от слова *Hesperidium* или «гесперидий» - плод растений подсемейства померанцевые.

В медицине гесперидин используется как венопротекторное, антиоксидантное средство. В лечебных целях часто применяется в сочетании с диосмином. Входит в состав препаратов для лечения венозной недостаточности, геморроя, при лимфидеме. Существуют исследования,

которые доказывают положительное влияние гесперидина при ревматоидном артрите и снижении диастолического кровяного давления, а также его способность ингибировать распространение и рост раковых клеток при онкозаболеваниях.

Поглощение гесперидина из кишечника происходит интактно. Фармакодинамика применения лекарственных препаратов, содержащих гесперидин, обусловлена тем, что гесперитин появляется в плазме крови человека уже через 3 часа после приема внутрь. Однако пика действия он достигает в районе 5 и 7 часов. Циркулирующими формами гесперидина являются глюкурониды (87 %) и сульфоглюкурониды (13 %). «Для гесперидина экскреция с мочой почти завершается через 24 часа после приема апельсина или сока и не зависит от дозы. Хотя гесперидин не имеет обычных структурных элементов для должного захвата свободных радикалов и в качестве хелатора, способность хелатировать ионы металлов была подтверждена в некоторых исследованиях» [20]. Другие научные наблюдения обнаружили антиоксидантную активность гесперидина и свойства удаления радикалов с использованием различных систем анализа (Jovanovic et al и другое). Кроме того, было выяснено, что гесперидин эффективен в защите липосом от перекисного окисления, вызванного ультрафиолетовым излучением.

В настоящее время доказана биологическая активность гесперидина. Фармакологическое действие лекарственных препаратов, содержащих гесперидин, заключается в том, что происходит уменьшение капиллярной проницаемости воздействием на сосудистую систему.

Следует упомянуть противовоспалительное действие данного препарата, его антиоксидантный эффект и действие на ферменты. При приеме этого лекарственного препарата наблюдается антимикробная (антибактериальный, противогрибковый, противовирусный) и антиканцерогенная активность, ингибирование агрегации клеток и антиаллергические эффекты.

1.6 Технологическая схема процесса

«Технологический процесс получения таблеток может варьироваться в зависимости от производимого препарата, формы будущих таблеток и других аспектов» [13]. Существует три категории технологического процесса получения таблеток: прессование, сухое и влажное гранулирование.

1.6.1 Прессование.

Основной стадией при производстве таблеток является растворение и взвешивание исходного материала, которое осуществляется в вытяжных шкафах с аспирацией. Затем эти вещества поступают на стадию просеивания, которая осуществляется с помощью специального оборудования – просеивателей вибрационного типа.

Одной из самых важных технологических операций при производстве таблеток является стадия смешивания. Именно на этом этапе необходимо добиться однородности состава таблетмассы, что затруднено различиями в физико-химических свойствах соединений, входящих в состав будущей таблетки.

Метод прессования в настоящее время используется редко, поскольку главным недостатком и сложностью является равномерное распределение действующих и вспомогательных веществ по всей таблетке. К достоинствам этого метода относится высокая производительность и экономичность.

1.6.2 Сухое гранулирование.

Одним из методов производства таблеток является сухое гранулирование – процесс, в результате которого получают порошок из крупных гранул путем предварительного уплотнения для получения гранулята и таблетирования (вторичное уплотнение).

На первой стадии используют склеивающие вещества, которые обеспечивают сцепление частиц под давлением. С помощью таблеточных машин измельчением полученных спрессованных брикетов получают таблетки необходимой формы.

1.6.3 Влажное гранулирование.

Влажная грануляции – процесс увеличения размера частиц путем агломерации и объединения мелких частиц порошка в гранулы с использованием гранулирующей жидкости, которая может использоваться отдельно или как растворитель, содержащий связующие агенты. Полученные гранулы обладают высокой сыпучестью.



Рисунок 3 - Технологическая схема производства препарата «Венарус®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 100 мг + 900 мг»

Метод влажной грануляции широко распространен в настоящее время. Однако нельзя назвать данный метод простым и экономически выгодным по сравнению с прессованием.

Оборудование при производстве таблеток необходимо выбирать в зависимости от используемого метода их получения.

Но есть общая особенность во всех 3-х методах: наличие весов, которые влияют на весь процесс получения лекарственного препарата, поэтому они должны обладать высокой точностью и своевременно проходить валидацию и квалификацию [18].

Ниже представлена технологическая схема производства препарата «Венарус, 100 мг + 900 мг», которая включает в себя следующие стадии:

Глава 2 Практическая часть

2.1 Исследование фармацевтических субстанций, написание методики для контроля показателя качества «Количественное определение»

2.1.1 Назначение и область применения.

Контроль показателя качества «Количественное определение» фармацевтической субстанции Диосмин производства Ченгду Хок Био-Инженеринг Ко., Лтд, Китай.

Оборудование и материалы:

Таблица 1- Оборудование

Наименование	Модель
Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности, обеспечивающие точность взвешивания 0,0002г с принтером	Ohaus или Shimadzu или AND
Жидкостный хроматограф высокого давления с детектором по УФ поглощению	Agilentили Knauer или Shimadzu
Хроматографическая колонка из нержавеющей стали, заполненная октадецилсилилсиликагелем, 150x4,6мм, 5 мкм	YMC-Pack ODS-A (C-18) или аналогичная

Таблица 2 – Реактивы

Наименование	Категория
Вода	Для ВЭЖХ; электропроводность не более 0,054 μS
Ацетонитрил	Для ВЭЖХ
Уксусная кислота	Для ВЭЖХ
Метанол	Для ВЭЖХ
Диметилсульфоксид	Качества pharma grade

Посуда и материалы:

2.1.1.1 Мерные колбы вместимостью 10 мл, 25 мл.

2.1.1.2 Пипетки градуированные вместимостью 10 мл, 20 мл.

2.1.1.3 Мерные цилиндры вместимостью 100 мл, 1000 мл.

2.1.1.4 Стеклянные флаконы вместимостью 1000 мл.

Таблица 3 - Стандартные образцы

Наименование	Категория
Стандартные образцы диосмина	EP CRS

2.2 Описание методики

Таблица 4 – Нормирование

Показатель качества	Норма
Количественное определение	Не менее 90 % и не более 102 % в пересчете на безводное и свободное от органических растворителей вещество

Приготовление растворов:

2.2.1 Подвижная фаза (ПФ)

В стеклянном флаконе вместимостью 1000 мл смешать ацетонитрил, уксусную кислоту ледяную, метанол и воду в соотношении (20:60:280:660), полученный раствор профильтровать и продегазировать.

2.2.2 Испытуемый раствор

В мерную колбу вместимостью 25 мл поместить около 25 мг (точная навеска) субстанции, прибавить 15 мл диметилсульфоксида, перемешать до полного растворения, довести объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешать. Приготовить два параллельных раствора.

2.2.3 Стандартный раствор

В мерную колбу вместимостью 10 мл поместить около 10 мг (точная навеска) стандартного образца диосмина EPCRS, прибавить 7 мл

диметилсульфоксида, перемешать до полного растворения, довести объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешать.

Метод ВЭЖХ

Условия хроматографирования:

- скорость потока: 1,0 мл/мин;
- температура колонки: 25 °С;
- детектирование при длине волны: УФ, 275 нм;
- объем пробы: 10 мкл;
- время хроматографирования: в 6,5 раз превышает время удерживания пика диосмина.

Проверка пригодности хроматографической системы.

В хроматограф последовательно ввести по 10 мкл стандартного раствора (5 инъекций). Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика диосмина, рассчитанное по пяти последовательным хроматограммам стандартного раствора, не превышает 2 %:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%, \quad (2)$$

$$s = \sqrt{s^2}, \quad (3)$$

$$s^2 = \frac{\sum_1^n x_i^2 - n \times \bar{x}^2}{f}, \quad (4)$$

$$\bar{x}^2 = \frac{\sum_1^n x_i}{n}, \quad (5)$$

где: \bar{x} – среднее арифметическое результатов параллельных измерений;

x_i – результат отдельного определения;

n – число параллельных измерений;

s^2 – дисперсия;

s – стандартное отклонение;

f – число степеней свободы: $f = n - 1$

Проведение испытания.

В хроматограф последовательно ввести по 10 мкл диметилсульфоксида, испытуемого раствора (по три инъекции каждого раствора) регистрируя хроматограммы.

Содержание диосмина в процентах (X) в пересчете на безводное и свободное от органических растворителей вещество рассчитать по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P \cdot 250}{S_0 \cdot m \cdot (100 - W)}, \quad (6)$$

где: S_1 – площадь пика диосмина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика диосмина на хроматограмме раствора сравнения;

m_1 – навеска субстанции, мг;

m_0 – навеска стандартного образца диосмина, мг;

P – содержание действующего вещества в стандартном образце диосмина, %;

W – суммарное содержание воды и остаточных органических растворителей в субстанции, %.

Требования охраны труда и промышленной безопасности.

- при работе соблюдать требования охраны труда по применению средств индивидуальной защиты согласно инструкции предприятия;
- при работе соблюдать общие положения охраны труда при работе с электрическими приборами согласно инструкции;

- при работе соблюдать требования охраны труда при хранении и применении растворителей согласно инструкции.

Нормативные ссылки - ЛС-002535-250112 «Диосмин субстанция».

Таблица 5 - Записи

Наименование журнала	Наименование шаблона входного	Номер шаблона СОП	Место хранения	Срок хранения
Журнал контроля (активных фармацевтических субстанций)	АФС	0129.10-02-18-04	В архиве документации вместе с досье на серию	6 лет после архивирования

Таблица 6 - Распределение документа

Наименование подразделения	
Отдел обеспечения качества	Контрольно-аналитическая лаборатория
Оригинал	2 экземпляра

Таблица 7 – Приложения

Номер	Название
1	«Аналитический протокол» (Приложение А)

2.3 Написание методики испытания таблеток, покрытых пленочной оболочкой лекарственного препарата «Венарус, (100 мг + 900 мг)

В данном пункте будет прописана методика определения показателей качества таких как подлинность, однородность дозирования, количественное определение, родственные примеси, распадаемость.

Таблица 8 - Оборудование

Наименование	Модель
Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности по ГОСТ-24104, обеспечивающие точность взвешивания 0,0002 г с принтером	OHAUS или Shimadzu или AND
Водяная баня	Julabo
Лабораторная мельница	IKA
Жидкостной хроматограф высокого давления с детектором по УФ поглощению	Agilent или Knauer
Хроматографическая колонка из нержавеющей стали размером 150 x4,6 мм с размером частиц 5 мкм	Диасфер или YMC или Zorbax, аналогичная

Таблица 9 – Реактивы

Наименование	Категория
Вода очищенная (далее вода)	СП №СП-ВВ-0001-18
Вода для ВЭЖХ	Электропроводность не более 0,054 μS
Метанол	Для ВЭЖХ (Isocratic Grade)
Ацетонитрил	ВЭЖХ
Уксусная кислота ледяная	Для ВЭЖХ
Диметилсульфоксид	Pharma grade

Таблица 10 - Посуда и материалы

Наименование
Мерные колбы на 100 мл 2-го класса точности
Мерные колбы на 20 мл 2-го класса точности
Мерные колбы на 10 мл 2-го класса точности
Мерные цилиндры на 1000 мл
Мерные цилиндры на 100 мл
Бутыль из темного стекла
Фильтр «синяя лента»

Таблица 11 - Стандартные образцы

Наименование	Категория
Диосмин	EP CRS, USPRS, Sigma Aldrich, ФС
Гесперидин	EP CRS, ФС
Диосмин для проверки пригодности хроматографической системы	EP CRS

Таблица 12 – Нормирование

Показатель качества	Нормирование
Количественное определение	Содержимое диосмина 855 – 945 мг, гесперидина 95 – 105 мг считая на среднюю массу одной таблетки
Подлинность	Времена удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должны соответствовать временам удерживания пиков на хроматограммах растворов СО диосмина и гесперидина
Родственные примеси	Примесь А – не более 1,0 %; Примесь С – не более 3,0 %; Примесь D – не более 1,0 %; Примесь Е – не более 3,0 %; Примесь F – не более 3,0 %; Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 1,0 %; Сумма всех примесей – не более 10,0 %;
Однородность дозирования	при n = 10 первый показатель приемлемости $AV \leq 15,0 \%$; при n = 30 первый показатель приемлемости $AV \leq 15,0 \%$ и все значения X_i удовлетворяют неравенству $0,75 M \leq X_i \leq 1,25 M$;
Распадаемость	Не более 30 мин

Приготовление растворов.

Подвижная фаза. (Приготовление раствора записать в «Журнал приготовления растворов длительного хранения». Расход ацетонитрила записать в «Карту расхода прекурсора (ацетонитрил)», расход уксусной кислоты ледяной записать в «Карту расхода прекурсора (уксусная кислота

ледяная)», расход метанола записать в «Журнал учета метилового спирта в контрольно-аналитической лаборатории».) Смешать в бутылке из темного стекла 720 мл воды для ВЭЖХ и 280 мл метанола. Добавить к смеси 60 мл уксусной кислоты ледяной и 20 мл ацетонитрила. Отфильтровать, дегазировать любым удобным способом.

Приготовление стандартных растворов.

Исходный раствор стандартного образца (СО) геспиридина (Распечатать чеки с навесками.) Около 10 мг (точная навеска) СО геспиридина поместить в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавить 7 мл диметилсульфоксида, нагревать в течение 15 мин на горячей (80⁰С - 90⁰С) водяной бане с периодическим перемешиванием до полного растворения, охладить до комнатной температуры, довести объем содержимого диметилсульфоксидом до метки, тщательно перемешать. Раствор использовать свежеприготовленным.

Раствор СО геспиридина. Поместить 1,0 мл исходного раствора СО геспиридина в мерную колбу вместимостью 10 мл, довести объем раствора диметилсульфоксидом до метки и тщательно перемешать. Раствор использовать свежеприготовленным.

Раствор стандартного образца (СО) диосмина (распечатать чеки с навесками). Около 18 мг (точная навеска) СО диосмина поместить в мерную колбу вместимостью 20 мл, прибавить 15 мл диметилсульфоксида, нагревать в течение 15 мин на горячей (80⁰С - 90⁰С) водяной бане с периодическим перемешиванием до полного растворения, охладить до комнатной температуры, довести объем раствора диметилсульфоксидом до метки, тщательно перемешать. Раствор использовать свежеприготовленным.

Раствор сравнения. 1,0 мл испытуемого раствора поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл, довести объем раствора диметилсульфоксидом до метки и тщательно перемешать. Раствор использовать свежеприготовленным.

Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы. 1,0 мл раствора сравнения поместить в мерную колбу вместимостью 10 мл, довести объем раствора диметилсульфоксидом до метки и тщательно перемешать. Раствор использовать свежеприготовленным.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы.

5 мг диосмина для проверки пригодности хроматографической системы растворить в 5 мл диметилсульфоксида. Раствор использовать свежеприготовленным.

Приготовление испытуемого раствора.

Испытуемый раствор (распечатать чеки с навесками). Тщательно растереть 20 таблеток, взятых для испытания «Однородность массы». Взвесить около 132 мг (точная навеска) порошка. Порошок поместить в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавить 80 мл диметилсульфоксида, нагревать в течение 15 мин на горячей (80 °С – 90 °С) водяной бане с периодическим перемешиванием, охладить до комнатной температуры, довести объем содержимого диметилсульфоксидом до метки, тщательно перемешать, профильтровать через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. В случае необходимости допускается центрифугирование (при 5000 об/мин в течение 10 мин). Для определения показателя качества «Количественное определение» приготовить 2 пробы.

Исходный испытуемый раствор («Однородность дозирования» гесперицина). Одну тщательно растертую таблетку количественно перенести с помощью 80 мл диметилсульфоксида в мерную колбу вместимостью 100 мл, нагревать в течение 15 мин на горячей (80 °С – 90 °С) водяной бане с периодическим перемешиванием, охладить до комнатной температуры, довести объем содержимого диметилсульфоксидом до метки, тщательно перемешать, профильтровать через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. В случае необходимости допускается центрифугирование (при 5000 об/мин в течение 10 мин).

Рабочий испытуемый раствор («Однородность дозирования» гесперидина.) 1,0 мл исходного испытуемого раствора поместить в мерную колбу вместимостью 10 мл, довести объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешать.

Условия хроматографирования:

- скорость потока подвижной фазы – 1,2 мл/мин;
- детектирование при длине волны – 275 нм;
- объем пробы – 10 мкл;
- время хроматографирования – 6,5-кратное время удерживания пика диосмина для определения показателя качества «Родственные примеси» (около 100 мин при условии удерживания пика диосмина около 15 мин).

Проверка пригодности хроматографической системы для определения показателей качества «Количественное определение» и «Однородность дозирования» (Выполнить при настройке системы). В хроматограф ввести по 10 мкл раствора СО диосмина и раствора СО гесперидина, получая не менее 5 хроматограмм каждого раствора СО.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику диосмина на хроматограмме раствора СО диосмина, не менее 2000 теоретических тарелок;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику гесперидина на хроматограмме раствора СО гесперидина, не менее 2000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика диосмина на хроматограмме раствора СО диосмина не более 2;
- фактор асимметрии пика гесперидина на хроматограмме раствора СО гесперидина не более 2;

- относительное стандартное отклонение (σ) площадей пиков диосмина рассчитанное по 5 последовательным хроматограммам раствора СО диосмина, не превышает 2 %:

$$\sigma = \frac{S_i - S_{cp}}{S_{cp}} \cdot 100\%, (7)$$

- относительное стандартное отклонение (σ) площадей пиков гесперидина рассчитанное по 5 последовательным хроматограммам раствора СО гесперидина, не превышает 2 %:

$$\sigma = \frac{S_i - S_{cp}}{S_{cp}} \cdot 100\%, (8)$$

Проверка пригодности хроматографической системы для определения показателей качества «Родственные примеси» (Выполнить при настройке системы). В хроматограф ввести по 10 мкл раствора для проверки чувствительности хроматографической системы, а потом раствора сравнения, получая не менее 5 хроматограмм, затем раствора для проверки пригодности хроматографической системы, далее диметилсульфоксида.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- разрешение между пиком гесперидина (примесь В) и пиком примеси на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы не менее 2,0;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику диосмина на хроматограмме раствора сравнения, не менее 2000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика диосмина на хроматограмме раствора сравнения не более 2;

- относительное стандартное отклонение (σ) площадей пиков диосмина, рассчитанное по 5 последовательным хроматограммам раствора сравнения, не превышает 5 %:

$$\sigma = \frac{S_i - S_{\text{ср}}}{S_{\text{ср}}} \times 100\%, \quad (9)$$

- отношение сигнал/шум, рассчитанная для пика диосмина на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы, не менее 10/1.

Проведение испытания для определения показателя качества «Количественное определение». Хроматографировать по 10 мкл каждой пробы испытуемого раствора на жидкостном хроматографе, регистрируя хроматограммы. Если тест выполняется сразу после настройки системы, то использовать данные по площадям пиков диосмина и гесперидина на хроматограммах стандартных растворов. Если проводятся последующие анализы, то растворы СО диосмина и СО гесперидина хроматографировать по 10 мкл не менее двух раз каждый, чтобы среднее значение между пиками на параллельных хроматограммах отличалось не более чем на 1 %.

Содержание диосмина в одной таблетке-ядре или таблетке, покрытой пленочной оболочкой, в миллиграммах ($X_{1,2}$) рассчитать по формуле:

$$X_{1,2} = \frac{S_{1,2} \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P \cdot G}{S_0 \cdot a_{1,2} \cdot 20 \cdot 100} = \frac{S_{1,2} \cdot a_0 \cdot P \cdot G}{S_0 \cdot a_{1,2} \cdot 20}, \quad (10)$$

где $S_{1,2}$ - площади пиков диосмина на хроматограммах испытуемого раствора;

S_0 - среднее значение площадей пиков диосмина на хроматограммах раствора СО диосмина;

$a_{1,2}$ - навески порошка растертых таблеток-ядер или таблеток, покрытых пленочной оболочкой, в миллиграммах;

a_0 - навеска СО диосмина в миллиграммах;

G - средняя масса таблеток-ядер или таблеток, покрытых пленочной оболочкой в миллиграммах;

P - чистота основного вещества в СО диосмина процентах.

Содержание диосмина в параллельных пробах должно отличаться не более чем на 1 %.

Содержание гесперицина в одной таблетке-ядре или таблетке, покрытой пленочной оболочкой, в миллиграммах ($X_{1,2}$) рассчитать по формуле:

$$X_{1,2} = \frac{S_{1,2} \cdot a_0 \cdot 100 \cdot P \cdot G \cdot 1}{S_0 \cdot a_{1,2} \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100} = \frac{S_{1,2} \cdot a_0 \cdot P \cdot G}{S_0 \cdot a_{1,2} \cdot 100}, \quad (11)$$

где $S_{1,2}$ - площади пиков гесперицина на хроматограммах испытуемого раствора; S_0 - среднее значение площадей пиков гесперицина на хроматограммах раствора СО гесперицина;

$a_{1,2}$ - навески порошка растертых таблеток-ядер или таблеток, покрытых пленочной оболочкой, в миллиграммах;

a_0 - навеска СО гесперицина в миллиграммах;

G - средняя масса таблеток-ядер или таблеток, покрытых пленочной оболочкой, в миллиграммах;

P - чистота основного вещества в СО гесперицина процентах.

Содержание гесперицина в параллельных пробах должно отличаться не более чем на 1 %.

Вычислить среднее значение содержания диосмина (гесперицина) (X_{cp}) по формуле:

$$X_{cp} = \frac{X_1 + X_2}{2}, \quad (12)$$

Результат внести в протокол анализа таблеток-ядер или таблеток, покрытых пленочной оболочкой, лекарственного препарата «Венарус®» таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 100 мг + 900 мг».

Проведение испытания для определения показателя качества «Подлинность». Сравнить времена удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора и растворов СО диосмина и СО гесперидина, полученных при количественном определении. Времена удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должны соответствовать временам удерживания пиков диосмина и гесперидина стандартных растворов. Результат внести в протокол анализа таблеток-ядер или таблеток, покрытых пленочной оболочкой, лекарственного препарата «Венарус®» таблетки покрытые пленочной оболочкой, 100 мг + 900 мг».

Проведение испытания для определения показателя качества «Родственные примеси». Если тест выполняется сразу после настройки системы, то использовать средние значения данных по площадям пиков диосмина на хроматограмме раствора сравнения и раствора для проверки чувствительности хроматографической системы. Если проводятся последующие анализы, то ввести в хроматограф по 10 мкл растворы в следующей последовательности: диметилсульфоксид, раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствора сравнения, испытуемый раствор.

При оценке не учитывать пики диметилсульфоксида и пики, площадь которых менее площади пика диосмина на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (менее 0,1 %).

Относительные времена удерживания пика гесперидина и пиков идентифицированных примесей по отношению к пику диосмина и поправочные коэффициенты для площади пика примеси:

Таблица 13 - Относительные времена удерживания пиков гесперидина и идентифицированных примесей

Примесь	Относительное время удержания	Поправочный коэффициент для площади пика примеси
Примесь А	Около 0,4	0,38
Гесперидин (примесь В)	Около 0,7	1
Примесь С	Около 0,8	1
Примесь D	Около 2.7	1
Примесь Е	Около	1
Примесь F	Около 5.8	0.61

Рассчитать содержание идентифицированных и неидентифицированных примесей (X) по формуле:

$$X = \frac{S_{\text{исп.прим.}} \cdot K \cdot 100}{S_0}, \quad (13)$$

где $S_{\text{исп.прим.}}$ - площадь пика примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

K - поправочный коэффициент для площади пика примеси;

S_0 - значение площади пика диосмина на хроматограмме раствора сравнения.

Рассчитать содержание суммы всех примесей по формуле:

$$X = \frac{\sum(S_{\text{исп.прим.}} \cdot K) \cdot 100}{S_0}, \quad (14)$$

где $\sum(S_{\text{исп.прим.}} \cdot K)$ - сумма площадей пиков всех примесей на хроматограмме испытуемого раствора с учетом поправочных коэффициентов;

S_0 - значение площади пика диосмина.

Результат внести в протокол анализа лекарственного препарата «Венарус® таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 100 мг + 900 мг».

Проведение испытания для определения показателя качества «Однородность дозирования» Гесперидин.

Хроматографировать по 10 мкл каждого рабочего испытуемого раствора на жидкостном хроматографе, регистрируя хроматограммы. Если тест выполняется сразу после настройки системы, то использовать данные по площадям пиков гесперицина на хроматограммах стандартных растворов. Если проводятся последующие анализы, то раствор СО гесперицина хроматографировать по 10 мкл не менее двух раз, чтобы среднее значение между пиками на параллельных хроматограммах отличалось не более чем на 1 %.

Содержание гесперицина в одной таблетке-ядре или таблетке, покрытой пленочной оболочкой в процентах (X_i) рассчитать по формуле:

$$X_i = \frac{S \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 10 \cdot 1 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100} = \frac{S \cdot a_0 \cdot P}{S_0 \cdot 10}, \quad (15)$$

где S - площадь пика гесперицина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 - площадь пика гесперицина на хроматограмме СО гесперицина;

a_0 - навеска СО гесперицина в миллиграммах;

P - чистота основного вещества в СО гесперицина процентах.

Вычислить среднее содержание гесперицина в испытуемых единицах лекарственного препарата (\bar{X}) в процентах по формуле:

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}, \quad (2.16)$$

где, $\sum X_i$ - суммарное содержание гесперицина в испытуемых единицах лекарственного препарата в процентах.

Вычислить стандартное отклонение (s) по формуле:

$$s = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{x})^2}{n-1}, \quad (17)$$

Вычислить первый показатель приемлемости (AV) по формуле:

$$AV = |M - \bar{x}| + ks, \quad (18)$$

где, \bar{x} - среднее содержание геспиридина в испытуемых единицах лекарственного препарата;

s - стандартное отклонение;

k - константа приемлемости (если $n = 10$, тогда $k = 2,4$;

если $n = 30$, тогда $k = 2,0$, где n - количество испытуемых таблеток);

M - эталонное значение дозы в процентах от ее номинального значения, зависящее от \bar{x} :

Таблица 14 - Эталонное значение дозы в процентах от ее номинального значения

Значение \bar{x}	Значение M
Если $98,5 \% \leq \bar{x} \leq 101,5 \%$	$M = \bar{x}$
Если $\bar{x} < 98,5 \%$	$M = 98,5 \%$
Если $\bar{x} > 101,5 \%$	$M = 101,5 \%$

Результат испытания признать удовлетворительным, если $n = 10$ первый показатель приемлемости $AV \leq 15,0 \%$.

Если это условие не выполняется, испытание продолжить на оставшихся 20 ранее отобранных единицах испытуемого препарата. Окончательный результат испытания признать удовлетворительным, если при $n = 30$ первый показатель приемлемости $AV \leq 15,0 \%$ и все значения X_i удовлетворяют неравенству $0,75M \leq X_i \leq 1,25M$.

Результат внести в протокол анализа лекарственного препарата «Венарус® таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 100 мг + 900 мг».

Требования охраны труда и промышленной безопасности:

- при работе соблюдать требования охраны труда по применению средств индивидуальной защиты согласно инструкции;
- при работе соблюдать общие положения охраны труда при работе с электрическими приборами согласно инструкции;
- при работе соблюдать требования охраны труда при транспортировке, хранении и применении кислот и щелочей согласно инструкции;
- при работе соблюдать требования охраны труда при хранении и применении растворителей согласно инструкции;
- при работе соблюдать требования охраны труда при хранении и применении метилового спирта согласно инструкции.

В приведенной методике испытаний использованы условия проведения анализа, а также условия подготовки испытуемого и стандартного растворов идентичные валидированным методикам контроля качества лекарственного препарата «Венарус® таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 100 мг + 900 мг».

Нормативные ссылки: ЛСР-003561-160119 «Венарус® таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 100 мг + 900 мг»; Промышленный регламент; Государственная Фармакопея Российской Федерации.

Глава 3 Анализ результатов работы

3.1 Отчет о валидации методик определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания флавоноидов в лекарственном препарате «Венарус»

Цель: в результате лабораторных исследований доказать, что методики определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания флавоноидов в лекарственном препарате Венарус® 1000 таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 1000 мг дают достоверные и воспроизводимые результаты.

Область применения: валидация методик определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания флавоноидов в лекарственном препарате Венарус® 1000 таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 1000 мг путем анализа модельных смесей [10].

Ответственность:

- ответственность за разработку отчета о валидации несет химик-аналитик;
- ответственность за проверку отчета о валидации несет руководитель отдела аналитических исследований;
- ответственность за качество и своевременное выполнение работ по валидации несут химик-аналитик, руководитель группы валидации аналитических методик;
- ответственность за утверждение отчета о валидации несет руководитель ЦФР;

Перечень используемой документации:

- Государственная Фармакопея Российской Федерации, ОФС.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»;
- СОП «Валидация аналитических методик проведения испытаний

лекарственных средств»;

- проект НД «Венарус® 1000 таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 1000 мг».

Используемое оборудование и материалы.

Оборудование:

- весы лабораторные электронные GR-120, свидетельство поверки № АБ 0155744 действительно до 14 мая 2020 г.;
- хроматограф жидкостной Knauer Smartline 2500 UVD 100684/101350, свидетельство поверки № АА 7109039 действительно до 14 ноября 2019 г.;
- хроматограф жидкостной Agilent Technologies 1290 Infinity II LC с VWD, свидетельство поверки № АА7109038 действительно до 14 ноября 2019 г.;
- хроматографическая колонка из нержавеющей стали размером 150 x 4,6 мм YMC - Pack ODS-A с размером частиц 5 мкм, № 120ZA70194;
- хроматографическая колонка из нержавеющей стали размером 150 x 4,6 мм YMC - Pack ODS-A с размером частиц 5 мкм, № 123XA70049;
- перемешивающее устройство «Экрос» 6500.

Материалы:

- вода очищенная деионизированная, Millipore;
- уксусная кислота ледяная, for analysis;
- ацетонитрил, HPLC-S;
- метанол, HPLC-S;
- диметилсульфоксид, HPLC-S;
- стандартный образец микронизированной очищенной флавоноидной фракции (стандарт фирмы «Интеркуим С.А., Испания»);
- стандартный образец диосмин (USP RS);
- стандартный образец гесперидин (EP CRS);
- стандартный образец диосмина для проверки пригодности хроматографической системы (diosmin for system suitability; EP CRS);

- вспомогательные вещества;
- целлюлоза микрокристаллическая тип 101 (USP/NF);
- карбоксиметилкрахмал натрия (USP/NF);
- желатин (USP/NF);
- тальк (USP/NF);
- магния стеарат (USP/NF);
- гипромеллоза (USP/NF);
- макрогол 6000 (USP/NF);
- натрия лаурилсульфат (F.ur.Ph.);
- титана диоксид (USP/NF);
- краситель железа оксид красный (USP/NF);
- краситель железа оксид желтый (USP/NF);

Методика определения подлинности – ВЭЖХ.

Описание методики: времена удерживания пиков флавоноидов на хроматограмме испытуемого раствора должны соответствовать временам удерживания основных пиков на хроматограмме стандартного раствора микронизированной очищенной флавоноидной фракции.

Таблица 15 – Проведение валидации: критерий приемлемости параметра специфичность

Параметр	Критерий приемлемости
Специфичность	На хроматограмме раствора плацебо должен отсутствовать сигнал в области пиков флавоноидов

Специфичность - сравнение с хроматограммой раствора плацебо.

Приготовление раствора плацебо. Около 32 мг порошка растертого плацебо помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл. прибавляют 80 мл диметилсульфоксида, нагревают в течение 15 мин на горячей водяной бане с периодическим перемешиванием, охлаждают до комнатной температуры,

доводят объем содержимого тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

Раствор используют свежеприготовленным.

Стандартный раствор микронизированной очищенной флавоноидной фракции. 10,0 мг стандартного образца микронизированной очищенной флавоноидной фракции (стандарт фирмы «Интеркуим С.А., Испания», содержит флавоноиды диосмин, гесперидии, изорхоифолин, линарин и диосметин) помещают в мерную колбу вместимостью 10мл, прибавляют 7мл диметилсульфоксида, перемешивают до полного растворения, доводят объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешивают.

Хроматографируют полученные растворы в условиях, описанных в разделе «Количественное определение флавоноидов» и сравнивают полученные хроматограммы.

На хроматограмме раствора плацебо должен отсутствовать сигнал в области пиков флавоноидов (рисунок 4).

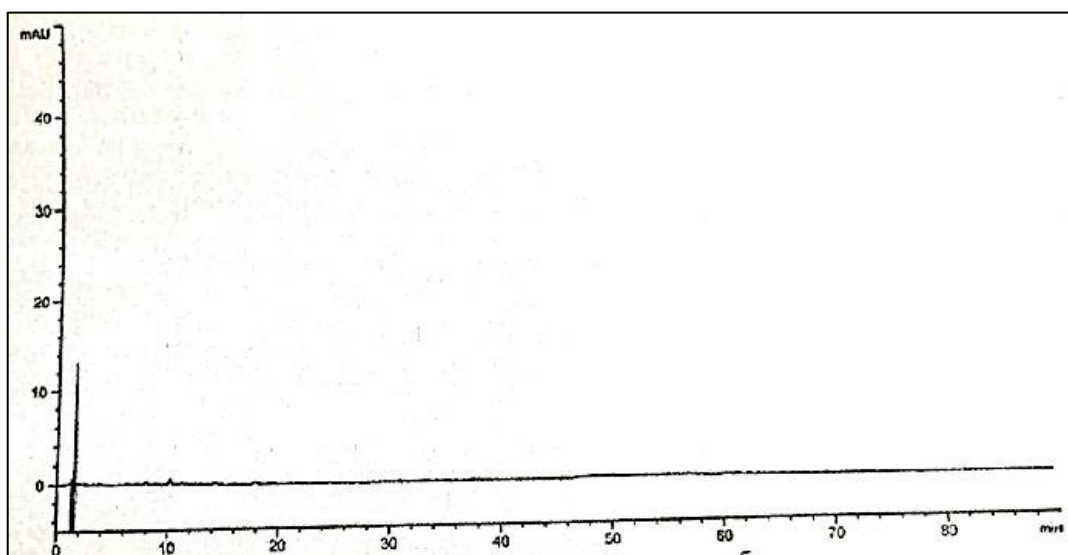
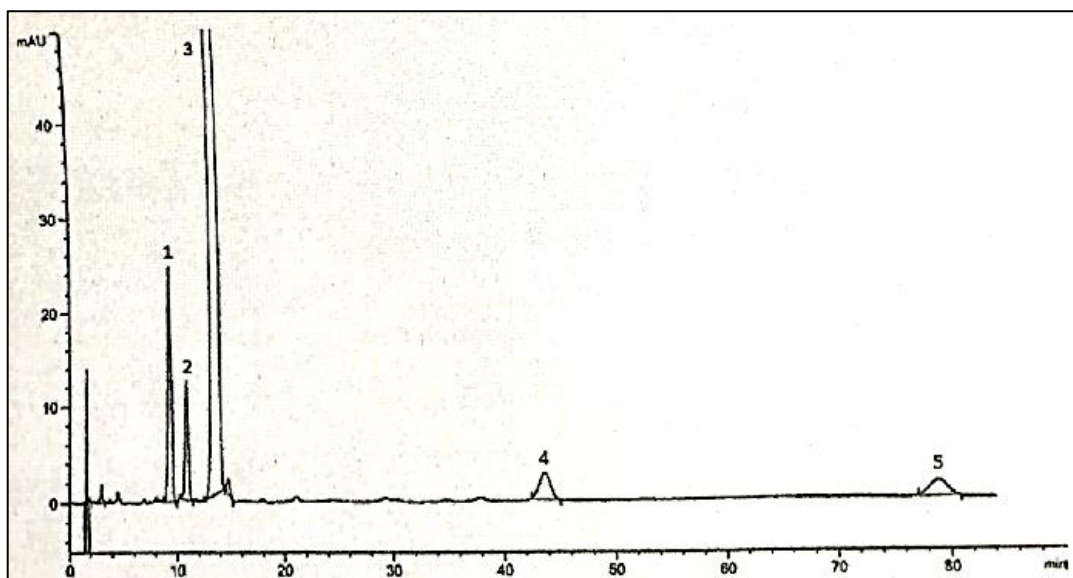


Рисунок 4 - Хроматограмма раствора плацебо



(пик 1 – гесперидин, пик 2 – изорхоифолин, пик 3 – диосмин, пик 4 – линарин, пик 5 – диосметин)

Рисунок 5 - Хроматограмма раствора СО микронизированной очищенной флавоноидной фракции

Результат: На хроматограмме раствора плацебо отсутствует сигнал в области пиков флавоноидов. Соответствует критериям приемлемости.

Заключение: специфичность методики доказана.

Методика определения родственных примесей.

Описание методики:

Норма: любая единичная примесь - не более 1,0 %; сумма примесей - не более 2,0 %.

Метод: ВЭЖХ.

Приготовление растворов.

Испытуемый раствор: указан в разделе «Количественное определение флавоноидов».

Раствор сравнения. 1,0 мл испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы. 1,0 мл раствора сравнения помещают в мерную колбу вместимостью 5 мл, доводят объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Хроматографические условия: указан в разделе «Количественное определение флавоноидов».

Проверка пригодности хроматографической системы: хроматографируют раствор сравнения и раствор для проверки чувствительности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику диосмина на хроматограмме раствора сравнения, составляет не менее 2000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика диосмина на хроматограмме раствора сравнения - не более 2,0;
- относительное стандартное отклонение площади пика диосмина, рассчитанное по 5 последовательным хроматограммам раствора сравнения, не превышает 5,0 %;
- отношение сигнал/шум, рассчитанное для пика диосмина на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы, составляет не менее 10/1.

Методика и оценки:

Хроматографируют по 10 мкл растворителя (диметилсульфоксид), раствора сравнения и испытуемого раствора.

Для идентификации пиков примесей ацетоизованиллона и 6-йододиосмина используют хроматограмму раствора для проверки пригодности хроматографической системы (раздел «Количественное определение флавоноидов»).

В указанных условиях ожидаемое время удерживания пика диосмина составляет около 13 мин, относительное время удерживания пика - ацетоизованиллона составляет около 0,4, пика 6-йододиосмина - около 2,8 (по отношению ко времени удерживания пика диосмина).

При оценке содержания примесей учитывают поправочный коэффициент для площади пика ацетоизованиллона: площадь пика примеси умножают на 0,4.

На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика любой единичной примеси (идентифицированной и неидентифицированной) не должна превышать площадь пика диосмина на хроматограмме раствора сравнения (не более 1,0 %); сумма площадей пиков всех примесей должна не более чем в 2 раза превышать площадь пика диосмина на хроматограмме раствора сравнения (не более 2,0 %).

Не учитывают пики растворителя, пики, соответствующие флавоноидам (пики диосмина, гесперидина, изорхоифолина, линарина и диосметина) и пики, площадь которых менее площади пика диосмина на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (менее 0,2 %).

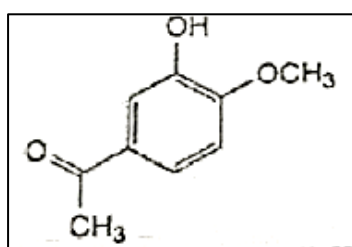


Рисунок 6 - Ацетоизованиллон: 1-(3-гидрокси-4-метоксифенил) этан-1-ОН

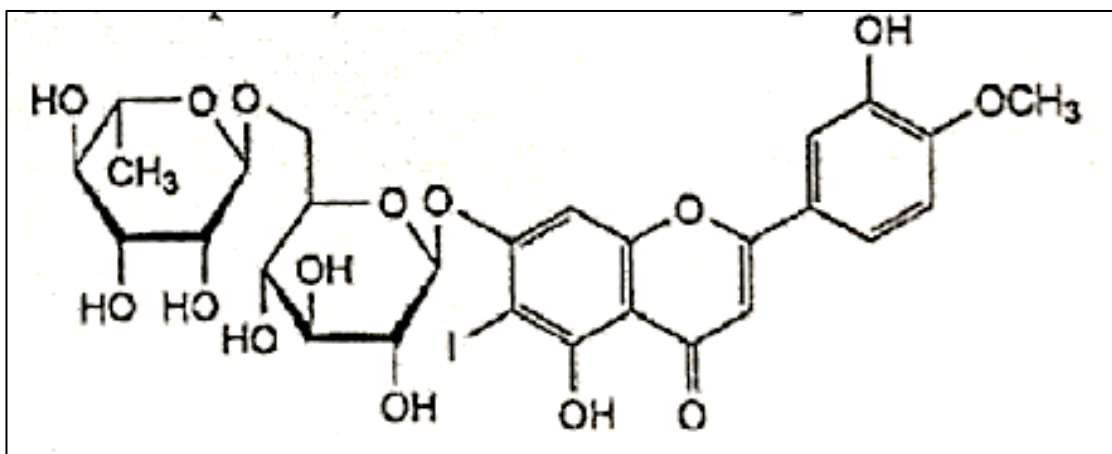


Рисунок 7 - 6-йододиосмин: 7-[[6-О-(6-деокси-α-L-маннопира-но-зил)-β-D- глюкопиранозил]окси]-5-гидрокси-2-(3-гидрокси-4-метоксифенил)-6-йод-4Н-1-бензопиран-4-он

Проверка пригодности хроматографической системы.

Результат:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику диосмина на хроматограмме раствора сравнения, составляет 6 621 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика диосмина на хроматограмме раствора сравнения-0,99;
- относительное стандартное отклонение площади пика диосмина, рассчитанное по пяти последовательным хроматограммам раствора сравнения-0,29 %;
- отношение сигнал/шум, рассчитанное для пика диосмина на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы, составляет 15,7.

Заключение: пригодность хроматографической системы подтверждена.

Таблица 16 – Проведение валидации: критерий приемлемости различных параметров

Параметр	Критерии приемлемости
Специфичность	На хроматограмме раствора плацебо должны отсутствовать любые пики, кроме пиков растворителя и пиков с площадью, меньшей площади пика диосмина на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы, и пики, время удерживания которых совпадает с временем удерживания пиков примесей ацетоизованиллона и 6-йододиосмина.
Линейность	$r > 0,95$
Предел количественного определения	Отношение сигнал/шум > 10
Прецизионность Повторяемость Промежуточная прецизионность	Относительное стандартное отклонение (RSD) не должно превышать 4 %. Среднее значение для каждой выборки должно находиться в интервале 90-110 % от истинного значения.
Правильность	Количественное содержание примесей должно находиться в диапазоне 95-105 %
Диапазон применения	Методика должна быть применима в интервале от «Предела количественного определения» до 200 % от допустимого содержания определяемой примеси.

Специфичность.

Приготовление раствора плацебо. Около 32 мг тщательно растертого порошка плацебо помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл диметилсульфоксида, нагревают в течение 15 мин на горячей водяной бане с периодическим перемешиванием, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем содержимого тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

Раствор используют свежеприготовленным.

Хроматографируют растворитель, раствор плацебо, раствор сравнения, раствор для проверки чувствительности хроматографической системы и раствор для проверки пригодности хроматографической системы.

Сравнивают полученные хроматограммы.

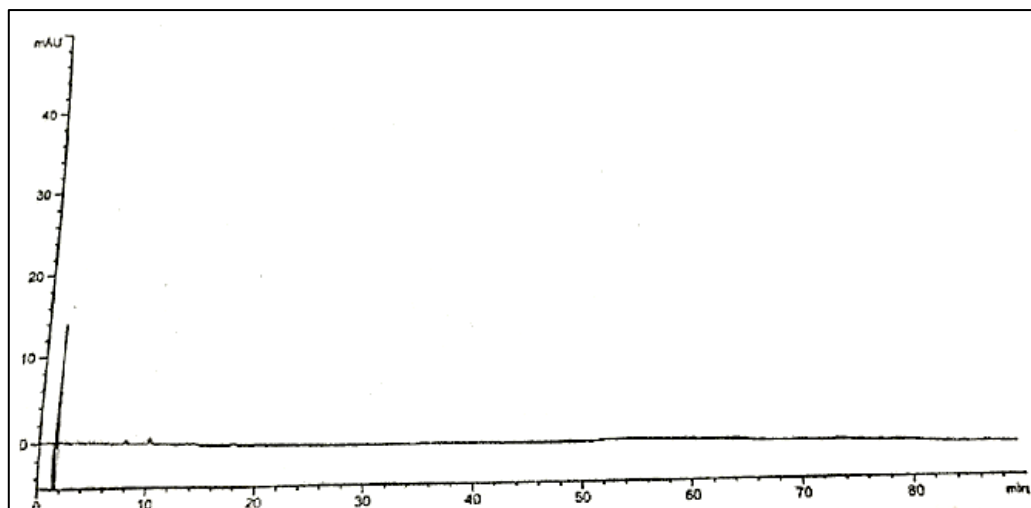


Рисунок 8 - Хроматограмма растворителя

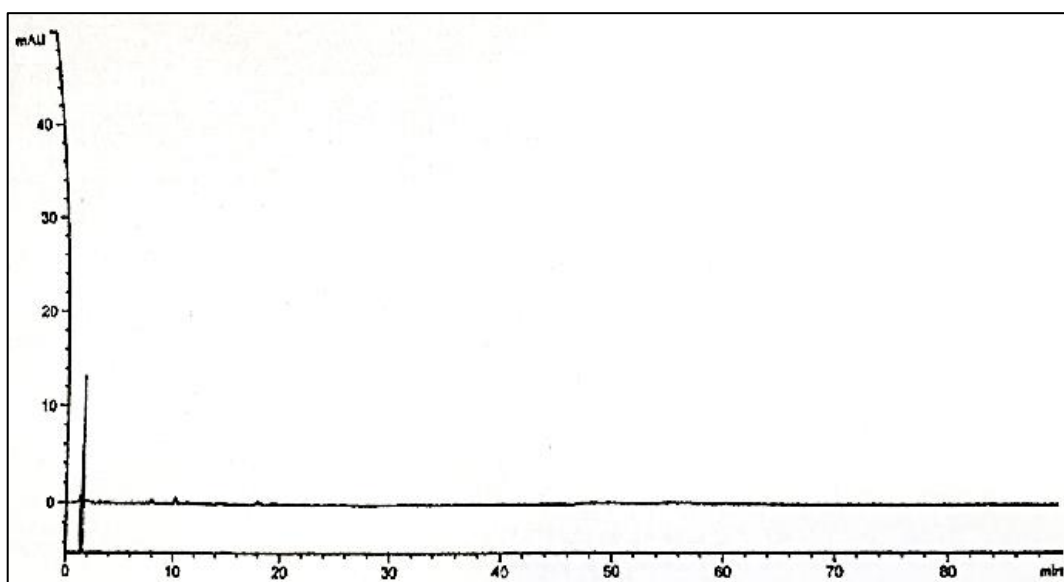


Рисунок 9 - Хроматограмма раствора плацебо

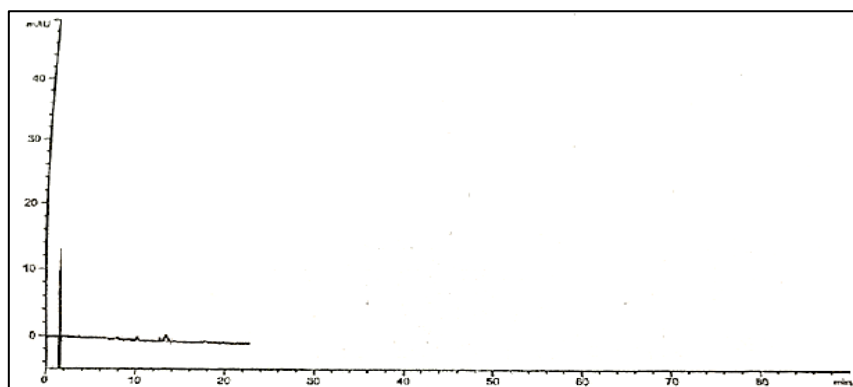


Рисунок 10 - Хроматограмма раствора для проверки чувствительности хроматографической системы

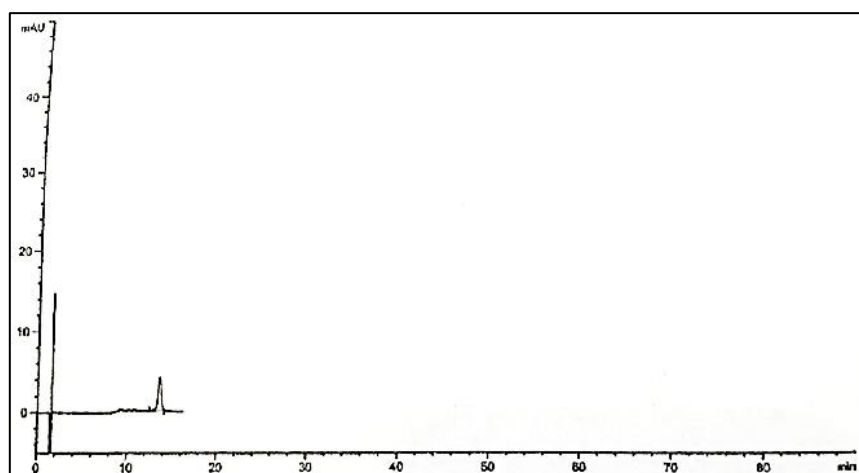
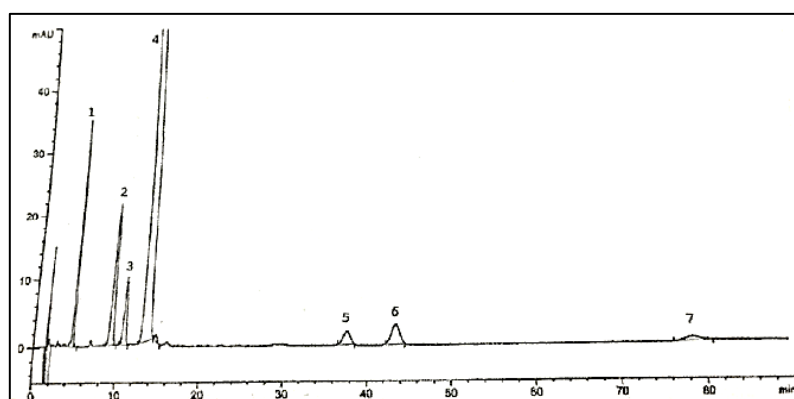
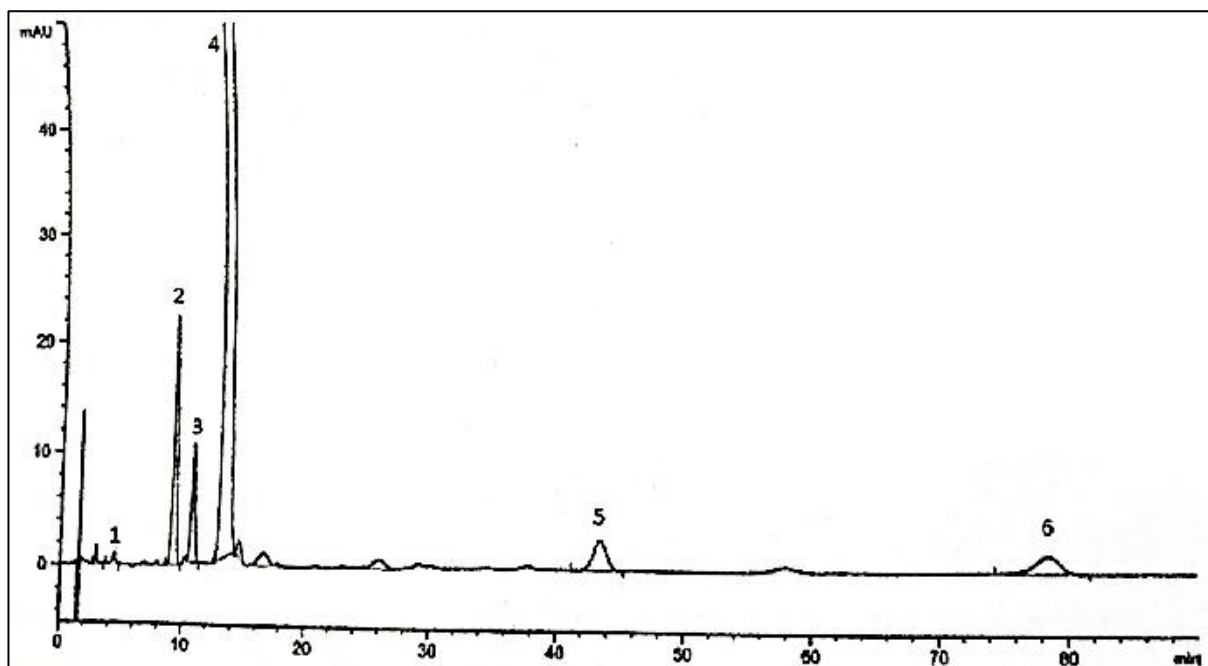


Рисунок 11 - Хроматограмма раствора сравнения



(пик 1 – ацетоизованиллоза, пик 2 – гесперидин, пик 3 – изорхоифолин, пик 4 – диосмин, пик 5 – 6 – йододиосмин, пик 6 – линарин, пик 7 – диосметин)

Рисунок 12 - Хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы



(пик 1 – ацетоизованиллоза, пик 2 – гесперидин, пик 3 – изорхоифолин, пик 4 – диосмин, пик 5– линарин, пик 6 – диосметин)

Рисунок 13 - Хроматограмма испытуемого раствора

Результат: На хроматограмме раствора плацебо отсутствуют любые пики, кроме пиков растворителя.

Заключение: специфичность методики подтверждена.

Линейность.

Приготовить растворы, содержащие 0,2 %, 0,5 %, 1,0 %, 1,5 % и 2,0 % диосмина от концентрации диосмина в испытуемом растворе (0,9 мг/мл) (три повтора для каждого уровня концентрации).

Построить график линейной зависимости средних значений площади пика на полученных хроматограммах от концентрации аналита в растворе (таблица 17). Рассчитать величину коэффициента корреляции r .

Коэффициент корреляции должен быть не менее 0,95.

Таблица 17- Линейность

Уровень концентрации, % (x)	мг/мл	S_1	S_2	S_3	$S_{cp.(y)}$	стан. отк.	отн. стан. откл.
0,20	0,0018	24,51	24,98	25,17	24,89	0,34	1,37
0,50	0,0045	66,12	65,72	66,89	66,24	0,59	0,90
1,00	0,0090	125,71	124,13	126,08	125,31	1,04	0,83
1,50	0,0135	193,56	192,51	190,41	192,16	1,60	0,83
2,00	0,0180	250,17	248,61	247,84	248,87	1,19	0,48
r =	0,99961						

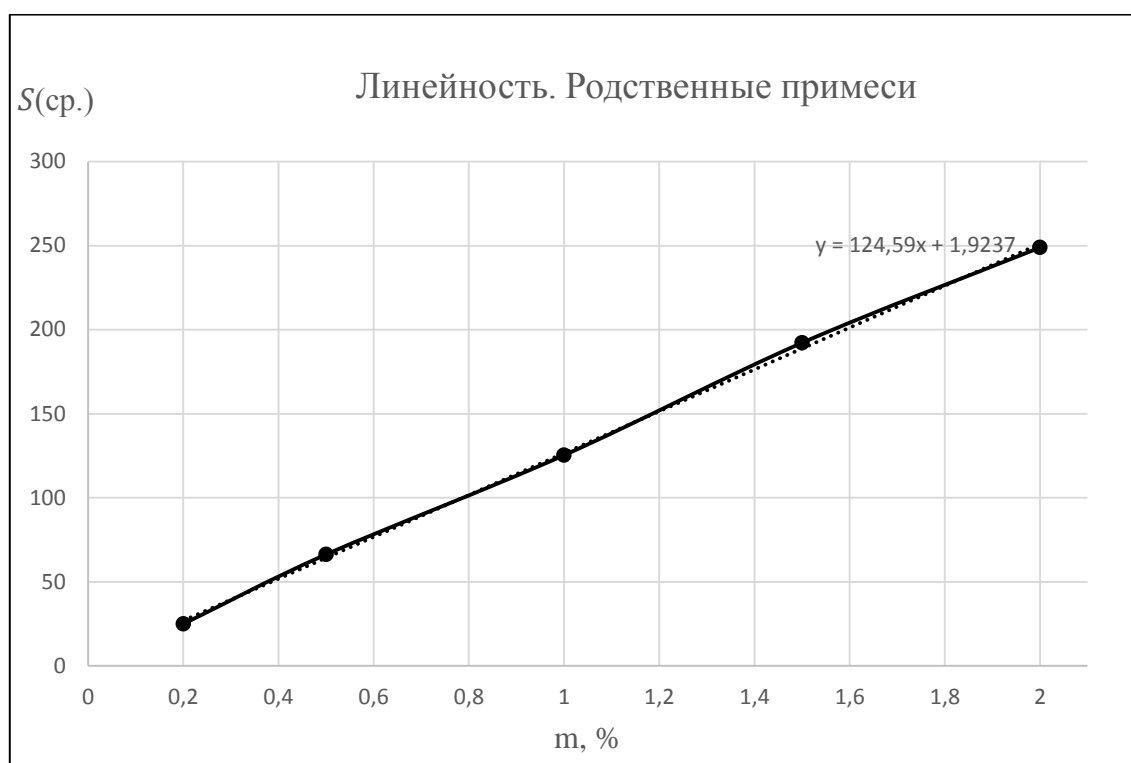


Рисунок 14 - График линейной зависимости площади пика диосмина от концентрации

Результат: коэффициент корреляции $r = 0,99961$.

Заключение: линейность методики доказана.

Предел количественного определения: используя хроматограммы, полученные в разделе 5.2.1 установить концентрацию диосмина, при которой величина отношения аналитического сигнала к шуму >10 .

Заключение: значение сигнал/шум на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы 15,7, следовательно, этот уровень концентрации и является пределом количественного определения диосмина.

Прецизионность.

Повторяемость: для оценки повторяемости рассчитать относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика диосмина на хроматограммах растворов, полученных в разделе 5.2.2, для трех уровней концентрации (0,2 %, 1,0 %, 2,0 %).

Относительное стандартное отклонение не должно превышать 4 %.

Заключение: повторяемость методики доказана (таблица 1).

Промежуточная прецизионность: от модельных растворов, содержащих 0,2 %, 1,0 %, 2,0 % диосмина, отобрать пробы и проанализировать их в полном соответствии с валидируемой методикой, включая пробоподготовку. Провести не менее девяти анализов (три повтора для трех уровней концентрации) на двух различных приборах, двумя аналитиками в разное время. Рассчитать относительное стандартное отклонение (RSD) и среднее значение полученных результатов (таблицы 18-19).

Таблица 18 - Промежуточная прецизионность. Выборка 1

		S_0	S	x, (%)
уровень концентрации 0,2% (от концентрации диосмина в испытуемом растворе)	Раствор ₁	125,12	26,51	0,21
	Раствор ₂		25,78	0,21
	Раствор ₃		24,65	0,20
	среднее значение =		25,65	0,205
	стандартное отклонение =		0,94	0,01
	относительное стандартное отклонение =		3,65	3,65

Продолжение таблицы 18

уровень концентрации 1,0% (от концентрации диосмина в испытуемом растворе)	Раствор ₁	125,12	126,59	1,01
	Раствор ₂		124,12	0,99
	Раствор ₃		125,06	1,00
	среднее значение =		125,26	1,001
	стандартное отклонение =		1,25	0,010
	относительное стандартное отклонение =		1,00	1,00
уровень концентрации 2,0 % (от концентрации диосмина в испытуемом растворе)	Раствор ₁	125,12	248,36	1,98
	Раствор ₂		251,44	2,01
	Раствор ₃		245,39	1,96
	среднее значение =		248,40	1,985
	стандартное отклонение =		3,03	0,024
	относительное стандартное отклонение =		1,22	1,22

Таблица 19 - Промежуточная прецизионность. Выборка 2

		S_0	S	$x, (\%)$
уровень концентрации 0,2 % (от концентрации диосмина в испытуемом растворе)	Раствор ₁	124,19	24,85	0,20
	Раствор ₂		24,13	0,19
	Раствор ₃		25,05	0,20
	среднее значение =		24,68	0,199
	стандартное отклонение =		0,48	0,00
	относительное стандартное отклонение =		1,96	1,96
уровень концентрации 1,0 % (от концентрации диосмина в испытуемом растворе)	Раствор ₁	124,19	125,19	1,01
	Раствор ₂		124,02	1,00
	Раствор ₃		124,36	1,00
	среднее значение =		124,52	1,003
	стандартное отклонение =		0,60	0,005
	относительное стандартное отклонение =		0,48	0,48
уровень концентрации 2,0 % (от концентрации диосмина в испытуемом растворе)	Раствор ₁	124,19	250,13	2,01
	Раствор ₂		249,39	2,01
	Раствор ₃		248,96	2,00
	среднее значение =		249,49	2,009
	стандартное отклонение =		0,59	0,005
	относительное стандартное отклонение =		0,24	0,24

Результат: Среднее значение для всех уровней концентрации находится в интервале 90 % - 110 %, относительное стандартное отклонение не превышает 4 %. Соответствует критериям приемлемости.

Заключение: промежуточная прецизионность методики доказана.

Правильность.

Приготовить модельные растворы, содержащие все компоненты матрицы (плацебо) и разные количества диосмина для трех уровней концентрации 0,2 %, 1,0 %, 2,0 % от концентрации диосмина в испытуемом растворе (три повтора для каждого уровня концентрации).

Правильность доказывается соответствием величины открываемости в процентах, которая должна находиться в диапазоне 95-105 %, соответственно.

Полученные модельные растворы проанализировать в полном соответствии с валидируемой методикой. Рассчитать открываемость и относительное стандартное отклонение (RSD) (Таблица 20).

Таблица 20 - Относительное стандартное отклонение (RSD) и открываемость

		S_0	S	x	$z = \bar{x} \cdot 100 / \mu$
уровень концентрации 0,2 % (от концентрации диосмина в испытуемом растворе)	Раствор ₁	125,12	25,16	0,20	102,49
	Раствор ₂		24,83	0,20	
	Раствор ₃		25,94	0,21	
	среднее значение (\bar{x})			0,205	
	стандартное отклонение S			0,01	
	относительное стандартное отклонение (RSD)			3,65	
уровень концентрации 1,0 % (от концентрации диосмина в испытуемом растворе)	Раствор ₁	125,12	126,59	1,01	100,11
	Раствор ₂		124,12	0,99	
	Раствор ₃		125,06	1,00	
	среднее значение (\bar{x})			1,001	
	стандартное отклонение S			0,010	
	относительное стандартное отклонение (RSD)			1,00	

Продолжение таблицы 20

уровень концентрации 2,0 % (от концентрации диосмина в испытуемом растворе)	Раствор ₁	125,12	248,36	1,98	99,26
	Раствор ₂		251,44	2,01	
	Раствор ₃		245,39	1,96	
	среднее значение (\bar{x})			1,985	
	стандартное отклонение S			0,024	
	относительное стандартное отклонение (RSD)			1,22	

Результат: Открываемость среднего значения для всех уровней концентрации составляет 102,49 %, 100,11 %, 99,26 %, соответственно, относительное стандартное отклонение (RSD) не превышает 4 %. Соответствует критериям приемлемости.

Заключение: правильность методики доказана.

Диапазон применения: методика должна быть применима в интервале от «Предела количественного определения» до 200 % от допустимого содержания определяемой примеси.

Заключение: все результаты удовлетворяют критериям приемлемости в диапазоне от «Предела количественного определения» до 200 % от допустимого содержания определяемой примеси.

Количественное определение флавоноидов.

Описание методики:

Норма:

- диосмин: 87,0 - 93,0 %;
- гесперидии: 2,5 - 5,0 %;
- изорхоифолин: 0,9 - 2,8 %;
- линарин: 0,9 - 2,8 %;
- диосметин: не более 2,0 %;
- сумма флавоноидов (без учета диосмина): не более 13,0 %;
- сумма всех флавоноидов: 95,0-102,0 %.

Метод: ВЭЖХ.

Приготовление растворов.

Испытуемый раствор. Отбирают 20 таблеток, определяют среднюю массу, растирают в порошок. Около 132 мг (точная навеска) порошка тщательно растертых таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл диметилсульфоксида, нагревают в течение 15 мин на горячей водяной бане с периодическим перемешиванием, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем содержимого тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через фторопластовый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм или через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор 1 стандартного образца (СО) диосмина. Около 18 мг (точная навеска) СО диосмина (EP CRS, USP RS) помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, прибавляют 15 мл диметилсульфоксида, нагревают в течение 15 мин на горячей водяной бане с периодическим перемешиванием до полного растворения, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор 2 стандартного образца (СО) диосмина. 1,0 мл раствора 1 СО диосмина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор стандартного образца (СО) гесперидина. Около 10 мг (точная навеска) СО гесперидина (EP CRS) помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют 7 мл диметилсульфоксида, нагревают в течение 15 мин на горячей водяной бане с периодическим перемешиванием до полного растворения, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного

раствора помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводят объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 5 мг СО диосмина для проверки пригодности хроматографической системы (diosmin for system suitability, EP CRS) (содержит диосмин, гесперидии, ацетоизованиллон, изорхоифолин, 6-йододиосмин, линарин и диосметин) растворяют в 5 мл диметилсульфоксида.

Раствор используют свежеприготовленным.

Хроматографические условия:

– хроматографическая колонка из нержавеющей стали размером 150 x 4,6 мм YMC- Pack ODS-A с размером частиц 5 мкм, или аналогичная, при условии выполнения теста «Проверка пригодности хроматографической системы»:

- температура колонки - 25 °С;
- подвижная фаза (ПФ) - смесь ацетонитрил - уксусная кислота ледяная - метанол - вода (1 : 3 : 14 : 36);
- скорость потока - 1,2 мл/мин;
- детектор - УФ, 275 нм;
- объем пробы - 10 мкл;
- время хроматографирования - 6,5-кратное время удерживания пика диосмина

Для идентификации пиков флавоноидов (диосмина, гесперидина, изорхоифолина, линарина и диосметина) используют хроматограмму раствора для проверки пригодности хроматографической системы.

В указанных условиях ожидаемое время удерживания пика диосмина составляет около 13 мин, относительное время удерживания пика гесперидина составляет около 0,7; пика изорхоифолина - около 0,8; пика

линарина - около 3,2; пика диосметина - около 5,8 (по отношению ко времени удерживания пика диосмина). Условия анализа являются рекомендуемыми и при необходимости могут быть изменены для достижения критериев пригодности хроматографической системы. Проверка пригодности хроматографической системы

Хроматографируют по 10 мкл раствора для проверки пригодности хроматографической системы, раствора 1 СД диосмина и раствора СД гесперицина, получая не менее 5 хроматограмм. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- разрешение между пиком гесперицина и пиком изорхоифолина на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы составляет не менее 2,0;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику диосмина на хроматограмме раствора 1 СД диосмина, составляет не менее 2000 теоретических тарелок;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику гесперицина на хроматограмме раствора СД гесперицина, составляет не менее 2000 теоретических тарелок;
- фактор асимметрии пика диосмина на хроматограмме раствора 1 СД диосмина - не более 2,0;
- фактор асимметрии пика гесперицина на хроматограмме раствора СД гесперицина не более 2,0; относительное стандартное отклонение площади пика диосмина рассчитанное по 5 последовательным хроматограммам раствора 1 СД диосмина, не превышает 2,0 %; относительное стандартное отклонение площади пика гесперицина, рассчитанное по 5 последовательным хроматограммам раствора СД гесперицина, не превышает 2,0 %.

Методика и расчеты:

Хроматографируют по 10 мкл испытуемого раствора, растворов 1 и 2 СО диосмина и раствора СО гесперидина.

Содержание диосмина в одной таблетке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 100 \cdot G \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 20 \cdot L \cdot 100} = \frac{S \cdot a_0 \cdot G \cdot P \cdot 5}{S_0 \cdot a \cdot L}, \quad (20)$$

где S - площадь пика диосмина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 - площадь пика диосмина на хроматограмме раствора 1 СО диосмина;

a - навеска порошка растертых таблеток в миллиграммах;

a_0 - навеска СО диосмина в миллиграммах;

G - средняя масса таблетки в миллиграммах;

L - номинальное значение содержания микронизированной очищенной флавоноидной фракции в таблетке в миллиграммах;

P - содержание основного вещества в СО диосмина в процентах.

Содержание гесперидина в одной таблетке в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 1 \cdot G \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 10 \cdot 20 \cdot L \cdot 100} = \frac{S \cdot a_0 \cdot G \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot L \cdot 2}, \quad (21)$$

где S - площадь пика гесперидина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 - площадь пика гесперидина на хроматограмме раствора СО гесперидина;

a - навеска порошка растертых таблеток в миллиграммах;

a_0 - навеска СО гесперидина в миллиграммах;

G - средняя масса таблетки в миллиграммах;

L - номинальное значение содержания микронизированной очищенной флавоноидной фракции в таблетке в миллиграммах;

P - содержание основного вещества в СО гесперидина в процентах.

Содержание изорхоифолина (или линарина, или диосмстина) в одной таблетке в процентах (X) вычисляют по формуле;

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 1 \cdot G \cdot P \cdot 100 \cdot K}{S_0 \cdot a \cdot 20 \cdot 100 \cdot L \cdot 100} = \frac{S \cdot a_0 \cdot G \cdot P \cdot K}{S_0 \cdot a \cdot L \cdot 20}, \quad (22)$$

где S - площадь пика изорхоифолина (или линарина, или диосметина) на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 - площадь пика диосмина на хроматограмме раствора 2 СО диосмина;

a - навеска порошка растертых таблеток в миллиграммах;

a_0 - навеска СО диосмина в миллиграммах;

G - средняя масса таблетки в миллиграммах;

L - номинальное значение содержания микронизированной очищенной флавоноидной фракции в таблетке в миллиграммах;

K - поправочный коэффициент для площади пика ($K = 0,6$ для диосметина, $K = 1$ для изорхоифолина и линарина);

P - содержание основного вещества в СО диосмина в процентах.

Формулы флавоноидов:

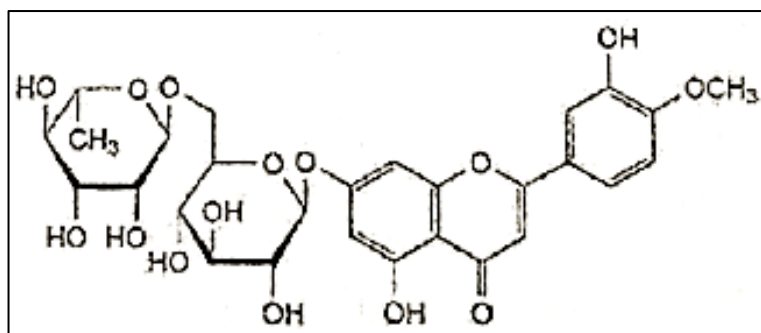


Рисунок -15 - Диосмин: 7-[[6-О-(6-дезоксид- α -L-маннопиранозил)- β -D-глюкопиранозил]окси]-5-гидрокс-2-(3-гидрокси-4-метоксифенил)-4Н-1-бензопиран-4-он

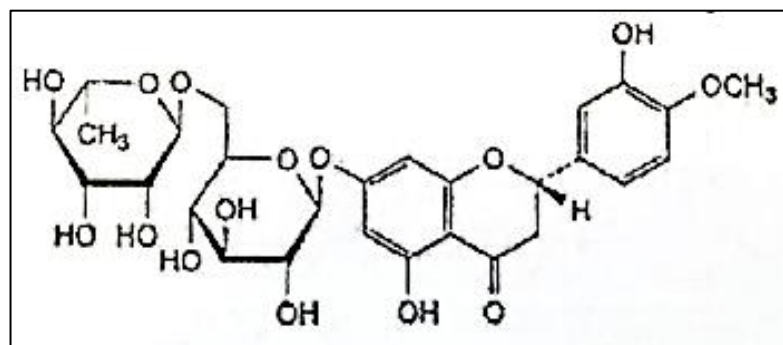


Рисунок -16 - Гесперидин: (2S)-7-[[6-O-(6-деокси- α -L-маннопира-нозил)- β -D-глюкопиранозил]окси]-5-гидрокси-2-(3-гидрокси-4-метоксифенил)-2,3-дигидро-4H-1-бензопиран-4-он

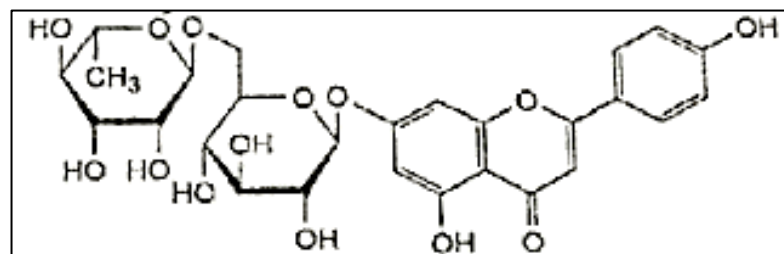


Рисунок -17- Изорхоифолин: 7-[[6-O-(6-деокси- α -L-маннопира-нозил)- β -D-глюкопиранозил]окси]-5-гидрокси-2-(4-гидроксифенил)-4H-1-бензопиран-4-он

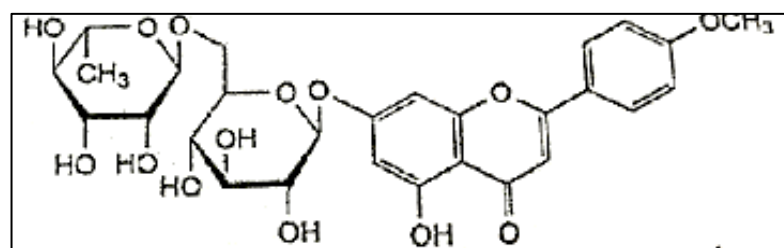


Рисунок -18 - Линарин: 7-[[6-O-(6-деокси- α -L-маннопиранозил)- β -D-глюкопиранозил]окси]-5-гидрокси-2-(4-метоксифенил)-4H-1-бензопиран-4-он

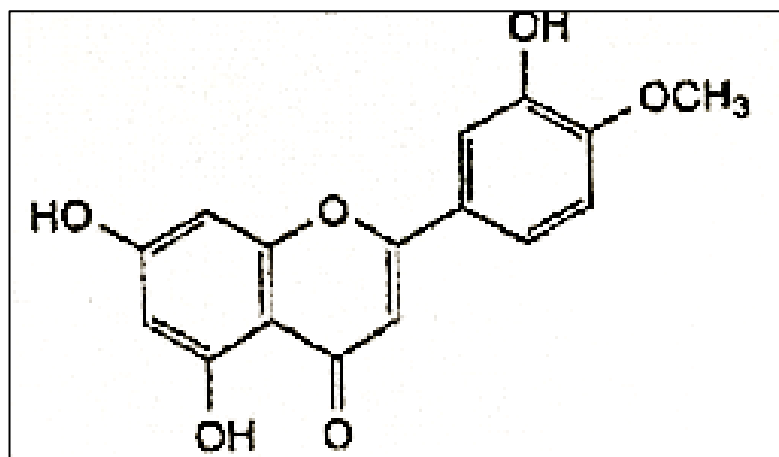


Рисунок - 19 - Диосметин: 5, 7-дигидрокси-2-(3-гидрокси-4-метоксифенил)-4Н-1-бензопиран-4-он

Проверка пригодности хроматографической системы.

Таблица - 21 - Проверка пригодности хроматографической системы: диосмин

Время удерживания, t (мин)	Число теоретических тарелок	Фактор асимметрии	Площадь пика диосмина, (S)
13,315	6 502	0,96	9065,23
13,298	6 482	0,96	9071,18
13,305	6 409	0,96	9056,32
13,312	6 529	0,96	9048,28
13,287	6 513	0,96	9055,61
13,319	6 460	0,95	9063,54
ср. знач.=	13,306	6483	0,96
стан.отк.=	0,012		8,186
отн. стан, отк.=	0,090		0,090

Таблица – 22 - Проверка пригодности хроматографической системы: гесперидин

Время удерживания, t (мин)	Число теоретических тарелок	Фактор асимметрии	Площадь пика диосмина, (S)
9,423	4 593	1,01	524,13
9,405	4 515	1,00	532,91
9,387	4 662	1,00	525.67
9,392	4 593	1,00	528.94

Продолжение таблицы 22

9.408	4 598	1,01	535.97	
9,412	4 665	1,01	527,05	
ср. знач.=	9.405	4604	1,00	529.112
стан.отк.=	0,013			4,526
отн. стан, отк.=	0,141			0,855

Результат:

– разрешение между пиком гесперидина и пиком изорхоифолина на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы составляет 2,87;

– эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику диосмина на хроматограмме раствора 1СО диосмина, составляет 6483 теоретических тарелок;

– эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику гесперидина на хроматограмме раствора СО гесперидина, составляет 4604 теоретических тарелок;

– фактор асимметрии пика диосмина на хроматограмме раствора СО диосмина - 0,96;

– фактор асимметрии пика гесперидина на хроматограмме раствора СО гесперидина - 1,0;

– относительное стандартное отклонение площади пика диосмина, рассчитанное по 5 последовательным хроматограммам раствора 1 СО диосмина. составляет 0,09%;

– относительное стандартное отклонение площади пика гесперидина, рассчитанное по 5 последовательным хроматограммам раствора СО гесперидина, составляет 0,855%.

Заключение: пригодность хроматографической системы подтверждена.

Таблица – 23 - Проведение валидации: критерии приемлемости

Параметр	Критерии приемлемости
Специфичность	На хроматограмме раствора плацебо должен отсутствовать сигнал в области пиков флавоноидов.
Линейность	$r > 0,99$
Прецизионность Повторяемость Промежуточная прецизионность	$RSD \leq 2 \%$, среднее значение должно находиться в интервале от 97,5 до 102,5 % $F \leq F(P, f_1, f_2), t \leq t(P, f_1, f_2)$
Правильность	Значение обнаруживаемости должно находиться в интервале от 97,5 % до 102,5 %. Доверительный интервал должен включать 100 % значение. $ z - 100 < \frac{t(P, f) - z}{\sqrt{n}}$
Диапазон применения	От 80 % до 120 % от номинальной концентрации (содержания)

Специфичность.

Приготовление, раствора плацебо. Около 32 мг порошка, растертого плацебо помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 80 мл диметилсульфоксида, нагревают в течение 15 мин на горячей водяной бане с периодическим перемешиванием, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем содержимого тем же растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

Раствор используют свежеприготовленным.

Хроматографируют раствор плацебо, раствор 1 СО диосмина, раствор 2 СО диосмина и раствор СО гесперидина и сравнивают полученные хроматограммы.

На хроматограмме раствора плацебо (рисунок 20) должен отсутствовать сигнал в области пиков флавоноидов.

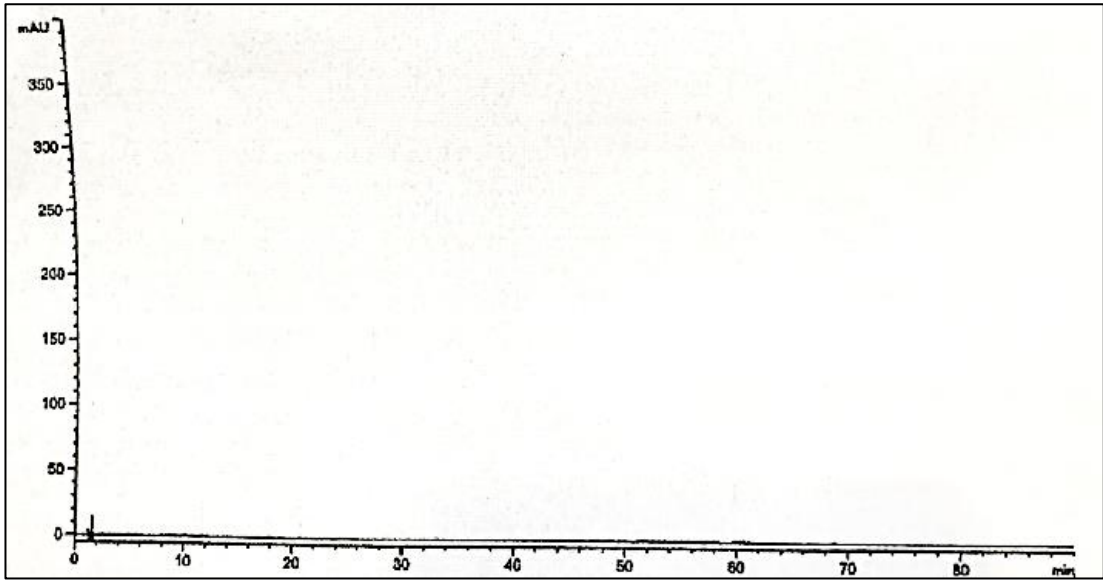


Рисунок 20 - Хроматограмма раствора плацебо

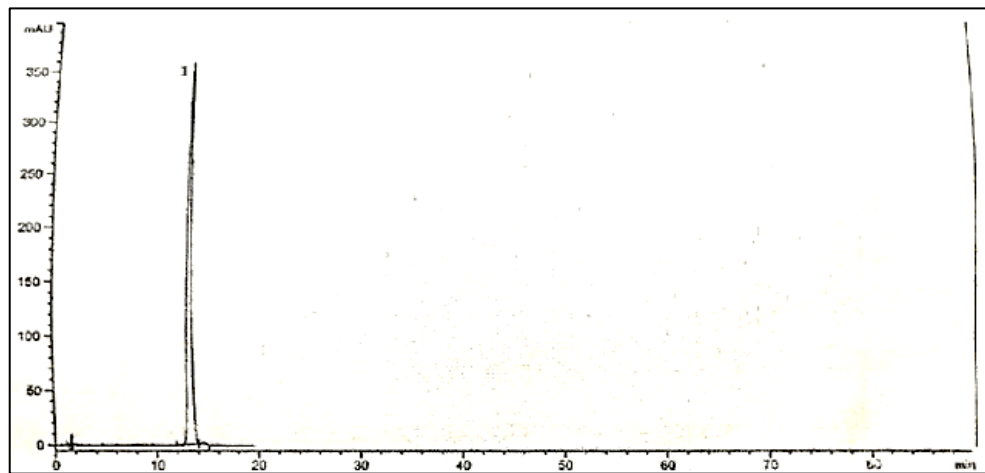


Рисунок 21 - Хроматограмма раствора 1 СО диосмина
(пик 1 – диосмин)

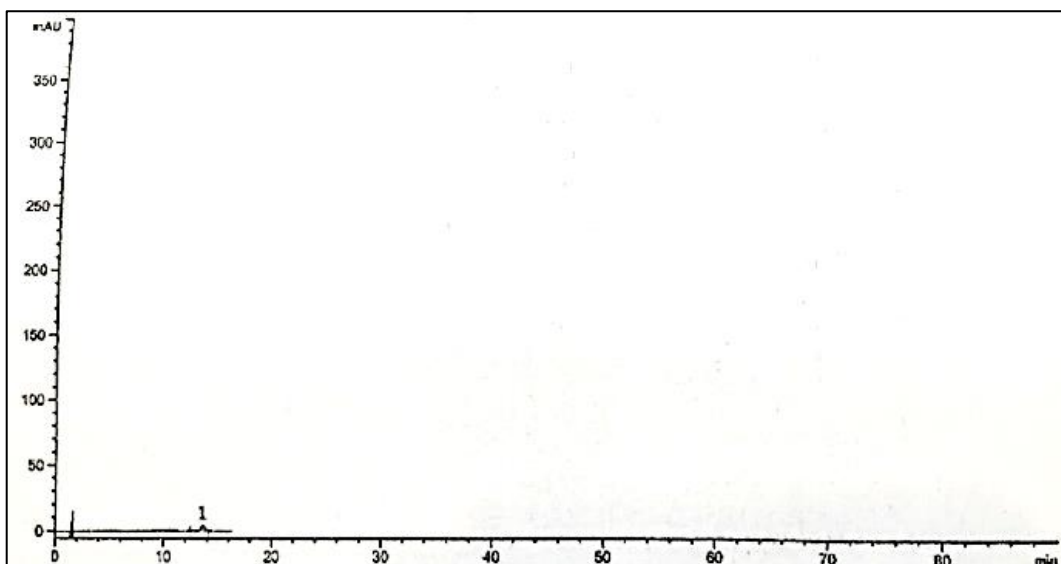


Рисунок 22 - Хроматограмма раствора 2 СО диосмина
(пик 1 – диосмин)

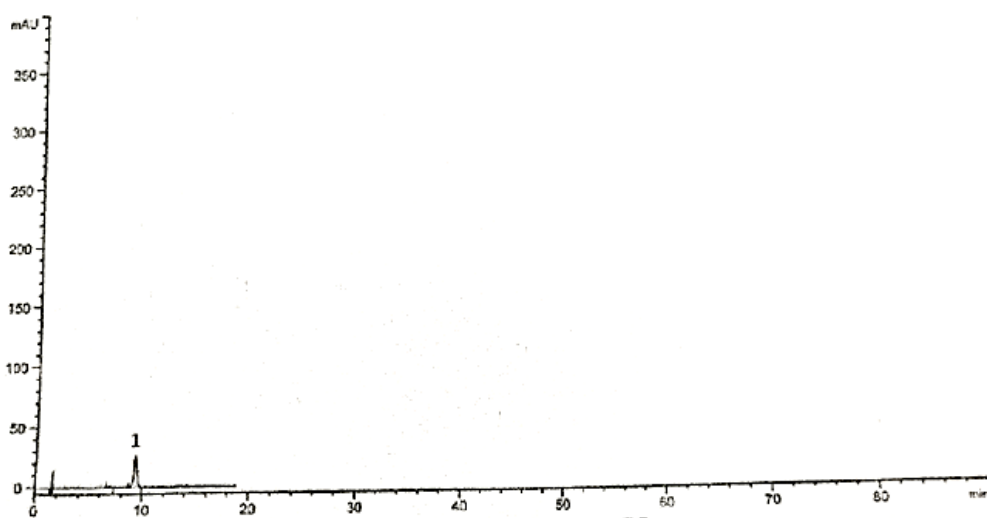


Рисунок 23 - Хроматограмма раствора СО гесперидина
(пик 1 – гесперидин)

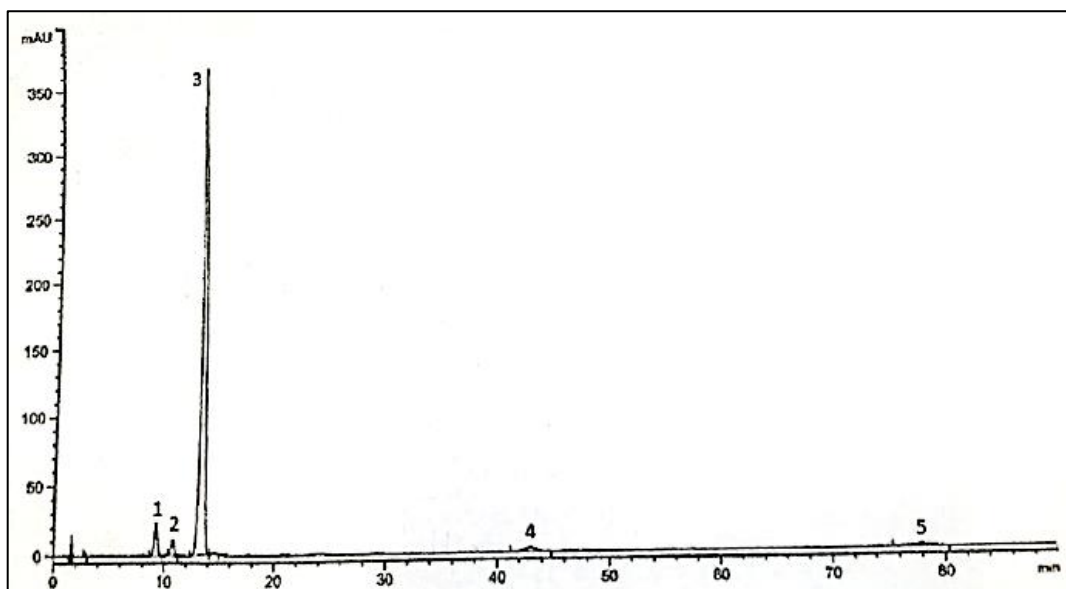


Рисунок 24 - Хроматограмма испытуемого раствора
(пик 1 – гесперидин, пик 2 – изорхоифолин, пик 3 – диосмин, пик 4 –
линарин, пик 5 – диосметин)

Результат: на хроматограмме раствора плацебо отсутствует сигнал в области пиков флавоноидов. Соответствует критерию приемлемости.

Заключение: специфичность методики подтверждена.

Линейность.

Приготовить модельные растворы, содержащие диосмин в количестве 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 % (0,72 мг/мл, 0,81 мг/мл, 0,9 мг/мл, 0,99 мг/мл, 1,08 мг/мл) от номинального значения.

От полученных модельных смесей отобрать пробы и проанализировать их в полном соответствии с валидируемой методикой, включая пробоподготовку.

Построить график линейной зависимости средних значений площадей пиков от концентрации аналита в растворах. Рассчитать величину коэффициента корреляции r .

Коэффициент корреляции должен быть не менее 0,99.

Таблица 24 - Критерий приемлемости - линейность для 1-го СО диосмина

x=μ	S=y
0,72	7289,01
0,81	8319,23
0,90	9073,49
0,99	10154,14
1,08	10998,11
r =	0,99885

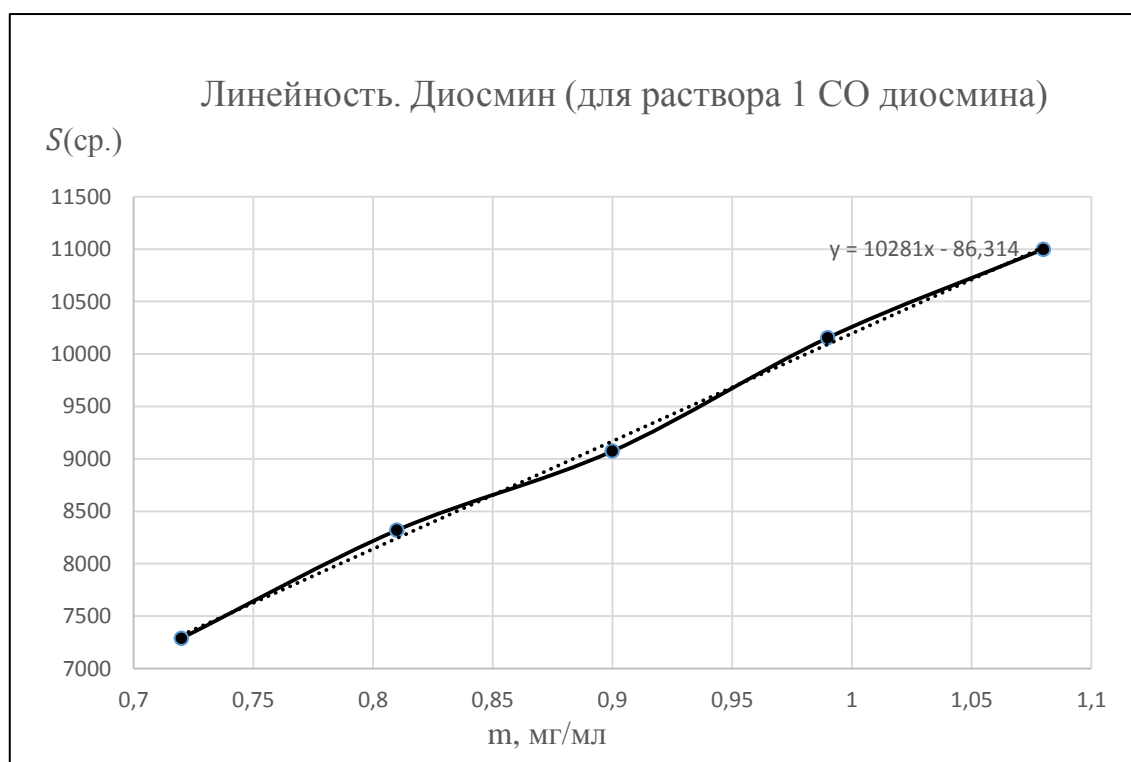


Рисунок 25 - График линейной зависимости среднего значения площади пика диосмина от концентрации аналита в растворе

Приготовить модельные растворы, содержащие диосмин в количестве 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 % (0,0072 мг/мл, 0,0081 мг/мл, 0,009 мг/мл, 0,0099 мг/мл, 0,0108 мг/мл) от концентрации диосмина в растворе 2 СО.

От полученных модельных смесей отобрать пробы и проанализировать их в полном соответствии с валидируемой методикой, включая пробоподготовку.

Построить график линейной зависимости средних значений площадей пиков от концентрации аналита в растворах. Рассчитать величину коэффициента корреляции r .

Коэффициент корреляции должен быть не менее 0,99.

Таблица 25 - Критерий приемлемости-линейность для 2-го СО диосмина

$x=\mu$	$S=y$
0,0072	79,65
0,0081	94,55
0,0090	104,81
0,0099	115,80
0,0108	127,16
$r =$	0,99785

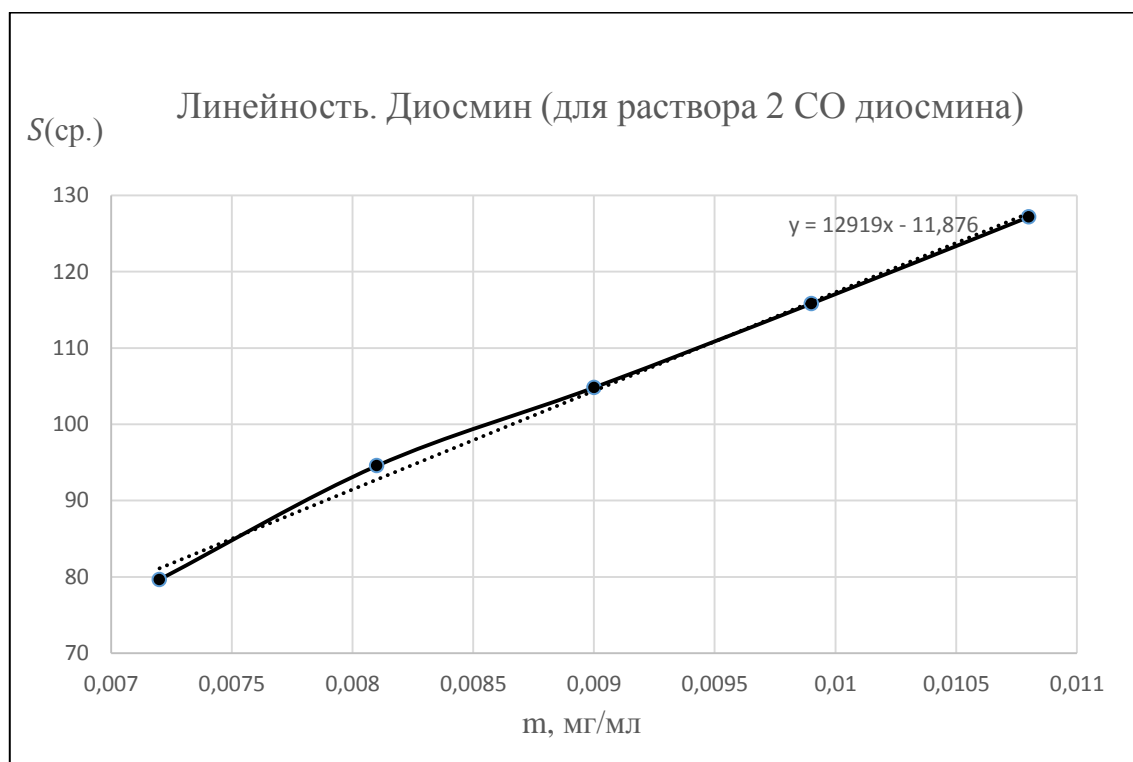


Рисунок 26 - График линейной зависимости среднего значения площади пика диосмина от концентрации аналита в растворе

Приготовить модельные растворы, содержащие гесперидин в количестве 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 % (0,04 мг/мл, 0,045 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,055 мг/мл, 0,06 мг/мл) от номинального значения.

От полученных модельных смесей отобрать пробы и проанализировать их в полном соответствии с валидируемой методикой, включая пробоподготовку.

Построить график линейной зависимости средних значений площадей пиков от концентрации аналита в растворах. Рассчитать величину коэффициента корреляции r .

Коэффициент корреляции должен быть не менее 0,99.

Таблица 26 - Критерий приемлемости - линейность для СО гесперидина

$x=\mu$	$S=y$
0,040	412,00
0,045	473,13
0,050	524,15
0,055	578,44
0,060	624,85
$r =$	0,99897

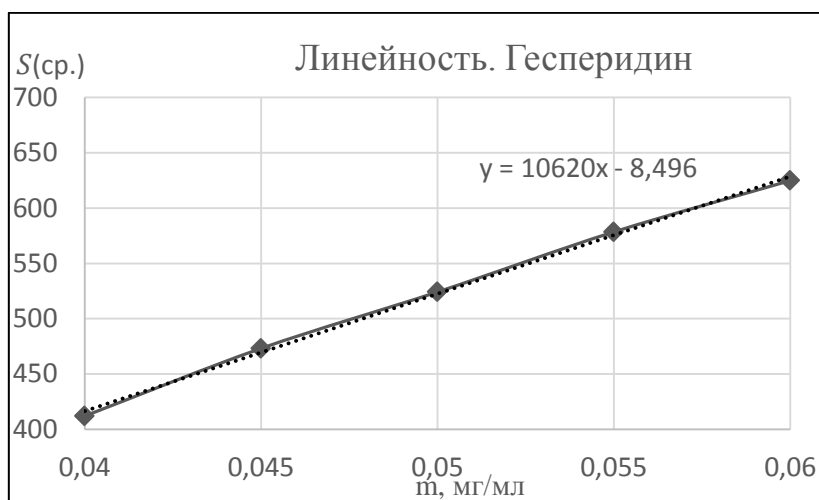


Рисунок 27 - График линейной зависимости среднего значения площади пика гесперидина от концентрации аналита в растворе

Результат: коэффициент корреляции для диосмина $r = 0,99885$ (для раствора 1 СО), диосмина $r=0,99785$ (для раствора 2 СО) для гесперидина $r=0,99897$.

Заключение: линейность методики доказана.

Прецизионность.

Повторяемость: для оценки повторяемости рассчитать относительное стандартное отклонение (RSD) результатов, полученных для шести определений модельной смеси с уровнем концентрации 100 % (таблица 9).

Результат: относительное стандартное отклонение (RSD) для шести определений модельной смеси с уровнем концентрации 100 %, менее 2,0 % (таблица 9).

Заключение: повторяемость методики доказана.

Промежуточная прецизионность.

Приготовить модельные смеси, содержащие 100 % микронизированной очищенной флавоноидной фракции, отобрать пробы и проанализировать их в полном соответствии с валидируемой методикой, включая пробоподготовку. Провести не менее шести анализов па двух различных приборах, двумя аналитиками в разное время. Рассчитать относительное стандартное отклонение (RSD), среднее значение и, если необходимо, критерий Стьюдента и критерий Фишера F.

Таблица 27 - Относительное стандартное отклонение и среднее значение

Промежуточная прецизионность. Выборка 1.			
100 % $a_{0(\text{диосмина})} = 18,4$ мг, $a_{0(\text{гесперидина})} = 10,0$ мг $a_1 = 132$ мг			
$\mu=100,0$	$S_{0(1 \text{ СО диосмина})} / S_{0(\text{гесперидина})} / S_{0(2 \text{ СО диосмина})}$	$S_1(\text{сумма всех флавоноидов})$	X
100,0	9042,31/526,19/105,84	10475,01	99,02
100,0	9042,31/526,19/105,84	10516,01	99,41
100,0	9042,31/526,19/105,84	10534,14	99,56
100,0	9042,31/526,19/105,84	10613,02	100,32
100,0	9042,31/526,19/105,84	10624,57	100,43

Продолжение таблицы 27

100,0	9042,31/526,19/105,84	10544,15	99,66
Промежуточная прецизионность. Выборка 2.			
$100\% a_0(\text{диосмина}) = 18,4 \text{ мг}, a_0(\text{гесперидина}) = 10,0 \text{ мг } a_1 = 132 \text{ мг}$			
$\mu=100,0$	$S_{0(1 \text{ СОдиосмина})} / S_{0(\text{гесперидина})} / S_{0(2 \text{ СОдиосмина})}$	$S_{1(\text{сумма всех флавоноидов})}$	X
100,0	9047,32/526,39/105,06	10477,18	99,07
100,0	9047,32/526,39/105,06	10586,84	100,13
100,0	9047,32/526,39/105,06	10547,66	99,74
100,0	9047,32/526,39/105,06	10616,11	100,19
100,0	9047,32/526,39/105,06	10507,79	99,15
100,0	9047,32/526,39/105,06	10415,38	98,26
ср. знач. (\bar{x}_2)		10525.1600	99,42
стан. отк. (S)		73,81	0,740
отн. стан. откл.(RSD)		0,70	0,745

Так как $\bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$, то необходимо рассчитать критерии Стьюдента-t и критерий Фишера-F.

Таблица 28 - Критерий Фишера

Критерии F		
Выборка 1	Выборка 2	
10475,01	10477,18	
10516,01	10586,84	
10534,14	10547,66	
10613,02	10616,11	
10624,57	10507,79	
10544,15	10415,38	
	$F(P, f_1, f_2) =$	10,97
	$s_1^2 =$	3317,770520
	$s_2^2 =$	5447,604120
	F =	1,64

Таблица 29 - Критерий Стьюдента

Критерий Стьюдента		
Выборка 1	Выборка 2	
99,02	99,07	
99,41	100,13	
99,56	99,74	
100,32	100,19	
100,43	99,15	
99,66	98,26	
	$t(P, f_1, f_2) =$	2,57
	$t =$	0,83

Результат: относительное стандартное отклонение менее 2,0 %.

$$F \leq F(P, f_1, f_2), t < t(P, f_1, f_2)$$

Заключение: Промежуточная прецизионность методики доказана.

Правильность.

Приготовить модельные смеси, содержащие плацебо и микронизированную очищенную флавоноидную фракцию пяти уровней концентрации (80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %), отобрать пробы и проанализировать их в полном соответствии с валидируемой методикой, включая пробоподготовку. Для каждого уровня концентрации провести не менее трех анализов. Рассчитать относительное стандартное отклонение (RSD), обнаруживаемость и доверительный интервал.

Таблица 30. Относительное стандартное отклонение, обнаруживаемость и доверительный интервал при 80 % $a_{0(диосмина)}$

Правильность и повторяемость						
80 % $a_{0(диосмина)}$ = 18,4 мг, $a_{0(гесперицина)}$ = 10,0 мг a_1 = 132 мг						
$\mu=80,0$	$S_{0(1 \text{ диосмина})}$ $/S_{0(гесперицина)}$ $/S_{0(2 \text{ диосмина})}$	S_1 (сумма всех флавоноидов)	x	$z =$ $\bar{x} * 100 / \mu$	$S * 4,3 / 1$ $,73$	1,753
80,0	9058,46/523,16/10 5,26	8449,70	79,64	100,25		

Продолжение таблицы 30

80,0	9058,46/523,16/10 5,26	8483,34	79,96		
80,0	9058,46/523,16/10 5,26	8590,36	80,99		
ср. знач. \bar{x}		8507,80	80,20	$\bar{x} \pm \Delta x =$	80,20 \pm 1,753
стан. откл. (S)		73,45	0,71		
отн. стан. откл.(RSD)		0,86	0,88		

Таблица 31 - Относительное стандартное отклонение, открываемость и доверительный интервал при 90 % a_0 (диосмина)

90 % a_0 (диосмина) = 18,4 мг, a_0 (гесперицина) = 10,0 мг $a_1 = 132$ мг						
$\mu=90,0$	$S_{0(1 \text{ CO диосмина})} / S_{0(\text{гесперицина})} / S_{0(2 \text{ CO диосмина})}$	S_1 (сумма всех флавоноидов)	X	$z = \bar{x} \cdot 100 / \mu$	S·4,3/ 1,73	1,45 8
90,0	9023,05/527,89/106,38	9449,23	89,31	99,78		
90,0	9023,05/527,89/106,38	9567,60	90,45			
90,0	9023,05/527,89/106,38	9482,69	89,64			
ср. знач. \bar{x}		9499,84	89,80		$\bar{x} \pm \Delta x =$	89,80
стан. отк. (S)		61,02	0,587			
отн. стан. откл.(RSD)		0.64	0,65			

Таблица 32 - Относительное стандартное отклонение, открываемость и доверительный интервал при 100 % a_0 (диосмина)

100 % a_0 (диосмина) = 18,4 мг, a_0 (гесперицина) = 10,0 мг $a_1 = 132$ мг						
$\mu=100,0$	$S_{0(1 \text{ CO диосмина})} / S_{0(\text{гесперицина})} / S_{0(2 \text{ CO диосмина})}$	S_1 (сумма всех флавоноидов)	X	$z = \bar{x} \cdot 100 / \mu$	S·2,57/ /2,45	0,57 0
100,0	9042,31/526,19/105,84	10475,01	99,02	99,73		
100,0	9042,31/526,19/105,84	10516,01	99,41			
100,0	9042,31/526,19/105,84	10534,14	99,56			
100,0	9042,31/526,19/105,84	10613,02	100,32			
ср. знач. \bar{x}		10516,01	99,41		$\bar{x} \pm \Delta x =$	105,16
стан. отк. (S)		61,02	0,587			
отн. стан. откл.(RSD)		0.64	0,65			

Продолжение таблицы 32

100,0	9042,31/526,19/105,84	10624,57	100,43		
100,0	9042,31/526,19/105,84	10544,15	99,66		
ср. знач. \bar{x}		10551,15	99,73	$\bar{x} \pm \Delta x =$	99,73 ± 0,570
стан. отк. (S)		57,60	0,54		
отн. стан. откл.(RSD)		0,55	0,55		

Таблица 33 - Относительное стандартное отклонение, открываемость и доверительный интервал при 110 % a_0 (диосмина)

110 % a_0 (диосмина) = 18,4 мг, a_0 (гесперицина) = 10,0 мг $a_1 = 132$ мг						
$\mu=11$ 0,0	$S_{0(1 \text{ COдиосмина})}$ / $S_{0(гесперицина)}$ / $S_{0(2 \text{ COдиосмина})}$	S_1 (сумма всех флавоноидов)	X	$Z=$ $\bar{x} \cdot 100 / \mu$	S·4,3/ 1,73	1,45 9
110,0	9051,49/521,65/103,69	11578,92	109,25	99,88		
110,0	9051,49/521,65/103,69	11700,93	110,42			
110,0	9051,49/521,65/103,69	1 1649,19	109,92			
ср. знач. \bar{x}		11643,01	109,8 6	$\bar{x} \pm \Delta x =$	109,86 ± 1,459	
стан. отк. (S)		61,24	0,587			
отн. стан. откл.(RSD)		0,53	0,53			

Таблица 34 - Относительное стандартное отклонение, открываемость и доверительный интервал при 120 % a_0 (диосмина)

120 % a_0 (диосмина) = 18,4 мг, a_0 (гесперицина) = 10,0 мг $a_1 = 132$ мг						
$\mu=12$ 0,0	$S_{0(1 \text{ COдиосмина})}$ / $S_{0(гесперицина)}$ / $S_{0(2 \text{ COдиосмина})}$	S_1 (сумма всех флавоноидов)	X	$Z=$ $\bar{x} \cdot 100 / \mu$	S·4,3/ 1,73	0,88 3
120,0	9071,91/527,57/104,12	12739,93	119,84	100,17		
120,0	9071,91/527,57/104,12	12814,17	120,55			
120,0	9071,91/527,57/104,12	12779,88	120,22			
ср. знач. \bar{x}		12777,99	120,20	$\bar{x} \pm \Delta x =$	120,20 ± 0,883	
стан. отк. (S)		37,16	0,355			
отн. стан. откл.(RSD)		0,29	0,30			

Результат: открываемость среднего значения находится в интервале 97,5 % - 102,5 %, доверительный интервал включает 100 % значение. Соответствует критерию приемлемости.

Заключение: правильность методики доказана.

Диапазон применения: методика должна быть применима в пределах от 80 % до 120 % от номинального значения и должна обеспечивать требуемую линейность, правильность и прецизионность.

Заключение: все результаты в диапазоне от 80 % до 120 % удовлетворяют критериям приемлемости, аналитическая область методики количественного определения флавоноидов составляет 80 % - 120 %.

Глава 4 Расчет эффективности производства лекарственного препарата «Венарус, 900+100 мг» после валидации аналитической методики

4.1 Штатная сетка предприятия

Ниже представлена заработная плата сотрудника в зависимости от занимаемой им должности, и какая часть идет на отчисление налогов предприятием в ПФР, ФСС и ФОМС.

Заработная плата каждого сотрудника в полном размере и суммарные расходы компании на ее выплату представлены в таблице 35.

Таблица 35 - Заработная плата сотрудников

Должность	Кол-во сотрудников	Заработная плата (руб.)	Сумма, (руб.)
Генеральный директор	1	373563,22	373563,22
Директор производства	1	180000,00	180000,00
Технолог	2	80000,00	160000,00
Начальник производства	1	120000,00	120000,00
Мастер участка	1	65000,00	65000,00
Аппаратчик	3	50000,00	150000,00
Вспомогательный персонал производства	5	35000,00	175000,00
Оператор производства	3	40000,00	120000,00
Уполномоченное лицо	1	250000,00	250000,00
Аудитор компании	1	80000,00	80000,00
Начальник департамента качества	1	225000,00	225000,00
Руководитель ООК	1	140000,00	140000,00
Сотрудник ООК	1	75000,00	75000,00
Руководитель ОКК	1	180000,00	180000,00
Инженер-химик	5	56000,00	280000,00
Лаборант химической лаборатории	2	48000,00	96000,00
Микробиолог	3	56000,00	168000,00
Лаборант микробиологической лаборатории	1	48000,00	48000,00
Контролер	2	43000,00	86000,00

Продолжение таблицы 35

Главный инженер	1	100000,00	100000,00
Сотрудник отдела охраны труда	1	62000,00	62000,00
Главный механик	1	80000,00	80000,00
Механик	3	60000,00	180000,00
Главный энергетик	1	80000,00	80000,00
Руководитель отдела автоматизации и КИП	1	80000,00	80000,00
Сотрудник отдела автоматизации и КИП	3	58000,00	174000,00
Руководитель отдела экологической безопасности	1	75000,00	75000,00
Эколог	1	50000,00	50000,00
Сетевой администратор	1	60000,00	60000,00
Программист	1	60000,00	60000,00
Финансовый директор	1	250000,00	250000,00
Главный бухгалтер	1	120000,00	120000,00
Сотрудник финансово-аналитического отдела	1	75000,00	75000,00
Сотрудник отдела нормирования труда и заработной платы	1	75000,00	75000,00
Сотрудник планово-экономического отдела	1	75000,00	75000,00
Директор по персоналу	1	110000,00	110000,00
Сотрудник отдела кадров	2	55000,00	110000,00
Директор по логистике	1	190000,00	190000,00
Сотрудник транспортного отдела	2	70000,00	140000,00
Начальник склада	1	65000,00	65000,00
Сотрудник склада	4	50000,00	200000,00
Руководитель отдела закупок	1	80000,00	80000,00
Снабженец	1	45000,00	45000,00
Коммерческий директор	1	180000,00	180000,00
Сотрудник, отвечающий за сбыт	1	75000,00	75000,00
Маркетолог	1	75000,00	75000,00
Сотрудник отдела продвижения и рекламы	8	65000,00	520000,00
Сотрудник отдела по связям с общественностью	6	65000,00	390000,00
Главный юрист	2	75000,00	150000,00
	88	ИТОГО	6897563,22

В результате данного анализа видно, что на выплату заработной платы сотрудникам компании необходимо 6897563 руб. 22 коп. и, кроме того в таблице 36 проанализированы затраты предприятия на выплату налогов в ПФР в размере 22 %, ФСС – 2,9 %, ФОМС – 5,1 %, на травматизм – 4 %.

Таблица 36 - Отчисление налогов в ПФР, ФСС и ФОМС фармацевтическим предприятием

Сумма заработной платы всех сотрудников предприятия	6897563,22
На обязательное пенсионное страхование	1517463,91
На обязательное социальное страхование	351775,72
На обязательное медицинское страхование	200029,33
На травматизм	275902,53
Сумма налогов	2345171,49

Итого на отчисление налогов в ПФР, ФСС и ФОМС предприятию, в котором работают 88 сотрудников, необходимо 2345171,49 руб.

4.2 Стоимость производственных процессов, коммунальных и прочих услуг

С учетом того, что фармацевтическое предприятие расположено в рабочем поселке Оболенск Серпуховского района Московской области стоимость коммунальных и прочих услуг составит 7 377 248 руб. (Таблица 37)

Таблица 37 - Затраты фармацевтического предприятия на оплату коммунальных и прочих услуг

Наименование	Стоимость	Единицы измерения	Затраты в месяц (ед.)	Стоимость в месяц (руб.)
Водоснабжение	35,25	м ³	5 000	176 250
Канализация	25,75	м ³	5 000	128 750
Отопление	2535,11	Гкал	1 000	2 535 110

Продолжение таблицы 37

Вывоз бытового мусора	866,1	м ³	50	43 305
Вывоз спец. мусора	1500	м ³	10	15 000
Электроэнергия	4,01	кВт·ч	1 000 000	4 010 000
Канцелярские расходы	100	шт	1 000	100 000
Телефония	2,5	мин	1 200	3 000
Интернет	10	Гб	2 000	20 000
Налог на собственность	4 000 000	руб.	333 333	333 333
Налог на землю	150 000	руб.	12 500	12 500
Итого				7 377 248

Известно, что 1 упаковка таблеток при розничной продаже стоит 1 090 руб. за упаковку 30 шт., 1 260 руб. за упаковку 45 шт. и 1 710 руб. за упаковку 60 шт. 1 серия составляет 314, 265 кг препарата, средняя масса одной таблетки 0,0013 кг. Таким образом, для производства 241 743 таблеток необходимо потратить на их производство 56473939 руб. 20 коп. (таблицы 38 - 40).

Таблица 38 - Стоимость упаковочных материалов

Упаковочные материалы	
Наименование	Цена
Пленка ПВХ 1,4 м·250 м	13 300
Фольга алюминиевая 1 кг	1 800
Пачка из картона 5000 шт	40 000
Инструкция по медицинскому применению 5000 шт	7 020
Пленка ПВД 1,5 м·100 м	3 700
Короб из гофрокартона/прокладка	11 303
Итого	77 123

Таблица 39 - Стоимость сырья

Состав одной таблетки					
Наименования веществ	Функция компонента	Масса, кг	Масса на 1 серию, кг	Цена за кг, руб.	Итого
Действующие вещества:					
гесперидин	фармацевтическая субстанция	0,0001	24,18	3600,00	87048,0
диосмин	фармацевтическая субстанция	0,0009	217,57	4155,00	904003,35
вспомогательные вещества:					
целлюлоза микрокристаллическая	наполнитель	0,000124	29,98	613,29	18386,43
натрия крахмала гликолят	разрыхлитель	0,000054	13,06	293,09	3827,76
желатин	связующее	0,000062	14,99	718,00	10762,8
тальк	лубрикант	0,000012	2,91	30,24	88,00
магния стеарат	лубрикант	0,000008	1,94	420,00	814,80
Вспомогательные вещества для оболочки:					
гипромеллоза	Пленко-образователь	0,0000414	10,01	219,00	2192,2
макрогол 6000	пластификатор	0,00000676	1,64	178,00	291,92
натрия лаурилсульфат	пенообразователь	0,0000002	0,05	135,00	6,75
магния стеарат	лубрикант	0,00000248	0,60	420,00	252,0
титана диоксид	пигмент	0,00000788	1,91	550,00	1050,5
железа оксид красный	краситель	0,0000006	0,15	149,00	22,35
железа оксид желтый	краситель	0,00000068	0,17	149,00	25,33
Итого					1028772,2

Таблица 40 - Стоимость производственного и валидационного оборудования

Наименование	Стоимость
Вибросито XZS - 500	900000
Мельница тонкого помола FGJ - 300	2000000
Смеситель гранулятор HLSG - 220	1500000
Смеситель гранулятор HLSG - 110	1400000
Смеситель гранулятор HLSG - 20 (SHK - 20)	1400000
Машина помола и гранулирования FZB - 300	2000000
Сушилка-гранулятор FL - 60	2000000
Сушилка-гранулятор INNOJET	6400000
Смеситель трехнаправленного действия HD - 400	400000
Смеситель трехнаправленного действия HDA - 400	400000
Смеситель трехнаправленного действия Турбомикс ТМ - 30	385500
Роторный таблетпресс LEGACY 6100	1200000
Роторный таблетпресс RONCHI GA 36	3000000
Обеспыливатель KSTD - 10	1000000
Обеспыливатель таблеток C&C200F	300000
Полировщик капсул C&C100A	400000
Металлодетектор THS/PH21	700000
Машина для тонкослойного покрытия BGB - 150	800000
Установка для нанесения покрытия LABCOAT IIХ	1500000
Установка псевдооживленного слоя WSG PRO 15	2000000
Станция для взвешивания бинов PBC 6P	500000
Смеситель для бинов MG5 - 6 BC	700000
Таблеточный пресс KORCH XL 200	7500000
Конический калибратор MC150 с пневматическим транспортером SF/30/20/15 и подвижной опорной конструкции GMS	1500000
Машина для обеспыливания таблеток HS - CD05	800000
Упаковочная машина DPP - 170A	700000
Машина для изготовления блистеров В 1330	500000
Картонно-упаковочная машина С 2155	600000
Инспекционная система BLIS - i	900000
Картонажная машина ВІРАК	1000000
Картонажная машина САМ AV	1500000
Весы лабораторные электронные GR - 120	174900
Хроматограф жидкостной Knauer Smartline 2500 UVD 100684/101350	3000000
Хроматограф жидкостной Agilent Technologies 1290 Infinity II LC с VWD	5000000
Хроматографическая колонка из нержавеющей стали размером 150 x 4,6 мм YMC - Pack ODS - A с размером частиц 5 мкм	85915
Перемешивающее устройство «Экрос» 6500	4500

Продолжение таблицы 40

Вода очищенная деионизированная, Millipore (система очистки воды)	970000
Уксусная кислота ледяная, for analysis	340
Ацетонитрил, HPLC - S	8200
Метанол, HPLC - S	4000
Диметилсульфоксид, HPLC - S	3800
Стандартный образец микронизированной очищенной флавоноидной фракции (стандарт фирмы «Интеркуим С.А., Испания»)	21000
Стандартный образец диосмин (USP RS)	144219
Стандартный образец гесперидин (EP CRS)	13410
Стандартный образец диосмина для проверки пригодности хроматографической системы (diosmin for system suitability; EP CRS)	14000
Мерные колбы на 100 мл 2-го класса точности (10 шт)	7000
Мерные колбы на 20 мл 2-го класса точности (10 шт)	6000
Мерные колбы на 10 мл 2-го класса точности (10 шт)	4500
Мерные цилиндры на 1000 мл (3 шт)	4200
Мерные цилиндры на 100 мл (5 шт)	3800
Бутыль из темного стекла (10 шт)	12500
Фильтр «синяя лента» (1 уп/100 шт)	260
ИТОГО:	55368044

Доходность предприятия при продаже 241743 таблеток лекарственного препарата «Венарус, 900+100 мг» составила 8 783 329 руб.

4.3 Итоги и выводы

В ходе работы был проведен анализ затрат фармацевтического предприятия, расположенного в рабочем поселке Оболенск Серпуховского района Московской области.

Таблица 41 – Анализ затрат фармацевтического предприятия, на котором работает 88 сотрудников и производительность 241743 таблеток лекарственного препарата «Венарус 900+100мг» в месяц

Наименование расходов	Сумма (руб.)
Заработная плата сотрудников	6897563
На обязательное пенсионное страхование	1517464
На обязательное социальное страхование	200029
На обязательное медицинское страхование	351776
На травматизм	275903
На коммунальные и прочие платежи	7377248
Стоимость сырья	1028772
Стоимость упаковки	77123
Стоимость оборудования и расходных материалов	55368044
Доходность предприятия при продаже 241 743 таблеток	8783329
Прибыль предприятия	-64310593
Налог на прибыль	8681930
Прибыль предприятия	-72992523

Прибыль предприятия за месяц составила минус 72992523 руб., следовательно, за год при производственном обороте, указанном в таблице 42, прибыль фармацевтической компании из 88 сотрудников составит 43210124,29 руб.

Таблица 42 – Прибыль фармацевтического предприятия при производстве препарата «Венарус 900+100мг»

Месяц	Прибыль предприятия	Производительность
январь	-72992523,33	1 серия/месяц с учетом очередного приобретения оборудования, расходных материалов и реактивов, необходимых для валидации методики и запуска производства
февраль	5546655,38	3 серии/месяц
март	5546655,38	3 серии/месяц
апрель	2486556,12	3 серии/месяц с учетом очередного приобретения расходных материалов и реактивов
май	5546655,38	3 серии/месяц
июнь	5546655,38	3 серии/месяц
июль	2486556,12	5 серий/месяц с учетом очередного приобретения расходных материалов и реактивов
август	18828615,86	5 серий/месяц
сентябрь	18828615,86	5 серий/месяц
октябрь	13728450,43	5 серий/месяц с учетом очередного приобретения расходных материалов и реактивов
ноябрь	18828615,86	5 серий/месяц
декабрь	18828615,86	5 серий/месяц
год	43210124,29	

Заключение

Все результаты, полученные во время валидации методик определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания флавоноидов в лекарственном препарате Венарус® 1000 таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 1000 мг удовлетворяют критериям приемлемости.

Для методики подтверждения подлинности была доказана специфичность.

Для методики определения родственных примесей было доказано, что специфичность, линейность, прецизионность, правильность и диапазон применения удовлетворяют критериям приемлемости. Был определен предел количественного определения для диосмина.

Для методики количественного определения доказано, что специфичность, линейность, прецизионность (повторяемость и промежуточная прецизионность), правильность и диапазон применения удовлетворяют критериям приемлемости. Таким образом, методики определения подлинности, родственных примесей и количественного содержания флавоноидов в лекарственном препарате Венарус® 1000 таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 1 000мг дают достоверные и воспроизводимые результаты.

Также, в ходе работы был проведен анализ затрат фармацевтического предприятия, расположенного в рабочем поселке Оболенск Серпуховского района Московской области. Прибыль предприятия за месяц составила минус 72992523рублей, следовательно, за год при производственном обороте прибыль фармацевтической компании из 88 сотрудников составит 43 210 124,29руб. Все представленные материалы в данной работе являются собственностью Акционерного общества «Алиум». Использование, распространение и публикация представленных материалов другими лицами строго запрещено.

Список используемой литературы и используемых источников

1. «Метабокард для гесперидина (HMDB03265)». База Данных Метаболома Человека, Инновационный Центр Метаболомики, Genome Canada. 11.02.2016.г. Извлечено 30.10.2020.г.
2. Diosmin (англ.)//Wikipedia.-2017-07-21.
3. Lebreton, M(1828). «Sur la matiere cristalline des orangettes, et analyse de ces fruits non encore developpes, famille des Hesperidees». Journal de Pharmacie et de Sciences Accessories.14:377.
4. Leelavinothan Pari, Subramani Srinivasan, Antihyperglycemic effect of diosmin on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats, Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 64, Issue 7, September 2010, Pages 477—481.
5. Pla-Pagà, L. (2019). «Влияние потребления гесперидина на биомаркеры сердечно-сосудистого риска: систематический обзор исследований на животных и рандомизированных клинических испытаний на людях». Обзоры Питания.77(12): 845–864. doi:10.1093/nutrit/nuz036.
6. Sanjay L.Dholakiya, Kenza E. Benzeroual, Protective effect of Diosmin on LPS-induced apoptosis in PC12 cells and inhibition of TNF- [alpha] expression, Toxicology in Vitro, In Press, Accepted Manuscript, Available online 6 April 2011.
7. Ангиопротекторы: диосмин, диосмин+гесперидин. Сравнительная характеристика лекарственных препаратов. Иванова Е.В., Черешнева Н.Д., Марийский государственный университет. Современные проблемы медицины и естественных наук. сборник статей международной научной конференции. 2019 г. стр. 94-97.
8. Арзамасцев А.П.- Фармацевтическая химия М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004.- 640 с.
Береговых В.В. 2010.

9. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания
ОФС.1.1.0004.15 Отбор проб.

10. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания
ОФС.1.2.1.0013.15 Температурные пределы перегонки и точка кипения.

11. Драго Р. Физические методы в химии – М.: Мир, 1981.

12. Китайгородский А.И. Рентгеноструктурный анализ. - М., Л., ГИТТЛ,
1950, 651 с.

количественного химического анализа. Методы оценки. МИ 1317-2004.

13. Краснюк, И. И. Фармацевтическая технология. Промышленное
производство лекарственных средств. В двух томах. Том 1: учебник/И. И.
Краснюк, Н. Б. Демина, Е. О. Бахрушина, М. Н. Анурова; под ред. И. И.
Краснюка, Н. Б. Деминой. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. - 352 с. - ISBN
978-5-9704-5535-7.

14. Логинова Н. В., Полозов Г. И. Введение в фармацевтическую химию:
Учебное пособие – Мн.: БГУ, 2003 -250 с.

15. Мохаммади, Мохаммад; Рамезани-Джолфаи, Нахид; Лорзаде, Эльназ;
Хошбахт, Ядолла; Салехи-Абаргуи, Амин

(10.01.2019.г.). Фитотерапевтические Исследования. 33(3):534-
545.doi:10.1002/ ptr.6264.ISSN 0951-418X. PMID 30632207.S2CID 58564512.

16. Нормавен - официальный сайт серии венотонизирующих средств для
ухода за ногами. Статья: хроническая венозная недостаточность (ХВН):
классификация и лечение. Осипова Е. Я. Режим доступа: <https://normaven.ru/>
Дата посещения: 08.01.2021 г. от17.07.2018г.№113. Руководство по
валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных
средств.

17. Производство таблеток Носовицкая С.А., Борзунов Е.Е., Сафиулин
Р.М. 1969 г.

18. Приказ Минздрава России от 15.12.2002 № 383 «Об утверждении Порядка отбора образцов лекарственных средств для проведения испытаний в целях сертификации».

19. Рекомендации по межгосударственной стандартизации

20. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 80 «Об утверждении Правил надлежащей дистрибьюторской практики в рамках Евразийского экономического союза».

21. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 17 июля 2018.N113. Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств.

22. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии

PMГ 61-2003 Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик.

23. Спектроскопические методы анализа в аналитической химии: практикум/Ю. В. Емельянова, М. В. Морозова, Е. С. Буянова; под общ. ред. Е. С. Буяновой; Министерство образования и науки Российской Федерации, Уральский федеральный университет.-Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2017-88 с.-ISBN 978-5-7996-2154-4.

24. Фармацевтический факультет, факультет физической химии Белградского университета, г. Белград, Сербия, 2014 г.

25. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения. Электронный ресурс: <https://roszdravnadzor.gov.ru/services/turnover> (Дата посещения: 15.10.2020 г.).

26. Федеральный закон от 12.04.2010 г. №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

27. Физико-химические методы анализа: Практическое руководство/ П. Н. Коваленко, К. Н. Багдасаров Ростовский ордена Трудового Красного Знамени государственный университет-2-е изд., исправленное и дополненное - Ростов н/Д : Издательство Ростовского университета, 1966.-386с.: ил.;22 см.

Приложение А
Аналитический протокол

Нормы: не менее 90,0 % и не более 102 % в пересчете на безводное и свободное от органических растворителей вещество.

Оборудование:

- хроматограф _____ № _____

- весы электронные _____ № _____

Реактивы:

Название	Качество	Производитель	Серия
Кислота уксусная ледяная			
Ацетонитрил			
Метанол			
Диметилсульфоксид			
Вода для ВЭЖХ			

Стандартные образцы:

Наименование СО	Тип СО	Регистрационный номер	Годен до: валиден/ не валиден	Чистота СО, %	Содержание влаги в СО, %
диосмин					

Условия для проведения хроматографии:

Колонка	Номер колонки

Объем инъекции 10 мкл

Скорость потока 1,0 мл/мин

Температура колонки 25 °С

Длина волны 275 нм

Продолжение приложения А

Время хроматографирования в 6,5 раз превышает время удерживания пика диосмина

Приготовление ПФ:

В стеклянном флаконе вместимостью _____ мл смешали ацетонитрил, уксусную кислоту ледяную, метанол и воду в соотношении (20:60:280:660).

Перед применением отфильтровали подвижную фазу.

Тип фильтра	Диаметр пор, мкм	Диаметр фильтра, мм	Серия

Дегазация мобильной фазы: ультразвук –

Использовали раствор, срок годности которого не превышает _____

Приготовление растворов для ВЭЖХ:

Испытуемый раствор

Взяли _____ мг (точная навеска) субстанции в мерную колбу вместимостью _____ мл прибавили 15 мл диметилсульфоксида, перемешали до полного растворения, довели объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешали. Приготовили два параллельных раствора.

Использовали свежеприготовленные растворы _____

Стандартный раствор

Взяли _____ мг (точная навеска) стандартного образца диосмина в мерную колбу вместимостью _____ мл, прибавили 7 мл диметилсульфоксида, перемешали до полного растворения, довели объем раствора диметилсульфоксидом до метки и перемешали. Приготовили два параллельных раствора.

Использовали свежеприготовленные растворы _____

Хроматографировали по 10 мкл стандартного раствора, получив не менее 5 хроматограмм.

Соответствие пригодности хроматографической системы:

Продолжение приложения А

Тест	Требование	Результат
Эффективность колонки	Не менее 1500 т.т.	
Фактор асимметрии	Не более 2	
Относительное стандартное отклонение, RSD % (n=5)	Не более 2,0 %	

Соответствует / не соответствует.

Хроматографировали последовательно по 10 мкл испытуемых растворов, по две инъекции каждого раствора. Количественное содержание диосмина в % в пересчете с абсолютно сухое вещество рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P \cdot 250}{S_0 \cdot m \cdot (100 - W)}$$

Полученные результаты:

$m_{01} =$	$S_{01} =$		$S_{0 \text{ средн}} =$	
$m_1 =$	$S_1 =$		$S_{1 \text{ средн}} =$	$x_1 =$
$m_2 =$	$S_2 =$		$S_{2 \text{ средн}} =$	$x_2 =$
$x_{\text{средн}} =$				

Расчет: $x_1 =$ ----- =

$x_2 =$ ----- =

Приложение 1: хроматографический отчет, количество страниц _____

Вывод: серия анализируемой субстанции соответствует требованиям

М-И0339/20

Испытание выполнил: _____ Проверил: _____

Подпись: _____ Подпись: _____

Дата: _____

Дата: _____