

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»
Институт химии и энергетики

(наименование института полностью)

Кафедра _____ Химическая технология и ресурсосбережение _____
(наименование)

18.04.01 Химическая технология

(код и наименование направления подготовки)

Химия и технология продуктов основного органического и нефтехимического синтеза

(направленность (профиль))

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ)

на тему Актуализация методики определения содержания родственных примесей в
препарате Бромгексин и модернизация технологического процесса его производства

Студент

Э. А. Стукалова

(И.О. Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

к.х.н., О. Б. Григорьева

(ученая степень, звание, И.О. Фамилия)

Тольятти 2020

Содержание

Введение.....	4
1. Литературный обзор.....	8
1.1 Активная фармацевтическая субстанция бромгексин и лекарственные препараты на его основе.....	8
1.1.1 Препарат бромгексин, области применения.....	8
1.1.2 Получение бромгексина.....	11
1.1.3 Получение бромгексина гидрохлорида.....	11
1.1.4 Получение лекарственного препарата Бромгексин раствор 4 мг/5 мл.....	16
1.4 Родственные примеси в фармацевтических субстанциях и в лекарственных препаратах.....	26
1.5 Ускоренное старение лекарственных препаратов.	
Определение срока годности	29
1.6 Хроматография.....	31
1.7 Валидация аналитических методик.....	35
1.7.1 Валидация методики определения посторонних примесей в лекарственных препаратах, в состав которых входят активные фармацевтические субстанции, полученные химическим путем.....	36
2. Экспериментальная часть.....	40
2.1 Объект исследования	40
2.2 Реагенты и оборудование.....	40
2.3 Оценка пригодности системы хроматографирования.....	41
2.4 Исходная методика определения родственных примесей препарата «Бромгексин раствор».....	44
2.5 Модифицированная методика родственных примесей препарата «Бромгексин раствор».....	44
2.5.1 Продукты деградации бромгексина.....	44

2.5.2 Продукты деградации метилпарагидроксибензоата.....	45
2.6 Проведение измерений и количественный расчет.....	45
3. Обсуждение результатов.....	47
3.1 Валидация методики определения родственных примесей «Продукты деградации бромгексина».....	47
3.2 Валидация методики определения родственных примесей «Продукты деградации метилпарагидроксибензоата».....	76
3.3 Определение срока годности препарата методом «ускоренного старения».....	88
Заключение.....	93
Список используемых источников.....	94
Приложение А Хроматограммы к валидации.....	99

Введение

Актуальность и научная значимость настоящего исследования:

Бромгексин гидрохлорид широко используется в качестве муколитического агента с середины прошлого века. Для него характерна и антибактериальная активность. Ряд фармацевтических производств ведут получение этого лекарственного препарата. Синтез действующего вещества бромгексина гидрохлорида многостадийный процесс, каждая из стадий получения описывается своей технологической схемой. При этом на всех стадиях технологического процесса необходимо осуществлять аналитический контроль, который должен быть организован в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к организации производства лекарственного средства и закрепленными в стандартах GMP. Поэтому модификация и модернизация методик аналитического контроля согласно современным требованиям, остается актуальной задачей.

На площадках фармацевтического предприятия «Озон» осуществляется производство препарата «Бромгексин раствор для приема внутрь 4 мг/5мл». Обнаружение при аналитическом контроле в готовой форме лекарственного средства неидентифицированной примеси привело к остановке процесса производства до прояснения ситуации. Перед аналитическими службами встала актуальная задача определения происхождения неидентифицированной примеси и разработки методов ее контроля с валидацией полученной методики. От решения этой задачи зависело возобновление процесса получения препарата Бромгексин.

Объект исследования: лекарственный препарат «Бромгексин раствор 4 мг/5мл».

Предмет исследования: метод определения продуктов деградации бромгексина и метилпарагидроксибензоата в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Цель исследования: разработка методики анализа родственных примесей лекарственного препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5мл» методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Гипотеза исследования состоит в том, что неидентифицированные примеси в лекарственном препарате «Бромгексин» являются либо компонентами распада действующего вещества, либо компонентами распада вспомогательных и консервирующих веществ. Необходимо выяснить источник происхождения примесей и модифицировать методику анализа препарата «Бромгексин».

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи:**

1. Подобрать методику для идентификации и определения родственных примесей;
2. Провести оценку пригодности хроматографической системы;
3. Провести исследование стабильности препарата;
4. Провести метрологическую оценку метода, валидацию разработанной методики определения.

Теоретическо-методологическую основу данного исследования составляют теоретическая база аналитической химии, хроматографии и метрологии и общенаучные методы, применяемые в работе, такие как обобщение, дедукция, индукция и эксперимент.

Методы исследования: в основе исследования лежат экспериментальные методы, а именно хроматографические и спектрофотометрические. Полученные данные обработаны методами математической статистики.

Научная новизна исследования: впервые разработана методика идентификации и определения родственных примесей лекарственного препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5 мл».

Практическая значимость: разработанная методика контроля качества лекарственного препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5 мл» прошла

метрологическую оценку, валидацию в лабораторных условиях, рекомендована для анализа лекарственных препаратов в состав которых входит бромгексин. Это также позволит возобновить производство препарата на площадке предприятия «Озон».

Достоверность и обоснованность результатов исследования обеспечена тщательностью проведения экспериментов и применением надежных хроматографических методов и современного хроматографического оборудования.

Личное участие автора в организации и проведении исследования состоит в поиске литературных источников и написании литературного обзора, выполнении экспериментальной части и обработке результатов эксперимента, формулировании выводов и написании пояснительной записки диссертации.

Апробация и внедрение результатов работы велись в течение всего исследования. Основные результаты магистерской диссертации докладывались следующих конференциях:

- XXIII Всероссийская конференция молодых ученых-химиков (с международным участием) (Нижний Новгород, 2020);
- XXXIV Международная научно-практическая конференция «Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования» (Москва, 2020).

Работа опубликована в виде тезисов доклада на конференции в Нижнем Новгороде и в виде статьи в сборнике статей по материалам конференции в Москве.

На защиту выносятся:

1. Результаты мероприятий по деградации компонентов препарата Бромгексин
2. Результаты ускоренного искусственного старения препарата Бромгексин
3. Модифицированная методика анализа родственных примесей

4. Валидация методики аналитического контроля препарата
Бромгексин

Структура магистерской диссертации: Диссертация состоит из введения, разделов, общих выводов, списка использованных источников и приложения. Работа изложена на 98 страницах, содержит 17 рисунков, 23 таблицы, библиографию из 44 наименований и 1 приложение.

1 Литературный обзор

1.1 Активная фармацевтическая субстанция бромгексин и лекарственные препараты на его основе

1.1.1 Препарат бромгексин, области применения

Согласно информации, приведенной в Регистре лекарственных средств России [1], бромгексин (латинское название вещества – Bromhexinum hydrochloride, химическое название – 2-амино-3,5-дибром-N-метилбензолметанамин гидрохлорид) (рисунок 1) имеет следующую формулу:

Брутто-формула: $C_{14}H_{20}Br_2N_2 \cdot HCl$

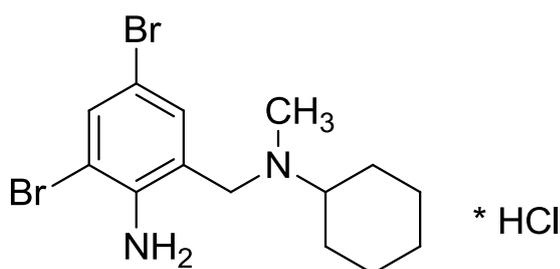


Рисунок 1 - Структурная формула

Фармакологическая группа – секретолитики и стимуляторы моторной функции дыхательных путей.

Бромгексин гидрохлорид представляет собой белый или почти белый кристаллический порошок, который очень мало растворим в воде, мало растворим в спирте 96 % и метиленхлориде.

На территории Российской Федерации действует фармакопейная статья Министерства здравоохранения Российской Федерации (РФ) ФС.2.1.0009.15 «Бромгексина гидрохлорид»:

Бромгексина гидрохлорид содержит не менее 98,5% и не более 101,5% бромгексина гидрохлорида $C_{14}H_{20}Br_2N_2 \cdot HCl$ в пересчете на сухое и свободное от остаточных органических растворителей вещество [2].

Бромгексина гидрохлорид относится к классу химических веществ, названных фенилметиламинами. Он содержит фенилметилэтиламинную часть, которая состоит из фенильной группы, замещенной метанамином.

Препараты бромгексина являются хорошо изученными и давно применяющимися в медицинской практике, в том числе на территории РФ. Так, препарат бромгексина в лекарственной форме раствор для приема внутрь разрешен к медицинскому применению на территории РФ более 20 лет.

С момента своего появления на рынке в 1963 году бромгексин, безрецептурный препарат, исследовался на предмет его активности на животных моделях и у людей с различными респираторными заболеваниями. Бромгексин является синтетическим производным алкалоида вазицина, производным растения *Adhatoda vasica*, используемого в некоторых странах для лечения различных респираторных заболеваний. Так, листья этого растения много лет использовались в Индии для лечения кашля и астмы (препарат был известен как Васака). Было установлено, что активными компонентами являются адхатодиновая кислота и алкалоидное соединение вазицин (пеганин), из которого и был впоследствии получен препарат бромгексин [3].

Обнаружено, что бромгексин усиливает секрецию различных компонентов слизи путем изменения физико-химических характеристик слизи за счет повышения лизосомальной активности. Эта повышенная лизосомальная активность усиливает гидролиз кислых мукополисахаридных полимеров, которые значительно способствуют нормальной вязкости слизи. Эти изменения, в свою очередь, увеличивают мукоцилиарный клиренс и уменьшают кашель.

Основные клинические исследования проводились в основном в эпоху, когда строгие методологические подходы и хорошие клинические практики еще не были разработаны. Клинические исследования проводились в основном у пациентов с хроническим бронхитом, а также с различными респираторными заболеваниями. Было обнаружено, что совместное введение антибиотиков с бромгексином усиливает действие антибиотика за счет увеличения проницаемости альвеолярно-капиллярного барьера. Помимо этого, со временем (в течение 2–3 дней приема препарата) бромгексин приводит к значительному увеличению концентраций иммуноглобулина и снижению концентраций альбумина и глобулина в дыхательных секретах. Было выдвинуто предположение, что из-за этих эффектов одновременное введение бромгексина и антимикробного средства облегчит лечение инфекционного трахеобронхита [4, 5].

Бромгексин относится к муколитическим средствам, а именно – мукорегуляторам [6]. Попадая в организм, бромгексин активно всасывается в кишечнике, откуда попадает в кровяное русло и затем проникает в стенку трахеи и бронхов. Бромгексин уменьшает продукцию секрета слизистой оболочкой бронхиального дерева, разжижает уже накопившийся секрет в просвете бронхов, способствует движению реснитчатого эпителия полости бронхов и сокращению гладких мышц в стенке бронха для лучшего выведения секрета. Доказано, что препарат в некоторой степени подавляет кашлевой рефлекс, тем самым способствуя уменьшению кашля. Бромгексин принимают при острых и хронических бронхолегочных заболеваниях, сопровождающихся образованием мокроты повышенной вязкости, таких как пневмония, бронхиальная астма, трахеобронхит, обструктивный бронхит, бронхоэктазию, эмфизема легких, муковисцидоз, туберкулез, пневмокониоз [7].

Также бромгексина гидрохлорид используется в качестве пестицида и ветеринарного препарата [8].

Контроль качества данного препарата очень важен, поэтому мы решили выбрать метод высокоэффективной хроматографии (ВЭЖХ), как более точный и селективный. Рассмотрим возможность появления в препарате технологических примесей.

1.1.2 Получение бромгексина

Получают бромгексин из α -бром-*o*-нитротолуола взаимодействием с циклогексилметиламином с последующим восстановлением нитрогруппы и бромированием в бензольный цикл (рисунок 2):

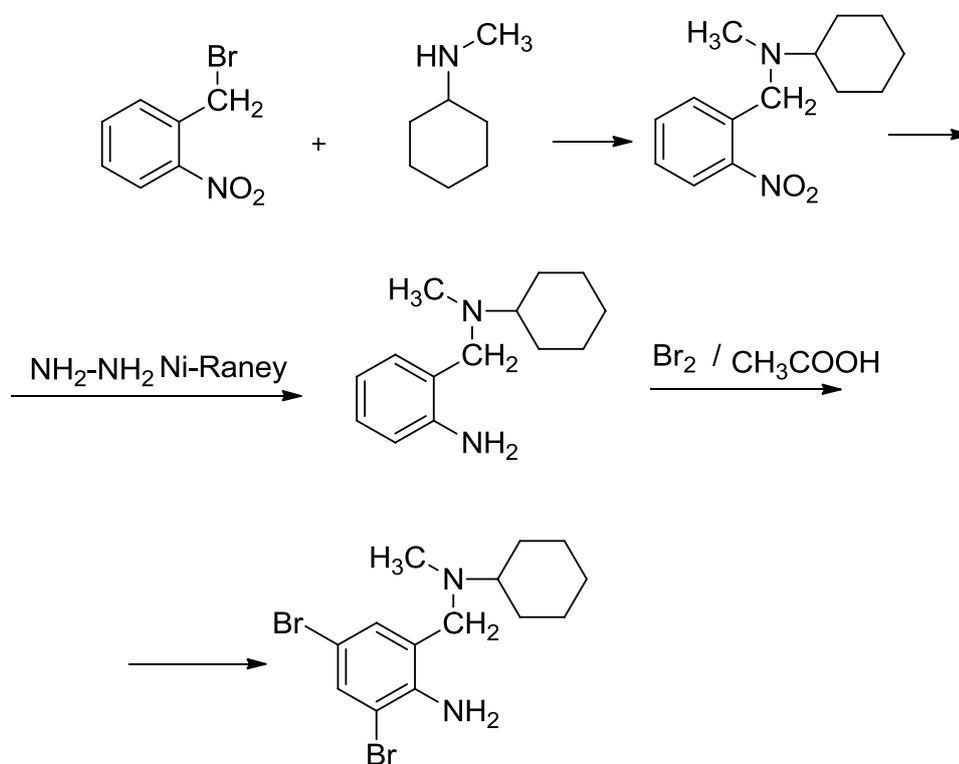


Рисунок 2 - Получение бромгексина

1.2.3 Получение бромгексина гидрохлорида

В данном разделе рассмотрим технологию получения активной фармацевтической субстанции бромгексина гидрохлорида.

Стадия 1. Орто-нитротолуол берут в монохлорбензоле и к нему добавляют 1,3-дибром-5,5-диметилгидантоин. К перемешиваемой взвеси добавляют азоизобутиронитрил. Массу нагревают до $75\text{ }^\circ\text{C}$ и выдерживают

в течение 8 часов. Реакционную массу обрабатывают водой, далее массу переносят в реактор при перемешивании, который содержит раствор бикарбоната натрия. После этого добавляют N-метилциклогексиламин и нагревают при перемешивании. По истечению 8 часов реакционную массу охлаждают до комнатной температуры и промывают водой. Органический слой нагревают до 40 °С, к нему добавляют соляную кислоту и доводят рН до значения 3. Массу выдерживают при 60-70 °С в течение одного часа, затем охлаждают до 10 °С и фильтруют (рисунки 3, 4).

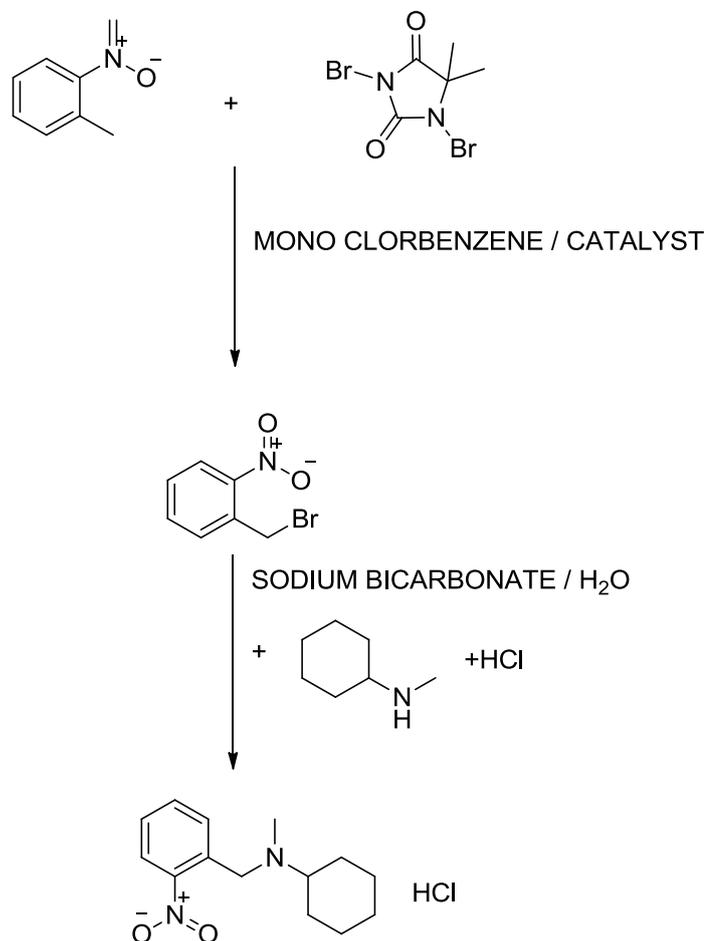


Рисунок 3 - Схема превращения первой стадии

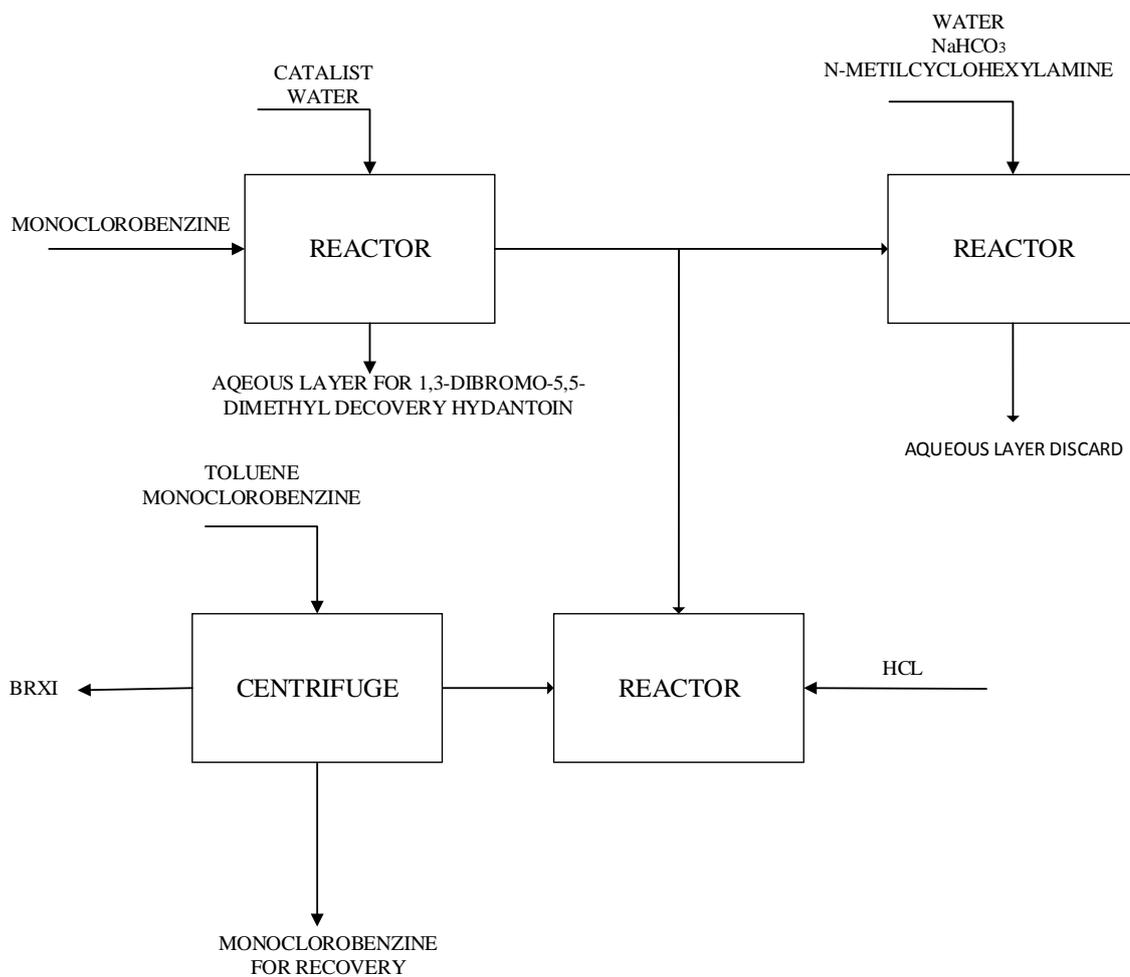


Рисунок 4 - Первая стадия технологии получения бромгексина гидрохлорида

Стадия 2. Отбирают мокрую массу со стадии 1, добавляют к ней толуол и раствор аммиака. Массу перемешивают и проверяют значение pH, которое должно быть щелочным. Перемешивание прекращают и водный слой отбрасывают. Толуол отгоняют, оставшуюся смесь охлаждают и добавляют к ней метанол. Раствор в метаноле добавляют в реактор, содержащий СНН 080 и катализатор в метаноле, при температуре кипения с обратным холодильником. Массу кипятят с обратным холодильником в течение 12 часов. Затем ее охлаждают до комнатной температуры и отфильтровывают катализатор. Маточный раствор отбирают для извлечения метанола, а полученное масло экстрагируют толуолом.

Органический раствор толуола отводится водой, а толуол отгоняется. Полученное масло взвешивают, помещают в раствор метанола и соляной кислоты, и к этому раствору добавляют жидкий бром с получением гидробромида бромгексина. Массу охлаждают до 10 °С, а затем фильтруют (рисунки 5,6).

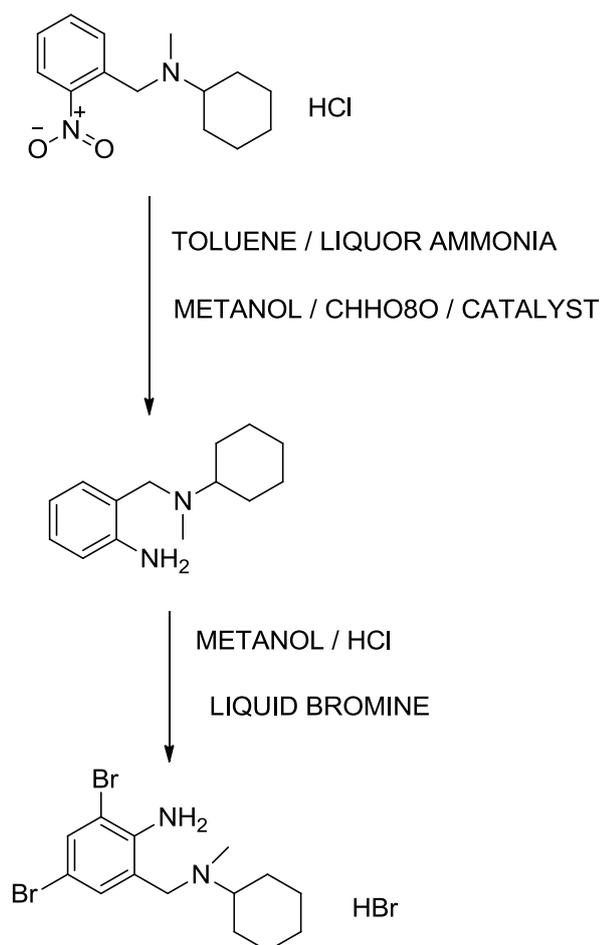


Рисунок 5 - Схема превращения второй стадии

Стадия 3. Гидробромид бромгексина в толуоле с раствором аммиака нагревают до 50 °С и подтверждают, что значение рН является щелочным, после чего водный раствор выбрасывают. Органический слой обрабатывают раствором гидросульфита натрия, а затем к нему добавляют древесный уголь и массу выдерживают при температуре 60 °С в течение одного часа. Древесный уголь отфильтровывают.

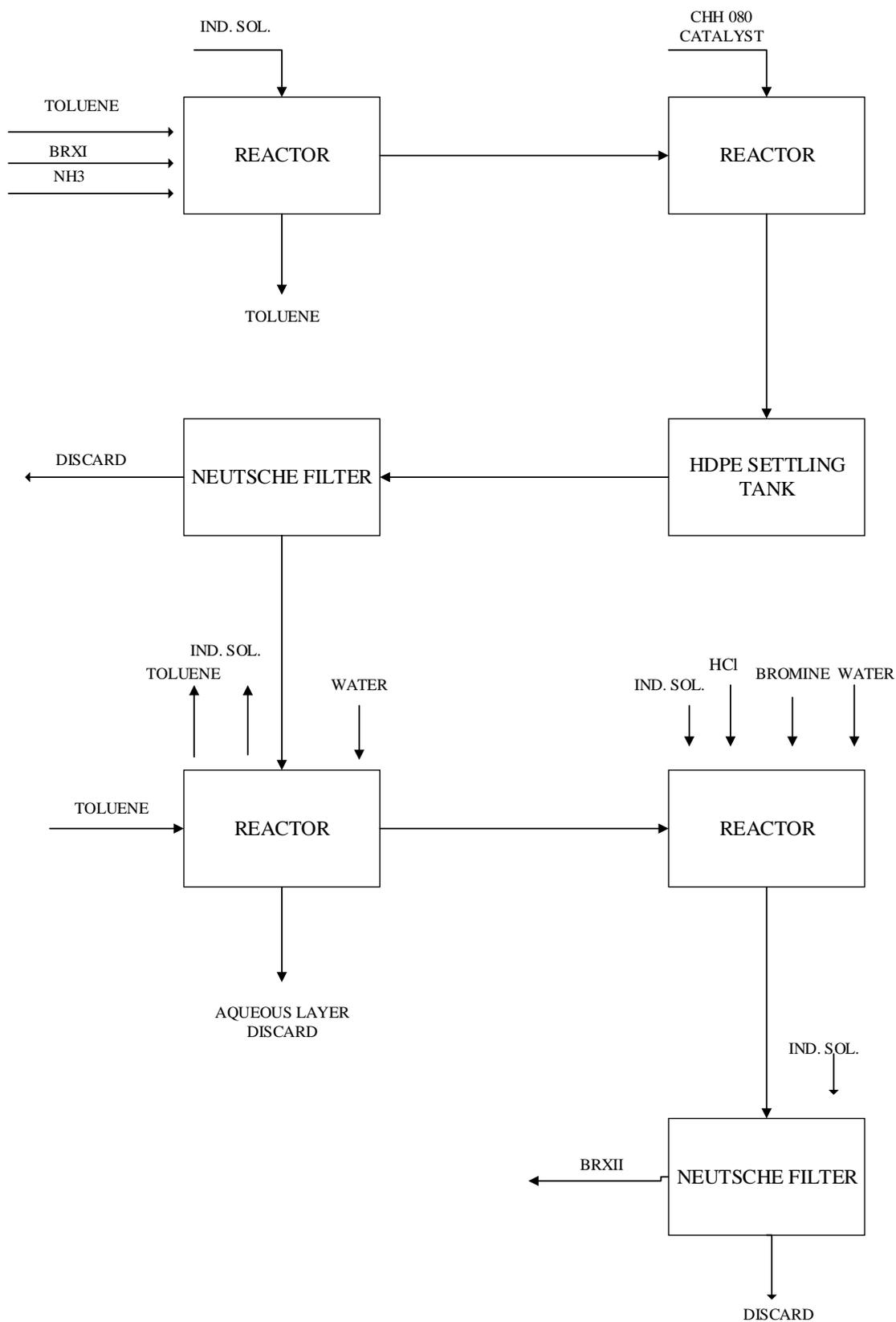


Рисунок 6 - Вторая стадия технологии получения бромгексина гидрохлорида

Толуольный слой снова обрабатывают один раз раствором гидросульфита натрия, а затем толуол отгоняют и к остаточному основанию добавляют промышленный спирт. Раствор нагревают, к нему добавляют соляную кислоту и значения pH реакционной массы составляет от 2 до 3. Массу перемешивают в течение одного часа, затем охлаждают до 10 °С и фильтруют. Отфильтрованную массу высушивают, получая бромгексин гидрохлорид (рисунки 7, 8) [9].

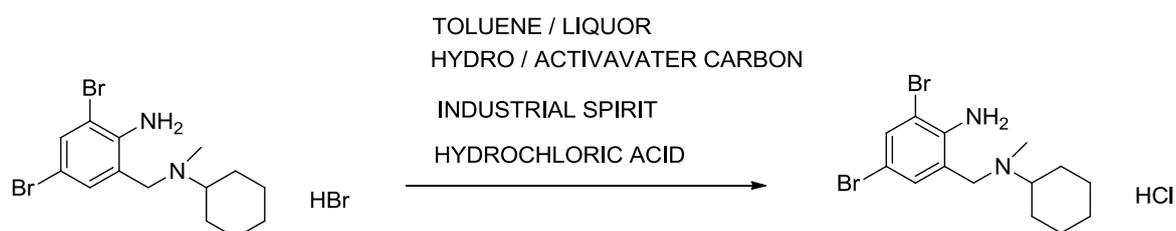


Рисунок 7 - Схема превращения третьей стадии

Данный метод описывает получение активной фармацевтической субстанции бромгексина гидрохлорида, из которой в дальнейшем получают лекарственный препарат «Бромгексин раствор 4 мг /5 мл».

1.1.2 Получение лекарственного препарата «Бромгексин раствор 4 мг /5 мл»

Согласно Промышленному регламенту на производство препарата «Бромгексин раствор для приема внутрь 4 мг/5мл» ПР 11025316-342-17 [10], раствор Бромгексина на 5 мл и в 1 флаконе объемом 60 мл имеет следующий состав (таблица 1).

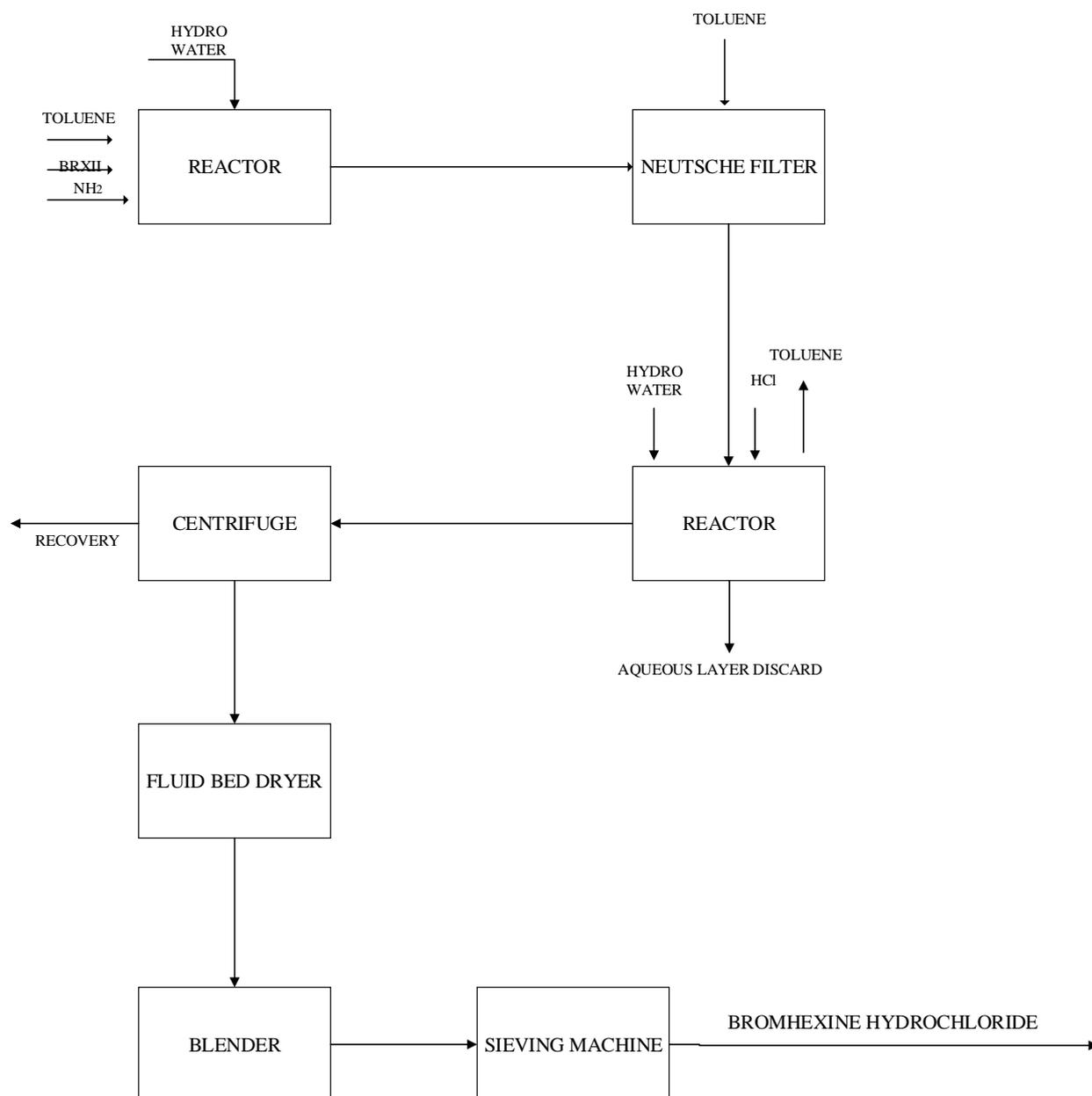


Рисунок 8 - Третья стадия технологии получения бромгексина гидрохлорида

Первой стадией технологического процесса, получения препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5 мл», является стадия развешивания сырья.

Процесс развешивание сырья осуществляют в помещении подготовки сырья.

Таблица 1 - Состав препарата Бромгексин раствор для приема внутрь 4 мг/5 мл

№ п/п	Наименование компонентов	В мг на 5 мл	В мл на флакон 60 мл
1	Бромгексина гидрохлорид	4,00	0,048
2	Этанол 95%	150,00	1,800
3	Левоментол	0,340	0,0041
4	Сорбитол некристаллизующийся 70%	2142,855	25,7143
5	Метилпарагидроксибензоат	8,200	0,0984
6	Хлористоводородная кислота	1,420	0,0046
7	Вода	3193,185	38,3307
	Итого	5500,00	66,000

В отдельные технологические емкости на весах отвешивают сырье, кг:

- Бромгексина гидрохлорид 0,509 г
- Левоментол 0,043 г
- Метилпарагидроксибензоат 1,043 г
- Этанол 95 % 19,091 г
- Хлористоводородная кислота 0,042 г
- Вода очищенная (в раствор) 0,132 г
- Вода очищенная 406,405 г

И на весах отвешивают сырье сразу в смеситель-гомогенизатор (СГГ) с тарного места, кг:

Сорбитол некристаллизующийся 70 % 272,727 г

Далее приступают к приготовлению спиртового раствора, его готовят в реакторе FUS-100. А именно:

В реактор загружают этанол 95 % в количестве 19,091 кг, левоментол в количестве 0,043 кг и метилпарагидроксибензоат в количестве 1,043 кг и закрывают крышку. Перемешивают содержимое реактора с частотой вращения мешалки 500 ед. до полного растворения компонентов. После

окончания процесса, останавливают перемешивание раствора, отключают электропитание реактора.

Визуально проверяют полноту растворения порошков, раствор должен быть прозрачным, в нем не должно наблюдаться нерастворимых частиц. Полученный раствор через нижний впускной клапан при помощи вакуума передают на следующую стадию в смеситель – гомогенизатор.

После окончания стадии проводится анализ потерь на соответствие регламентным значениям.

Второй стадией производства препарата является приготовление раствора.

Операцию приготовления раствора осуществляют в смесителе-гомогенизаторе MZUTL 1000C (СГГ) в помещении гомогенизации.

В смеситель-гомогенизатор через нижний боковой штуцер при помощи вакуума, загружают воду очищенную в количестве 406,405 кг, сбрасывают вакуум, открыв воздушный клапан на крышке реактора.

Затем в смеситель-гомогенизатор вручную, стараясь избежать пыления, загружают бромгексина гидрохлорид в количестве 0,509 кг и циркулируют содержимое по малому контуру со скоростью вращения мешалки 30 – 40 об/мин нагревая до температуры 55 - 60 °С. Визуально проверяют полноту растворения бромгексина г/х, раствор должен быть прозрачным, в нем не должно наблюдаться нерастворимых частиц.

После растворения бромгексина г/х через нижний боковой штуцер поддерживая вакуум загружают сорбитол некристаллизующийся в количестве 272,727 кг, при включенной мешалке со скоростью вращения 30 об/мин.

Далее в смеситель-гомогенизатор вручную через верх загружают хлористоводородную кислоту в количестве 0,181 кг. Включают охлаждение и охлаждают содержимое до температуры 20-25 °С, при включенной мешалке со скоростью вращения 20-30 об/мин. При достижении требуемой температуры с помощью вакуума -30-(-40) кПа

через нижний боковой штуцер из реактора FUS-10 загружают спиртовой раствор, сбрасывают вакуум, открыв воздушный клапан на крышке реактора и перемешивают содержимое 5-10 мин со скоростью вращения 20-30 об/мин.

Промежуточной стадией является подготовка готового полупродукта к фасовке:

Раствор сливают из смесителя-гомогенизатора через фильтр порционно в накопительную емкость ОП-10. Для этого к выгрузному патрубку гомогенизатора присоединяют гибкий шланг, другой конец шланга помещают в загрузочный люк накопительной емкости. На панели управления смесителя-гомогенизатора задают скорость гомогенизирующего устройства 1000 об/мин, скорость вращения мешалки 10 об/мин и начинают сливать раствор. В процессе передачи раствора из смесителя гомогенизатора в накопительную емкость следят за уровнем в накопителе.

Накопительную емкость с раствором передают на стадию фасовки.

Последней третей стадией является фасовка раствора во флаконы.

Фасовка раствора во флаконы производится на полуавтоматическом объемном дозаторе 2 x GV 100 (MP).

Подготовленные флаконы и средства укупорки из закрытых контейнеров выставляют на подготовленный стол для фасовки, предварительно обработанный спиртом 76 %. При помощи насосной установки по подсоединённым шлангам раствор Бромгексина подаётся из сборника-накопителя ОП-10 в промежуточную ёмкость дозатора. Подставляют на стол флаконы под наливные наконечники, рабочий цикл инициируется нажатием ножной педали. При заполнении, флаконы сразу же закрывают подготовленными крышками во избежание микробного загрязнения. Крышка после щелчка должна плотно прилегать к корпусу флакона. При перевертывании флакона вверх дном не должно быть утечек раствора через крышку.

Заполненные флаконы складывают в подготовленные пластиковые контейнера с крышкой, обработанные внутри спиртом 76 %, и промаркированные карточкой «Производство». Бракованные флаконы собирают в специальную емкость (ведро).

Раствор бромгексина гидрохлорида представляет собой жидкую лекарственную нестерильную форму. Это бесцветная, прозрачная или слабо опалесцирующая жидкость с характерным запахом.

При производстве данного препарата химические превращения отсутствуют, технологическая схема производства выглядит следующим образом (рисунки 9-11) (таблица 2).

На первом этапе технологического процесса все ингредиенты отвешивают (рисунок 9). На втором этапе (рисунок 10) происходит получение полуфабриката, который затем, на третьем этапе (рисунок 11), разливается по флаконам.

Таким образом, технологический процесс препарата раствора бромгексина включает ряд стадий, на которых последовательно осуществляется приемка и отгрузка сырья, подготовка воды очищенной, подготовка помещений и оборудования, непосредственно технологический процесс, после чего продукцию упаковывают в индивидуальную, потребительскую и групповую упаковки. При этом, на всех стадиях технологического процесса необходимо осуществлять аналитический контроль, который должен быть организован в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к организации производства лекарственного средства и закрепленными в стандартах GMP [10].

Таблица 2 - Расшифровка обозначений

Обозначение	Наименование
Весы	Весы платформенные ТВ-S-300.2; ТВ-S-32.2-A1; CAS SW-05
Оп-3	Емкость для отвешенной воды очищенной
Оп-5	Емкость для отвешенного бромгексина гидрохлорида
	Емкость для отвешенного левоментола
	Емкость для отвешенного метилпарагидроксибензоата
Оп-8	Ведро для отвешенного этанола 95 %
СС	Стакан лабораторный для разведения хлористоводородной кислоты
Р	Реактор FUS-100
СГГ	Смеситель – гомогенизатор MZUTL 1000 С
СГГ-1	Отгрузочный клапан для продукта или моющего состава
СГГ-2	Клапан соединения контура бай-пас и трубопровода СІР
СГГ-3	Клапан управления потока продукта или моющего состава
СГГ-4	Клапан выравнивания давления и подводки моющего состава в шланги вакуумной системы
СГГ-5	Клапан обеспечения дозировки сырья из воронки в смеситель, подачи сырья и порошковых компонентов вовнутрь массы производимого в емкости смесителя продукта
СГГ-6	Клапан управления вакуумной системой
ОП-10	Накопительные емкости
МР	Машина розлива
ПК	Полуавтомат, закручивающий крышки
ОП-8	Ведро для бракованных флаконов
ОП-11	Контейнер для кондиционных флаконов

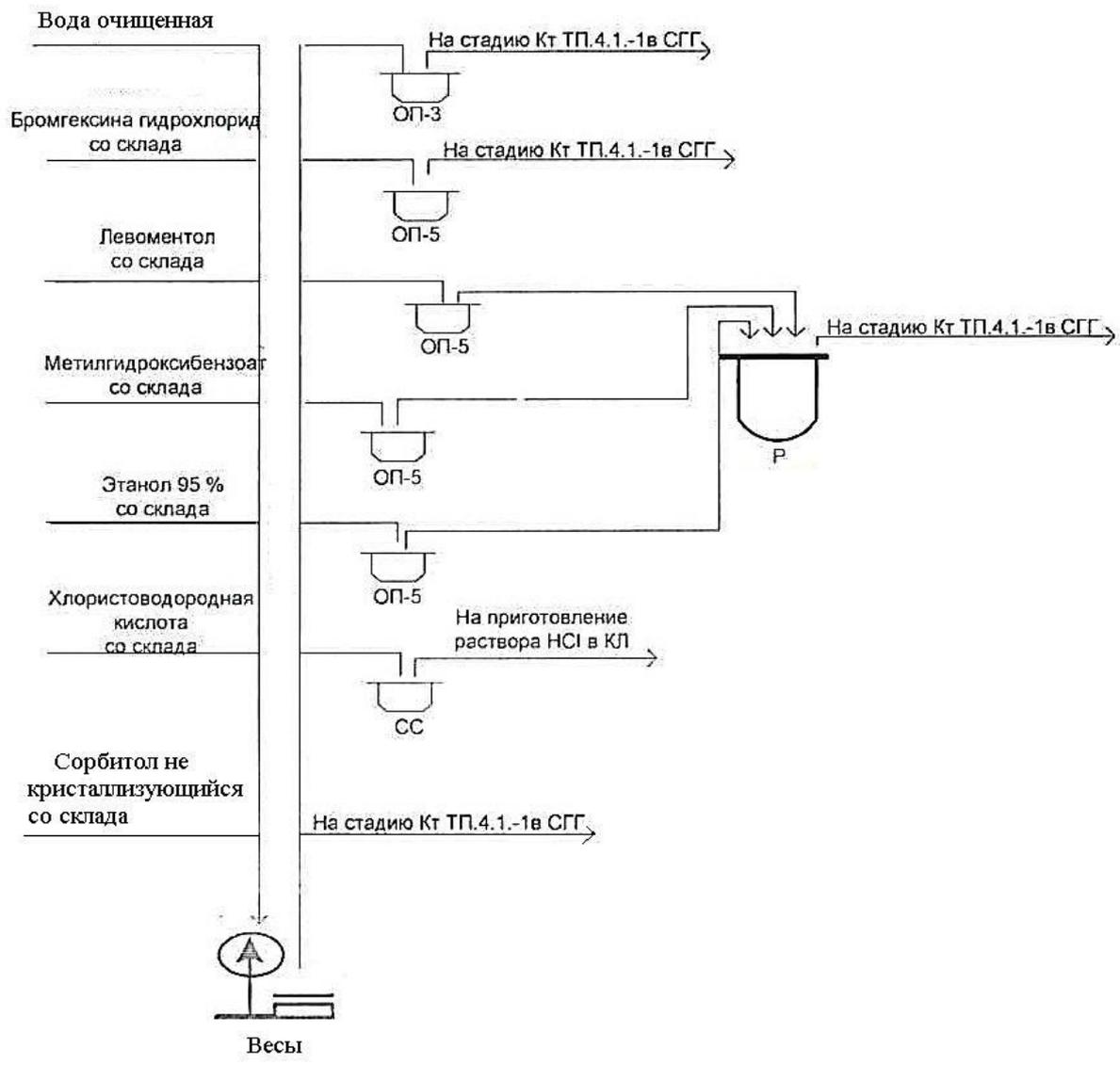


Рисунок 9 - Технологическая схема производства препарата «Бромгексин раствор». Стадия развешивание сырья

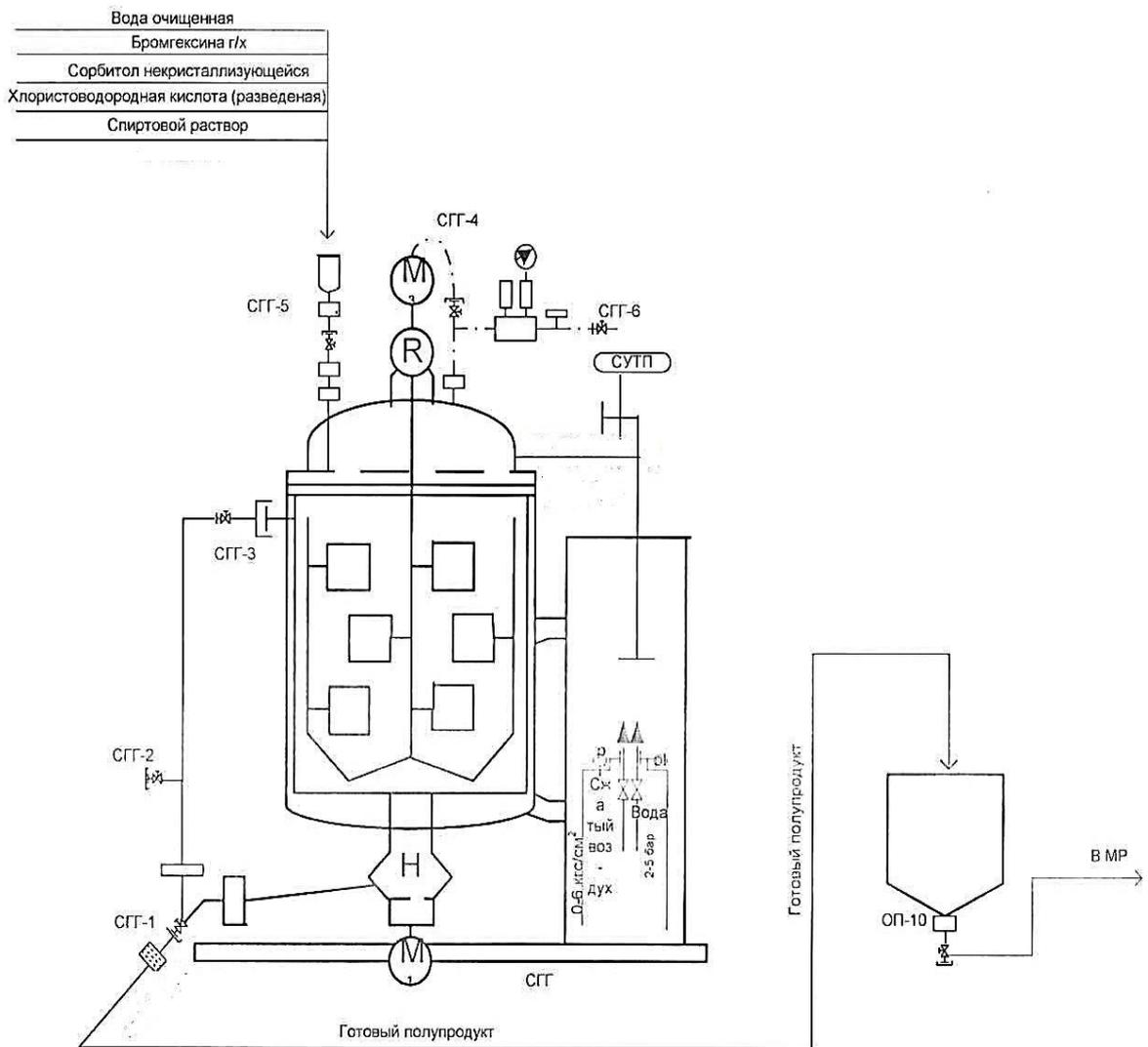


Рисунок 10 - Технологическая схема производства препарата «Бромгексин раствор». Стадия приготовления раствора бромгексин

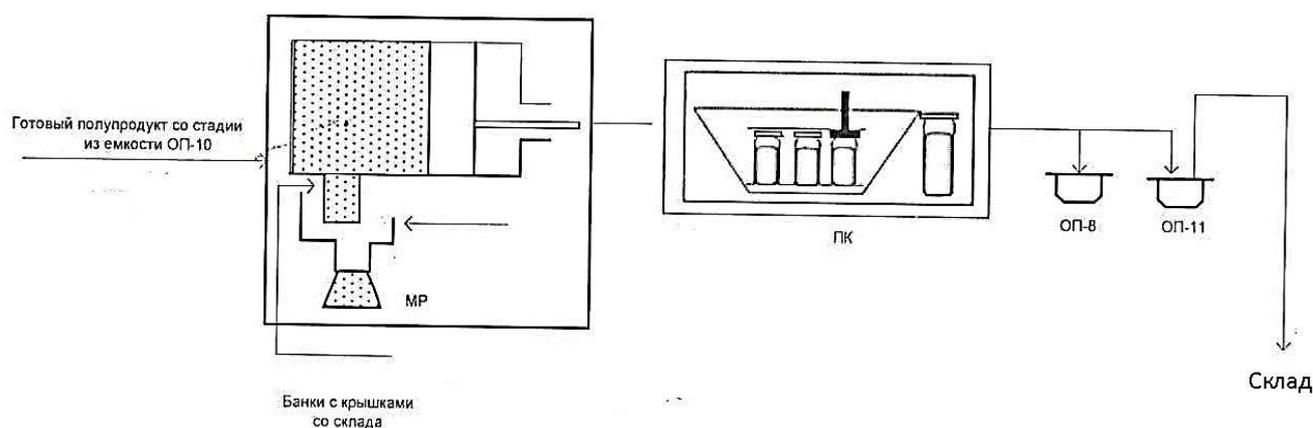


Рисунок 11 - Технологическая схема производства препарата «Бромгексин раствор». Стадия фасовка во флаконы

Таблица 3 – Материальный баланс производства

Наименование сырья и полупродуктов	Заданная масса единицы лекарственной формы, мг/100 мл	Рассчитанный объем серии (количество единиц лекарственной формы, штук)	Рассчитанная масса сырья, кг	Получено	
				количество единиц лекарственной формы, штук	масса, кг
1	2	3	4	5	6
А. Сырье:				Б. Готовый продукт	
1. Бромгексина гидрохлорид	0,0480		0,509		0,489
2. Этанол 95 %	1,8000		19,091		18,334
3. Левоментол	0,0041		0,043		0,042
4. Сорбитол некристаллизующийся 70 %	25,7143		272,727	10 186	261,920
5. Метилгидроксibenзоат	0,0984		1,043		1,002
6. Хлористоводородная кислота	0,0046		0,049		0,047
7. Вода	38,3307		406,537		390,428
В. Потери:					
1. Механические неучтенные потери: раствор Бромгексин в т.ч. Бромгексина гидрохлорид				420	27,737
					0,517
Итого	66,0000	10 606	700,000	10 606	700,000

1.4. Родственные примеси в фармацевтических субстанциях и в лекарственных препаратах

Во время производства лекарственных препаратов, субстанция подвергается различным воздействиям, в результате которых возможны процессы распада или другие побочные реакции. В субстанции и готовых лекарственных препаратах могут присутствовать примеси – продукты распада и технологические примеси.

Выпуск лекарственных препаратов и субстанций в рамках требований «Надлежащей производственной практики» (GMP, Good Manufacturing Practice) предполагает, что в них не может быть иных примесей, кроме тех, что естественным образом возникают в рамках нормального технологического процесса (так называемые сопутствующие примеси), и не может быть примесей, которые попали случайным образом, например, из-за плохой отмывки технологического оборудования, так называемые посторонние примеси.

Следует отметить, что принцип «прозрачности» (полной доступности информации) гласит, что все примеси лекарственной субстанции, которые связаны с ее получением, то есть, исходные вещества, побочные и промежуточные продукты, обще технологические и механические примеси, которые попадают в лекарственный препарат вместе с субстанцией и связующими добавками – известны, легко идентифицируются и контролируются.

Комплекс Руководств по качеству ICH [11] в сочетании со строгим выполнением правил GMP обеспечивает отсутствие на значимых уровнях так называемых посторонних примесей в лекарственных продуктах и гарантирует принцип «прозрачности» методов контроля данного лекарственного продукта. Это означает, что посредством этих методов

выявляются и контролируются все примеси, которые попадают в продукт в результате процессов его получения и хранения.

Отметим, что принцип прозрачности методов контроля качества позволяет, в частности, использовать лекарственную субстанцию до тех пор, пока она отвечает спецификации, что чрезвычайно выгодно для фармацевтической промышленности.

Ключевой особенностью руководств ICH является то, что примеси (родственные соединения) в лекарственных препаратах в зависимости от их содержания в продукте и максимальной суточной экспозиции пациента примесью в результате приема лекарственного продукта классифицируются на три категории:

- примеси, включаемые в отчет;
- примеси, для которых требуется идентификация;
- примеси, для которых требуется квалификация.

Согласно современной классификации примесей по содержанию в лекарственных субстанциях и препаратах [11, 12] существуют три концентрационных порога в порядке возрастания: порог включения в отчет, порог идентификации и порог квалификации. Если концентрация сопутствующей примеси превышает первый из них, но меньше второго, то она включается в тот документ, который генерируется в результате тестирования продукта, то есть, учитывается в так называемой сумме примесей; если концентрация примеси превышает порог идентификации, то ее химическое строение должно быть определено, и наконец, если содержание примеси превышает порог квалификации, то должен быть определен некоторый набор ее токсикологических свойств [12]. Более детально эта классификация разъясняется при обсуждении древа решений для идентификации и квалификации.

Все пороговые содержания для лекарственного препарата намного более либеральны. Объяснением этому служат два обстоятельства:

- продукты разложения, которые контролируются в лекарственном препарате, являются родственными соединениями лекарственной субстанции, то есть, предположительно имеют близкий профиль токсичности с лекарственной субстанцией;

- продукты разложения, которые контролируются в лекарственном препарате, могут предварительно образоваться уже в субстанции до того, как она попала в препарат, то есть, допустимый уровень продуктов разложения, общих для субстанции и препарата, в препарате может быть, как правило, выше, чем в субстанции. Естественно, это не относится к продуктам разложения, специфичным для препарата, например, продуктам взаимодействия лекарственной субстанции и вспомогательных веществ или упаковки. [12].

Действия по квалификации примеси начинаются, если уровень содержания примеси находится выше порога идентификации. Каждая примесь, содержание которой может находиться на уровне выше порога идентификации, проверяется на наличие рисков для человека (это литературный поиск и поиск с использованием так называемой компьютерной токсикологии) [13-15]. Если такой поиск не указывает на потенциальные угрозы, а уровень содержания примеси не превышает порога квалификации, то деятельность прекращается.

Если же уровень содержания примеси выше порога квалификации (и при этом уровень содержания примеси нельзя понизить так, чтобы он был ниже порога квалификации), то в зависимости от того, какова популяция предполагаемых пациентов и какова продолжительность лечения (и максимальная суточная доза), должны быть проведены соответствующие токсикологические исследования [12].

Таким образом, в руководствах ICH указывается, что:

- увеличение порога возможно при надлежащем научном обосновании;
- уменьшение может потребоваться для примесей с необычно высокой токсичностью.

Такой уровень регуляторных требований соответствует массовому применению и рутинизации хроматографических и электрокинетических методов разделения, таких как высокоэффективная жидкостная и газовая хроматографии (ВЭЖХ и ГХ), масс-спектрометрия, тонкослойная хроматография (ТСХ) и капиллярный электрофорез [16, 17]. То есть, эти методы с конца XX столетия стали постоянно применяться как при как в процессе разработки лекарственных препаратов, так и в контроле их качества, при этом следует учитывать, что любая методика должна полностью соответствовать требованиям, предъявляемым к валидации аналитических методик [18] и их рутинному использованию в рамках надлежащих лабораторных и производственных практик (GLP и GMP соответственно) [19, 20]. В результате появились учебники, посвященные теоретическим основам метода и разработке методик на его основе.

1.5 Ускоренное старение лекарственных препаратов. Определение срока годности

На основании требований международных документов, действующих в настоящее время, можно сформулировать основные принципы, касающиеся изучения стабильности и установления сроков годности готовых продуктов.

- сроки годности готовых продуктов устанавливаются в процессе их регистрации и отражаются в соответствующих регистрационных документах;
- в отношении активных субстанций чаще всего производителями устанавливаются не сроки годности, а сроки переконтроля, в фармакопейных статьях могут содержаться рекомендуемые условия хранения субстанций;
- полноценным основанием заявляемых сроков годности готовых продуктов считаются результаты долгосрочных испытаний стабильности;
- в составе регистрационных досье для ускорения выхода новых продуктов на рынок допускается представления не полных данных в отношении долгосрочных испытаний стабильности;

- при выборе экспериментальных условий хранения образцов необходимо учитывать климатическую зону, в которой предполагается хранение и реализация препаратов;

- на этапе регистрации на основании представленного пакета данных по стабильности чаще всего устанавливаются первоначальные сроки годности [21, 22].

Отсутствие объективной информации о реальной стабильности лекарств может привести к использованию препаратов с частично или полностью утраченными терапевтическими свойствами [23-26].

Периодичность проводимых испытаний стабильности новых и существующих лекарственных средств должна быть достаточной для определения характеристик стабильности фармацевтической субстанции или лекарственного препарата. Количество точек контроля результатов испытаний зависит от запланированного метода изучения стабильности и предполагаемого срока годности лекарственного средства (периода до проведения повторных испытаний стабильной фармацевтической субстанции).

Если срок годности лекарственного средства (период до проведения повторных испытаний стабильной фармацевтической субстанции) составляет один год и более, то исследования стабильности, следует проводить:

- каждые 3 месяца в течение первого года;
- каждые 6 месяцев в течение второго года;
- в дальнейшем раз в 12 месяцев на протяжении срока годности лекарственного средства.

Для лекарственных препаратов, при соответствующем обосновании, могут быть применены сокращенные планы исследования стабильности (метод крайних вариантов, матричный метод), в которых частота проведения испытаний может быть уменьшена или когда испытания комбинаций определенных факторов допускается проводить не в полном объеме [27].

1.6 Хроматография

Хроматография – это процесс разделения вещества за счет многократно повторяющихся актов сорбции и десорбции, при прохождении вещества вдоль слоя сорбента в потоке подвижной фазы, что приводит к обособлению зон веществ и разделению компонентов пробы. Если этот процесс лежит в основе метода разделения и обнаружения веществ – этот метод также называется хроматографией, или хроматографическим методом разделения [28].

Записанный во времени результат такого хроматографического разделения называется хроматограммой (рисунок 12).

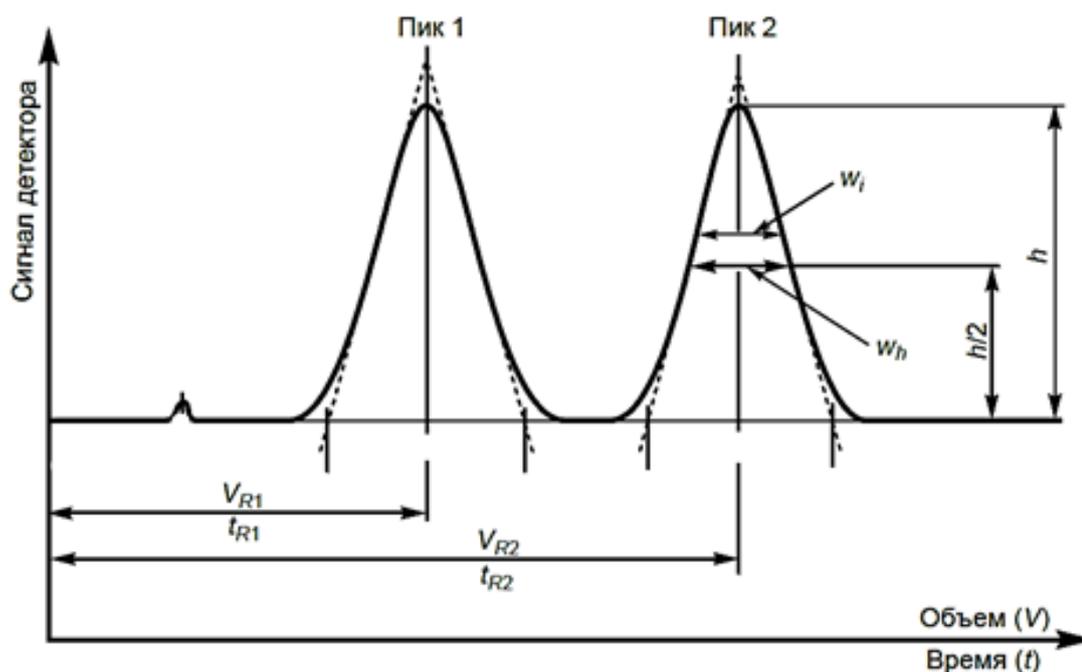


Рисунок 12 - Схематическое изображение хроматограммы

Путем использования хроматографических методов осуществляются:

- разделение смесей, состоящих из различных компонентов;
- контроль качества лекарственных препаратов, косметических средств

и т д;

- проверка веществ на чистоту;
- очистка технических продуктов;
- контроль различных производств.

ВЭЖХ в настоящее время является одним из самых распространенных методов контроля сырья и готовой продукции, который применяется в лабораториях различного профиля, решающих широкий спектр задач: научные исследования, фармацевтика, пищевая промышленность, исследования окружающей среды, криминалистика, биомедицина, и т.д. [29-30]. Широкое использование метода ВЭЖХ в фармацевтической практике, от анализа сырья, используемого для приготовления лекарственных препаратов, до контроля качества самих лекарственных препаратов, определило внесение его в Государственную фармакопею [31].

Все системы ВЭЖХ имеют компоненты, представленные на рисунке 13 [29]:

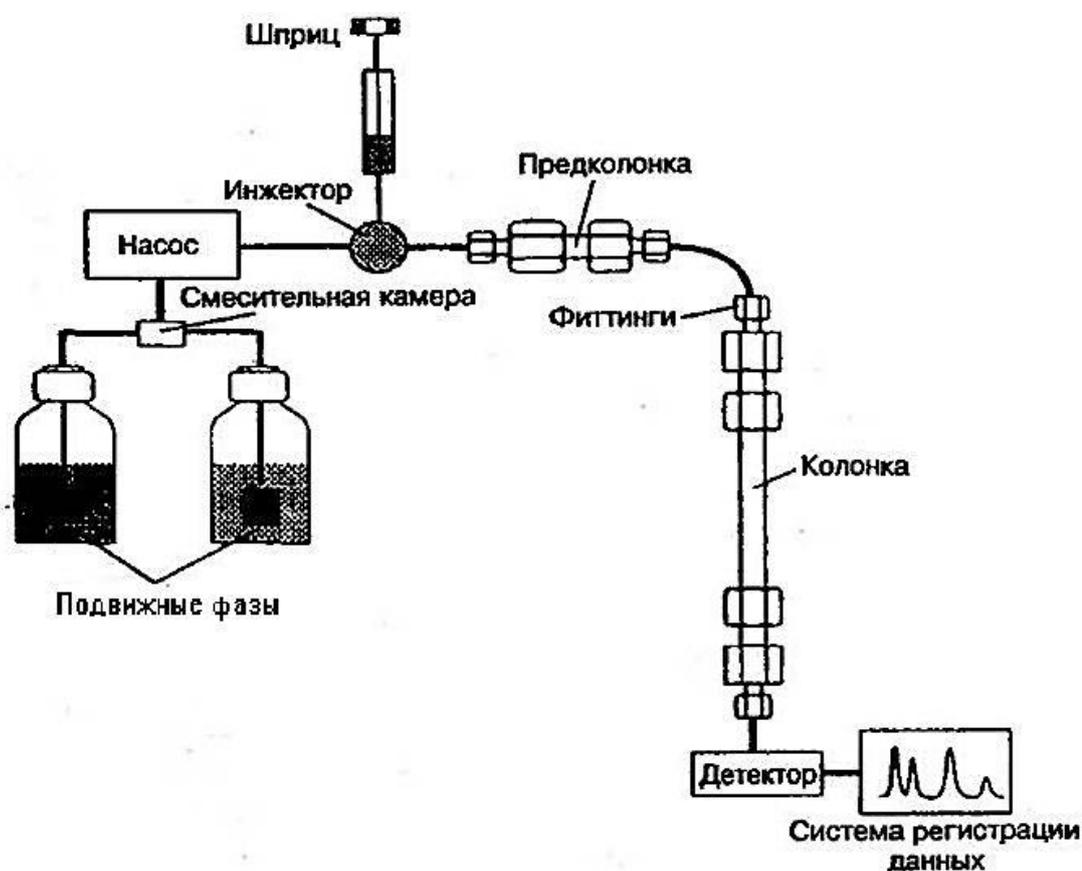


Рисунок 13 - Схема ВЭЖХ

Элементами хроматографа, используемого для метода ВЭЖХ, являются:

а) Узел подготовки подвижной фазы, включая резервуар, в котором содержится растворитель или элюент (подвижная фаза), и систему дегазации подвижной фазы;

б) В настоящее время схема жидкостного хроматографа включает один (изократический режим) или несколько (градиентный режим) насосов, управление ими осуществляется с помощью программ, скорость потока элюента, как правило, составляет $0,1 \div 10$ мл/мин;

в) Смеситель (при необходимости), в нем происходит смешение подвижных фаз из растворителей, дозируемых из разных насосов. Смеситель может использоваться так же для подготовки подвижной фазы при изократическом элюировании;

г) Система ввода пробы (инжектор), вводящий пробу в непрерывный поток элюента, с которым проба попадает в колонку. Инжектор может быть ручным или автоматическим (автосамплер), универсальным (ввод произвольного объема пробы) или дискретными (ввод пробы определенного объема);

д) Хроматографическая колонка – является центральным элементом ВЭЖХ, поскольку содержит наполнитель (неподвижная фаза), необходимый для осуществления разделения. Чаще всего является трубкой из нержавеющей стали, стекла или пластика, заполненную пористыми частицами сорбента (обычно - силикагель), покрытыми полимерными материалами, взаимодействующими с веществами пробы. Величина частиц сорбента в диаметре составляет от менее 2 мкм до 10 мкм. Меньший размер частиц обеспечивает большую эффективность, лучшее разрешение, на и дает также большее давление в системе;

е) детектор – определяет разделенные компоненты при их элюировании из колонки. Может быть один или несколько детекторов, обладающих разными способами детектирования. Получаемая при детектировании хроматограмма представляет собой график зависимости сигнала детектора от времени. Выделяют следующие виды детекторов:

1) спектрофотометрические (с помощью них могут быть проанализированы и примеси, и основные компоненты пробы при одном вводе пробы);

2) флуориметрические детекторы (применяют для соединений, способных к собственной флуоресценции или способных флуоресцировать после определенного воздействия, в том числе превращения в другие соединения);

3) рефрактометрические детекторы, или рефрактометры (для соединений, слабо поглощающих в ультрафиолетовой и видимой областях спектра);

ж) система управления хроматографом, сбора и обработки данных.

Области применения метода:

1) установление подлинности лекарственных средств;

2) количественный анализ лекарственных форм (определение и примесей, и фармацевтических субстанций);

3) идентификация примесей и установление неизвестной структуры;

4) количественное определение следовых количеств в фармакокинетике и метаболомике.

Основными достоинствами ВЭЖХ являются:

- высокая разделительная способность;
- высокая скорость движения хроматографической зоны, что позволяет проводить анализ в небольшой промежуток времени;
- проведение хроматографического процесса в мягких условиях [32-34].

Таким образом, метод ВЭЖХ является наиболее перспективным в практическом использовании, поскольку для данного метода не требуется высоких температур, метод высокочувствителен, проводится при нормальной температуре и атмосферном давлении, широко распространен в фармацевтической практике, а так же отлично подходит для разработки методики рутинного анализа [28].

1.7 Валидация аналитических методик

Валидация аналитической методики представляет собой экспериментальное доказательство пригодности метода для решения поставленных задач. [34-35].

Валидация аналитического метода проводится как при внедрении новой методики при разработке новых объектов исследования, так и при изменении условий анализа. Все методики количественного определения, в том числе методики определения примесей и методики определения предела содержания подлежат валидации [36, 37].

При изменении технологии получения объекта исследования, состава объекта, ранее утвержденной аналитической методики проводят повторную валидацию (ревалидацию) [35].

Методологическая часть нормативной документации по валидации аналитических методик состоит из определения параметров валидации. Такими параметрами являются специфичность, точность, воспроизводимость, предел обнаружения, линейность, устойчивость, сходимость результатов [37].

Валидационная оценка методики определения может проходить как по всем указанным параметрам валидации, так и по отдельным в зависимости от метода измерения, специфичности объектов исследования, назначения аналитической методики [38].

Каждый этап проведения валидации аналитической методики документируется и утверждается. Лаборатории, участвующие в валидации, должны быть обеспечены необходимыми ресурсами, а персонал должен иметь квалификацию, необходимую для проведения испытаний [39].

Валидация аналитического метода оформляется и подтверждается лабораторными исследованиями. Отчет о результатах проведенных валидационных исследований предоставляется в виде протокола о валидации анализа. В отчете о валидации аналитической методики указываются полное описание, достаточное для ее воспроизведения, оцениваемые характеристики, результаты экспериментов и статистическая обработка полученных данных, иллюстративные материалы, заключение о пригодности валидируемой методики для включения в нормативные документы [35, 36].

1.7.1 Валидация методики определения посторонних примесей (продуктов деградации) в лекарственных препаратах, в состав которых входят активные фармацевтические субстанции, полученные химическим путем

Производитель проводит валидацию аналитических методик определения примесей, которые образуются в ходе технологического процесса или выявлены при исследовании стабильности лекарственного препарата.

Для начала при валидации методики доказывают ее специфичность. Под специфичностью подразумевают возможность определять вещество в присутствии любых компонентов, содержащихся в пробе. При отсутствии специфичности у данной методики, она может быть дополнена другой методикой.

Специфичность аналитической методики считается установленной, если:

- ни растворитель, используемый в методике;
- ни элюент;

- ни компоненты плацебо (смесь вспомогательных веществ, входящих в лекарственный препарат);

- ни фармацевтическая субстанция со своими технологическими примесями, образующимися при синтезе, не искажают результат определения примесей (продуктов деградации) в лекарственном препарате. Для доказательства специфичности должны быть дополнительно проанализированы хроматограммы, полученные при исследовании образцов лекарственного препарата в «стрессовых условиях», т. е. при действии света, тепла, влажности, гидролиза щелочами, кислотами или окислении.

Для оценки продуктов деградации проводят установление линейно-динамического диапазона аналитической методики. Линейно-динамический диапазон – это размах концентраций, в котором величина сигнала прямо пропорциональна количеству соединения.

Линейность методики считается доказанной, если в рассмотренном интервале концентраций наблюдается пропорциональность между количеством вещества в растворе и фактором отклика детектора. Оценка линейности происходит на диапазоне от контролируемого предела до 120 % количества соответствующего продукта деградации, указанного в спецификации. Для идентифицируемых продуктов деградации линейность методики доказывается при непосредственном использовании чистого вещества или при помощи отдельных навесок продукта деградации, добавленных к образцу лекарственного препарата с последующей, проба подготовкой и определением. Не идентифицированные примеси (продукты деградации) соотносятся с фактором отклика основного вещества. Не зависимо от того какими являются продукты деградации идентифицированные или нет, готовятся и анализируются минимум 5 концентраций, причем значение для каждого испытания получают путем усреднения нескольких значений при многократном введении пробы в хроматограф.

Еще одним важным пунктом является определение правильности аналитической методики. Правильность – это близость полученного результата к истинному (например, к справочной величине).

Правильность оценивается в зависимости от вида продуктов деградации:

- для идентифицируемых продуктов деградации: используется метод добавок к готовому продукту известного количества продукта деградации (стандартного образца);

- для неидентифицируемых продуктов деградации: при использовании одинакового способа детекции для действующего вещества и продукта деградации рассчитывается эквивалентная площадь под пиком продукта деградации для контролируемого предела и для концентрации 120 % нормы содержания, указанной в спецификации. Для получения продуктов деградации готовится «стрессовая проба» лекарственного препарата и определяется эквивалентная площадь продукта деградации. К лекарственному препарату прибавляют разные количества «стресс раствора», что бы в результате получились количества продукта деградации в рамках диапазона применения методики (контролируемый предел, нормы по спецификации и 120 % от нормы).

В качестве критерия правильности метода рассчитывают величину систематической погрешности. Оценка правильности методик количественного определения осуществляется по результатам анализа методом добавок, в случае определения известных примесей, и по результатам анализа другой аналитической методикой, с уже известной правильностью [35, 36].

В ходе валидации обязательно оценивается и прецизионность методики. Прецизионность методики характеризуется близостью значений в серии параллельных измерений одного однородного образца, проведенных в установленных условиях [40].

Предел обнаружения – это наименьшее количество определяемого вещества в исследуемом образце, наличие которого оценивается с использованием валидируемой методики [36, 37].

Предел обнаружения определяемого вещества выражается, как правило, в концентрационных единицах. В зависимости от типа методики применяют различные подходы для нахождения предела обнаружения, среди них, визуальная оценка, соотношение сигнал/шум, использование калибровочной прямой и стандартного отклонения аналитического сигнала [35, 37].

В свою очередь, воспроизводимость представляет собой меру совпадения результатов измерений, полученных одинаковым методом, на идентичных образцах, разными операторами, с использованием различного оборудования, при проведении испытаний разными лабораториями. Оценка воспроизводимости также проводится по стандартному отклонению параллельных определений. Воспроизводимость обязательно изучается при стандартизации методики измерения [36].

Выводы по разделу 1

1. Проведен детальный литературный обзор существующих методик анализа препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5 мл»;
2. Изучена технология производства активной фармацевтической субстанции и технология производства препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5 мл».

2 Экспериментальная часть

2.1 Объект исследования

Бромгексин раствор для приема внутрь 4 мг/5 мл – препарат представляет собой бесцветную, прозрачную или слабо опалесцирующую жидкость с характерным запахом.

Активным веществом данного препарата является бромгексин гидрохлорид. Он представляет собой белый (или почти белый) кристаллический порошок. Гидрохлорид бромгексина хорошо растворим в воде, мало растворим в этаноле и в метилхлориде [2]. Температура плавления бромгексина хлорида 235 – 240 °С, Молекулярная масса 412,6 г/моль.

В качестве вспомогательных веществ используют этанол 95 % (ФС. 2.1.0036.15), левоментол (Европейская фармакопея), сорбитол некристаллизующийся 70 % (Европейская фармакопея), метилпарагидроксибензоат (Европейская фармакопея), хлористоводородная кислота (Европейская фармакопея), вода очищенная (ФС.2.2.0020.15).

2.2 Реагенты и оборудование

- Хроматограф жидкостный Waters 2489, Breeze 2 № E1187E569A
- Хроматограф жидкостный Agilent 1200
- Весы аналитические Mettler Toledo MS105DU № B046086274
- Фосфорная кислота ГОСТ 10678-76
- Ацетонитрил для хроматографии ТУ 2634-002-54260861-2013
- Калия дигидрофосфат ТУ 6-09-4138-75
- Метанол для хроматографии ГОСТ 2222-95

2.3 Оценка пригодности системы хроматографирования

Хроматографическая система должна быть оценена на возможность ее использования для исследования раствора бромгексина. Для этого готовят раствор бромгексина. 10,02 мг бромгексина (содержащего бромгексин, бромгексина примесь С и бромгексина примесь D) (EP CRS) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют около 15 мл 50 % раствора ацетонитрила, и с помощью шейкера встряхивают 15 минут (350 об/мин), доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Аналогично готовят и подвергают таким же операциям раствор сравнения, используя для его приготовления около 10,03 мг СО бромгексина гидрохлорида LGC кат. № MM0065.00.

Хроматографическая система может считаться пригодной, если на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы выполняются следующие условия (рисунок 14):

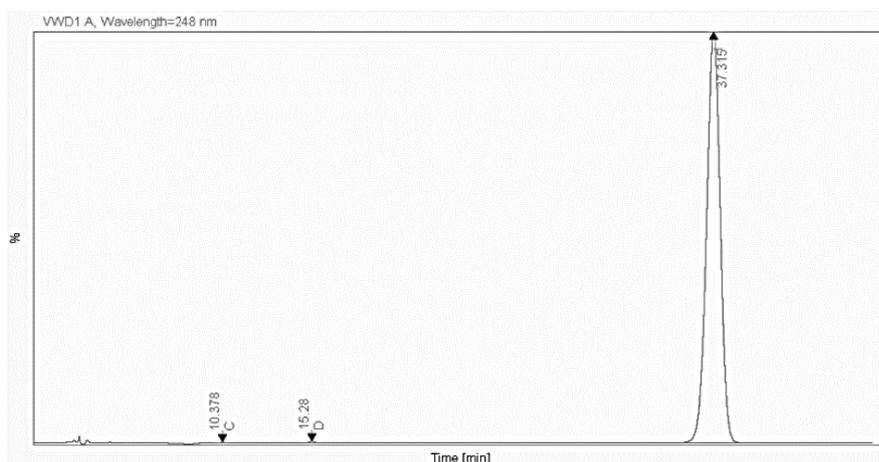
- разрешение между пиками примесей, обозначенных на хроматограмме буквами С и D:

$$R = \frac{2 \times (15,3 - 10,4)}{0,2 + 0,3} = 19,6. \quad (6)$$

На хроматограммах раствора сравнения (рисунок 15):

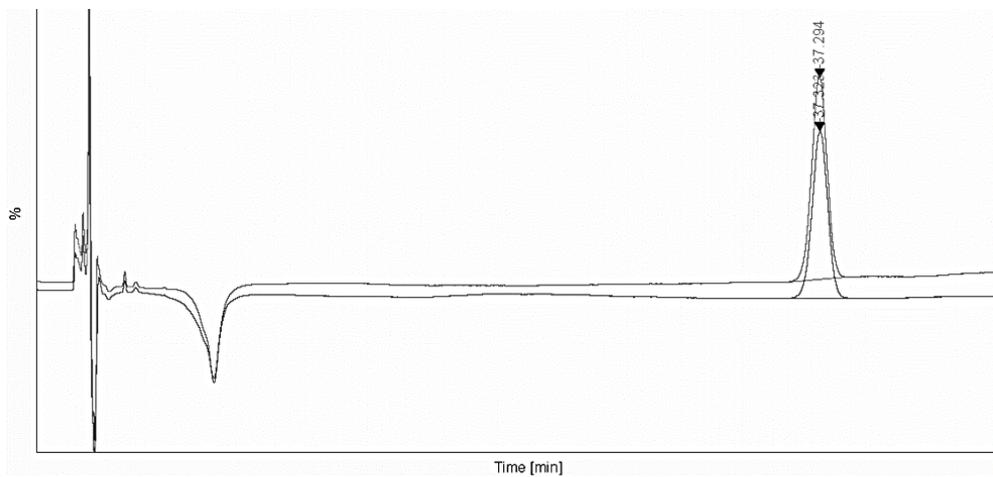
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику бромгексина:

$$N = 16 \times \left(\frac{37,3}{1} \right)^2 = 22261 \text{ т.т.} \quad (7)$$



Sample Name	RT	Area	Area, %	Height
p-p ППХС	10.378	9.91	0.04	0.7
p-p ППХС	15.280	32.19	0.14	1.6
p-p ППХС	37.315	22615.62	99.81	435.3
RSD	68.352	172.72		
Average	20.991	7552.57		

Рисунок 14 – Хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы



Sample Name	RT	Area	Area, %	Height
p-p сравнения	37.294	155.71	100.00	3.0
p-p сравнения	37.323	156.22	100.00	3.0
RSD	0.056	0.23		
Average	37.308	155.97		

Рисунок 15 - Хроматограмма раствора сравнения

- фактор асимметрии, рассчитанный для пика бромгексина:

$$A_x = \frac{1}{0,5 \times 2} = 1,0 \quad (8)$$

- относительное стандартное отклонение площади пика бромгексина:
0,23 %

На хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (рисунок 16):

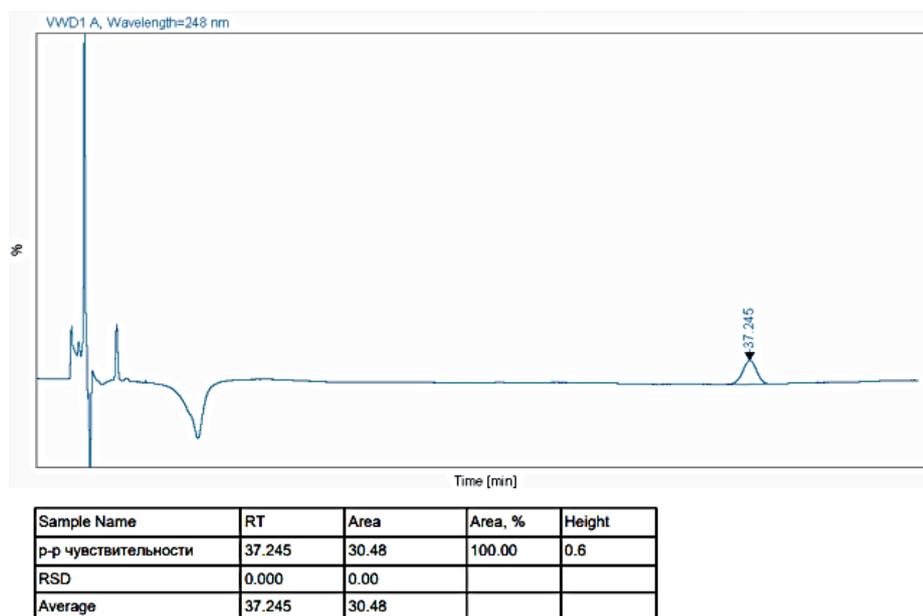


Рисунок 16 - Хроматограмма раствора чувствительности

- отношение сигнал/шум для пика бромгексина:

$$S/N = \frac{2 \times 11}{1} = 22 \quad (9)$$

Пригодность хроматографической системы соответствует.

2.4 Исходная методика родственных примесей препарата «Бромгексин раствор»

Условия хроматографирования:

- прибор: жидкостный хроматограф Agilent 1200;
- хроматографическая колонка из нержавеющей стали Symmetry C18 150 × 4,6 мм, 5 мкм;
- элюент: буферный раствор со значением pH=7,0 – ацетонитрил (для ВЭЖХ) в соотношении 20 : 80 (по объему);
- буферный раствор pH 7,0: в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 950 мл воды, 0,5 мл H₃PO₄ (концентрированной), доводят pH до значения 7,0 ± 0,05 (потенциометрически) раствором триэтиламина, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают;
- температура колонки: 35 °С;
- скорость потока подвижной фазы: 1,5 мл/мин;
- УФ-детектор, длина волны детектирования 248 нм;
- растворитель: метанол [27].

2.5 Модифицированная методика родственных примесей препарата «Бромгексин раствор»

Методика была поделена на две части

2.5.1 Продукты деградации бромгексина

Условия хроматографирования:

- прибор: жидкостный хроматограф Agilent 1200;
- хроматографическая колонка из нержавеющей стали Symmetry C18 150 × 4,6 мм, 5 мкм;
- элюент: буферный раствор со значением pH=7,0 – ацетонитрил (для ВЭЖХ) в соотношении 20 : 80 (по объему);

- буферный раствор pH 7,0: в мерную колбу вместимостью 1000 мл помещают 950 мл воды, 0,5 мл H_3PO_4 (концентрированной), доводят pH до значения $7,0 \pm 0,05$ (потенциометрически) раствором триэтиламина, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают;

- температура колонки: 35 °С;
- объем вводимой пробы: 20 мкл
- скорость потока подвижной фазы: 0,5 мл/мин;
- УФ-детектор, длина волны детектирования 248 нм;
- растворитель: 50 % ацетонитрил в воде.

2.5.2 Продукты деградации метилпарагидроксибензоата

- Хроматографическая колонка из нержавеющей стали размером 150×4,6 мм Spherisorb ODS-2 C18, 5 мкм;

- подвижная фаза: буферный раствор pH 3,0 – ацетонитрил (для ВЭЖХ) в соотношении 77 : 23 по объему;

- буферный раствор: 1,77 г дигидрофосфата калия помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 900 мл воды и встряхивают до полного растворения, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

- температура колонки: 30 °С;
- объем вводимой пробы: 10 мкл;
- скорость потока: 1,0 мл/мин;
- УФ – детектор, длина волны детектирования 254 нм;
- растворитель: 70 % метанол.

2.6 Проведение измерений и количественный расчет

Количественный расчет примесей проводили методом внешнего стандарта. В качестве внешнего стандарта использовали стандартные образцы примесей.

$$C = \frac{S \times C_0}{S_0} \quad (10)$$

где,

S – площадь пика примеси на хроматограмме исследуемого раствора;

S_0 – площадь пика стандартного образца;

C – концентрация определяемой примеси;

C_0 – концентрация стандартного образца.

Выводы по разделу 2

1. Методика определения родственных примесей препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5 мл», была поделена на две части «Продукты деградации бромгексина» и «Продукты деградации метилпарагидроксибензоата»;

2. Была подобрана методика для определения родственных примесей препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5 мл», которая соответствовала требованиям проверки пригодности хроматографической системы.

3 Обсуждение результатов

3.1. Валидация методики определения родственных примесей «Продукты деградации бромгексина»

Таблица 4 - Валидационные характеристики

Раздел проекта НД	Метод анализа	Валидационная характеристика
Продукты деградации бромгексина	ВЭЖХ	Проверка пригодности хроматографической систем Специфичность Предел количественного определения Линейно-динамический диапазон Прецизионность Правильность Поправочные коэффициенты идентифицированных примесей Робастность

Все параметры для оценки валидности разработанной методики были определены согласно приведенным в экспериментальной части методикам. Растворы сравнения, растворы «плацебо» и растворы для проверки чувствительности и пригодности были приготовлены непосредственно перед хроматографированием, то есть использовались свежеприготовленными.

Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы. 2,0 мл раствора сравнения помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 10 мг бромгексина для проверки пригодности хроматографической системы помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют около 15 мл растворителя, встряхивают на орбитальном шейкере при 350 об/мин в

течение 15 мин, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор «плацебо». 5,5 г смеси вспомогательных веществ, входящих в состав раствора в соответствующих пропорциях, помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляют около 3 мл растворителя, встряхивают на орбитальном шейкере при 350 об/мин в течение 15 мин. Доводят объем раствора растворителем до метки, перемешивают и фильтруют, используя мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2 мл фильтрата.

Все растворы вводят в хроматограф, хроматографируя не менее трех раз.

Время проведения хроматографирования всех исследуемых растворов должно превышать время удерживания пика бромгексина в 2 и более раза.

Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Время удерживания бромгексина гидрохлорида составляет порядка 38 минут.

Оценивают хроматограмму испытуемого раствора, идентифицируют примеси бромгексина гидрохлорида по их относительным временам удерживания, в соответствии с представленным рисунком типичной хроматограммы модельной смеси примесей бромгексина гидрохлорида и полученной хроматограммы раствора для проверки пригодности хроматографической системы (рисунок 17).

В таблице 5 приведены идентифицированные примеси, их характеристики удерживания (относительные времена, RRT) и значения поправочных коэффициентов (k_i).

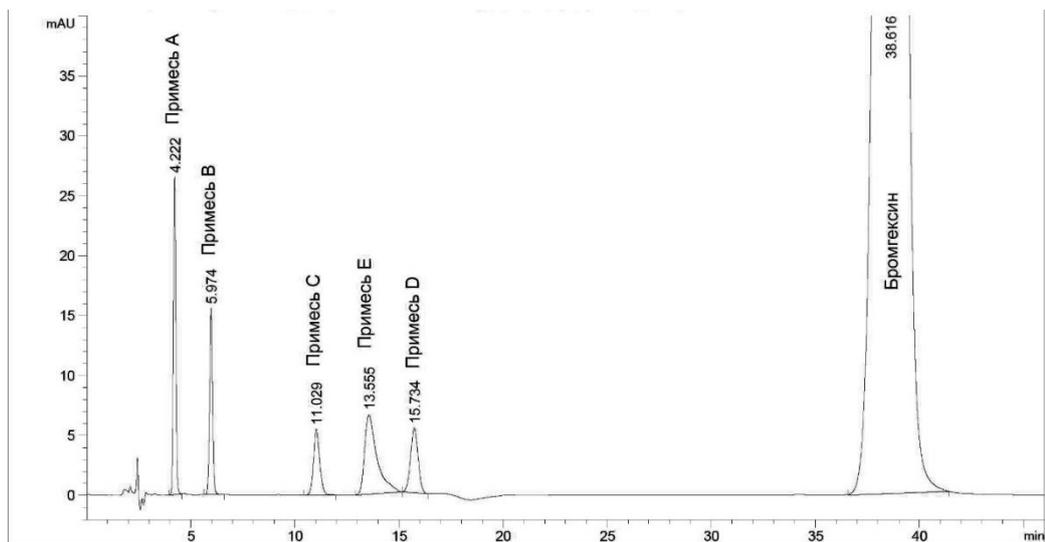
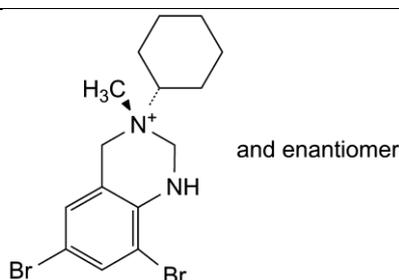


Рисунок 17 - Типичная хроматограмма модельной смеси примесей бромгексина гидрохлорида

Таблица 5 – Относительные времена удерживания примесей

Название соединения	Структурная формула	RRT ОКОЛО	k_i
Примесь А (2-амино-3,5-дибромфенил)метанол		0,11	0,68
Примесь В 2-амино-3,5-дибромбензальдегид		0,16	0,87
Примесь С 2-[[циклогексил(метил)амино]метил]анилин		0,29	1,10
Примесь Е (3RS)-6,8-дибром-3-циклогексил-3-метил-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-3-ий		0,36	0,78

Продолжение таблицы 5

Название соединения	Структурная формула	RRT около	k _i
Примесь D 4-бром-2- [[циклогексил(метил)амино] метил]анилин		0,41	0,71

Поправочный коэффициент для неидентифицированных примесей бромгексина гидрохлорида равен 1.

Содержание примеси в препарате в процентах (w) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot k_i \cdot a_0 \cdot 1 \cdot 1 \cdot 10 \cdot \rho \cdot P \cdot 100 \cdot 5}{S_0 \cdot a \cdot 25 \cdot 20 \cdot 10 \cdot 100 \cdot L} = \frac{S \cdot k_i \cdot a_0 \cdot \rho \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot 100 \cdot L} \quad (11)$$

где,

S – площадь пика любой единичной примеси на хроматограмме испытуемого раствора;

S₀ – площадь пика бромгексина гидрохлорида на хроматограмме раствора сравнения;

a – навеска препарата, в граммах;

a₀ – навеска СО бромгексина гидрохлорида, в миллиграммах;

L – заявленное содержание бромгексина гидрохлорида в 5 мл препарата, в миллиграммах;

ρ – плотность препарата, в г/см³;

k_i – поправочный коэффициент примеси;

P – содержание бромгексина гидрохлорида в СО, в процентах.

Суммарное содержание примесей в процентах определяют сложением содержания всех единичных примесей.

Пики, зарегистрированные на хроматограммах раствора «плацебо» и растворителя, а также пики, зарегистрированные ниже чувствительности детектора в расчет на хроматограмме исследуемого образца не принимаются. Не берется в расчет и пик 4-гидроксибензойной кислоты (со временем удерживания относительно пика бромгексина около 0,05).

4-Гидроксибензойная кислота является продуктом деградации метилпарагидроксибензоата, количественное содержание в препарате 4-гидроксибензойной кислоты определяется в разделе «Продукты деградации метилпарагидроксибензоата».

Согласно требованиям содержание (3RS)-6,8-дибром-3-циклогексил-3-метил-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-3-ия (примесь E) должно быть не более 1,0 %, (2-амино-3,5-дибромфенил)метанола (примесь A) – не более 0,5 %, 2-амино-3,5-дибромбензальдегида (примесь B) – не более 0,5 %, 2-[[циклогексил(метил)амино]метил]анилина (примесь C) – не более 0,5 %, 4-бром-2-[[циклогексил(метил)амино]метил]анилина (примесь D) – не более 0,5 %, единичной неидентифицированной примеси – не более 0,2 %. Сумма примесей – не более 1,5 %.

Специфичность

В условиях валидируемой методики хроматографируют следующие растворы: растворитель, раствор «плацебо», испытуемый раствор, раствор ППХС, раствор 4-гидроксибензойной кислоты, раствор модельной смеси примесей бромгексина (содержащий примеси A, B, C, E, D).

Раствор модельной смеси примесей бромгексина (содержащий примеси A, B, C, E, D) готовят следующим образом: 40 мг бромгексина гидрохлорида рабочего стандартного образца (PCO) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 50 мл растворителя, в течение 15 минут подвергают встряхиванию, добавляют по 0,5 мл растворов примесей

А, В, С, и D, а также 1,0 мл исходного раствора примеси Е, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Для установления специфичности методики, искомый компонент должен быть определен однозначно в присутствии всех примесей, должно быть доказано отсутствие наложения пиков растворителя и компонентов плацебо на пики примесей.

Рассчитывают нескорректированные относительные времена удерживания пиков (RRT) примесей (t_{R2}) по бромгексину (t_{R1}) на полученных хроматограммах испытуемого раствора, РППХС и раствора модельной смеси примесей бромгексина по формуле:

$$RRT = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}, \quad (12)$$

Для подтверждения специфичности методики, требуется показать, что пики веществ хорошо разделены между собой, для этого рассчитывают разрешение между пиками определяемых веществ на хроматограмме раствора модельной смеси примесей бромгексина (таблица 6).

Критерии приемлемости

1. Пики, соответствующие временам удерживания бромгексина, примесей А, В, С, Е, D, должны отсутствовать хроматограммах раствора «плацебо», растворителя, раствора 4-гидроксибензойной кислоты.

2. Фактические относительные времена удерживания пиков (RRT) примесей на полученных хроматограммах должны соответствовать заявленным в НД с точностью не менее 90 %.

3. Разрешение между пиками определяемых веществ должно быть не менее 1,5.

Таким образом, разработанная для определения продуктов деградации бромгексина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии методика является специфичной, так как:

- при хроматографировании растворов «плацебо», растворителя, раствора 4-гидроксibenзойной кислоты, на их хроматограммах не обнаружены пики с характеристиками удерживания, совпадающими с

Таблица 6 - Валидация специфичности аналитической методики определения продуктов деградации бромгексина

Специфичность					
Пики с характеристиками удерживания, совпадающими с удерживанием бромгексина, а также примесей А, В, С, Е, D модельной смеси					
Хроматограмма раствора «плацебо»			не зарегистрированы		
Хроматограмма растворителя			не зарегистрированы		
Хроматограмма 4-гидроксibenзойной кислоты			не зарегистрированы		
Относительные времена удерживания примесей и точность их соответствия значениям, заявленным в НД					
Разрешение (R_s)					
Хроматограмма раствора модельной смеси примесей бромгексина					
Название соединения	(t_R) пика, мин	(RRT) по проекту НД	(RRT) фактическое	Точность (RRT), %	Разрешение R_s
1	2	3	4	5	6
Примесь А	4,222	0,11	0,1092	99,30	-
	4,221		0,1094	99,44	
	4,222		0,1093	99,39	
	4,222		0,1092	99,23	
Среднее значение	4,222		0,109	99,34	-
RSD, %			0,094	-	-
Примесь В	5,974	0,16	0,1546	96,60	7,60
	5,972		0,1548	96,72	
	5,974		0,1547	96,69	
	5,976		0,1545	96,56	
Среднее значение	5,974		0,1546	96,64	
RSD, %			0,078		
Примесь С	11,028	0,29	0,2853	98,38	13,03
	11,023		0,2857	98,50	
	11,029		0,2856	98,49	
	11,034		0,2853	98,37	
Среднее значение	11,029		0,2855	98,44	
RSD, %			0,069		

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6
Примесь E	13,548	0,36	0,3505	97,36	3,27
	13,558		0,3513	97,60	
	13,555		0,3510	97,51	
	13,545		0,3502	97,28	
Среднее значение	13,552		0,3508	97,44	
		RSD, %	0,147		
Примесь D	15,737	0,41	0,4071	99,30	2,57
	15,723		0,4074	99,38	
	15,734		0,4074	99,38	
	15,747		0,4071	99,30	
Среднее значение	15,735		0,4073	99,34	
		RSD, %	0,045	-	
Бромгексин	38,652	1	1	-	19,63
	38,589		1	-	
	38,616		1	-	
	38,679		1	-	
Хроматограмма раствора для проверки пригодности хроматографической системы					
Название соединения	(t_R) пика, мин	(RRT) по проекту НД	(RRT) фактическое	Точность (RRT), %	Разрешение R_s
Примесь С	11,00	0,29	0,286	98,62 %	-
Примесь D	15,69	0,41	0,408	99,51 %	7,84
Бромгексин	38,47	1	-	-	19,46
Хроматограмма испытуемого раствора (с 010219)					
Название соединения	(t_R) пика, мин	(RRT) по проекту НД	(RRT) фактическое	Точность (RRT), %	Разрешение R_s
Примесь А	не обнаруж.	0,11	-	-	-
Примесь В	5,98	0,16	0,155	96,87 %	6,78
Примесь С	не обнаруж.	0,29	-	-	-
Примесь E	13,53	0,36	0,351	97,50 %	11,82
Примесь D	не обнаруж.	0,41	-	-	-
Бромгексин	38,56	1	-	-	17,963

удерживанием бромгексина, примесей А, В, С, E, D на хроматограмме раствора модельной смеси примесей бромгексина;

- фактические относительные времена удерживания пиков (RRT) примесей соответствуют значениям, заявленным в НД с точностью более 10 %;

Определение поправочных коэффициентов примесей А, В, С, Е, D бромгексина

В данном испытании необходимо оценить соответствие (равенство) откликов детектора примесей к действующему веществу – бромгексину гидрохлориду, по которому ведется оценка содержания примесей в препарате и, соответственно, корректность данной оценки содержания.

Определение поправочных коэффициентов проводили по стандартным растворам примесей и бромгексина. Стандартные растворы при этом имели концентрации, близкие к концентрациям в исследуемых растворах [43-44].

Приготовление растворов для расчета поправочных коэффициентов

Исходный раствор примеси А готовят по точной навеске стандартного образца примеси А, растворяя 10,0 мг в 25 мл растворителя.

Исходный раствор примеси В готовят по точной навеске стандартного образца примеси В, растворяя 10,0 мг в 25 мл растворителя.

Исходный раствор примеси С готовят по точной навеске стандартного образца примеси С, растворяя 10,0 мг в 25 мл растворителя..

Исходный раствор примеси Е готовят по точной навеске стандартного образца примеси Е, растворяя 10,0 мг в 25 мл растворителя..

Исходный раствор примеси D готовят по точной навеске стандартного образца примеси D, растворяя 10,0 мг в 25 мл растворителя.

Раствор для расчета поправочных коэффициентов примесей А, В, С, D (0,5%). 1,0 мл раствора СО бромгексина гидрохлорида, 1,0 мл исходного раствора примеси А, 1,0 мл исходного раствора примеси В, 1,0 мл исходного раствора примеси С, 1,0 мл исходного раствора примеси D помещают в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор для расчета поправочного коэффициента примеси Е (1,0%). 1,0 мл раствора СО бромгексина гидрохлорида, 1,0 мл исходного раствора

примеси Е помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Формула для расчета поправочных коэффициентов примесей.

$$k_i = \frac{S_0 \times C_i \times P_i}{S_i \times C_0 \times P_0} \quad (13)$$

S_0 – площадь пика бромгексина;

S_i – площадь пика примеси;

C_0 - концентрация бромгексина г/хл, мкг/мл;

C_i – концентрация соответствующей примеси, мкг/мл;

P_0 – содержание бромгексина г/хл в стандартном образце (%);

P_i – содержание примеси в стандартном образце (%).

Критерии приемлемости при оценке поправочных коэффициентов

RSD_{ki} значений поправочных коэффициентов примесей не должны быть более 5,0 %.

Таблица 7- Расчет поправочных коэффициентов примесей А, В, С, D, Е по отношению к бромгексину гидрохлориду.

Раствор для расчета поправочных коэффициентов примесей (0,5%)			
Концентрация	$C_0 = 2,24$ мкг/мл	Содержание бромгексина гидрохлорида в РСО	$P_0 = 99,7$ %
№ раствора	Площадь пика бромгексина		
1	136,32		
2	134,51		
3	134,91		
4	134,26		
5	135,66		
6	136,77		
Среднее значение	135,41		
RSD, %	0,748		
Поправочный коэффициент примеси А бромгексина			
Концентрация	$C_A = 2,22$ мкг/мл	Содержание (2-амино-3,5-дибромфенил) метанола в СО	$P_A = 99,7$ %

Продолжение таблицы 7

№ раствора	Площадь пика примеси А		Поправочный коэффициент k_A
1	198,46		0,681
2	198,69		0,671
3	198,49		0,674
4	198,86		0,669
5	198,42		0,678
6	198,54		0,683
Среднее значение	198,58		0,676
RSD, %	0,084		0,807
Поправочный коэффициент примеси В бромгексина			
Концентрация	$C_B = 2,24$ мкг/мл	Содержание 2-амино-3,5-дибромбензальдегида в СО	$P_B = 99,8$ %
№ раствора	Площадь пика примеси В		Поправочный коэффициент k_B
1	154,92		0,881
2	155,35		0,867
3	154,78		0,872
4	155,61		0,864
5	154,76		0,877
6	154,72		0,885
Среднее значение	155,02		0,874
RSD, %	0,238		0,940
Поправочный коэффициент примеси С бромгексина			
Концентрация	$C_C = 2,03$ мкг/мл	Содержание 2-[[циклогексил(метил) амино] метил] анилина в СО	$P_C = 99,8$ %
№ раствора	Площадь пика примеси С		Поправочный коэффициент k_C
1	111,26		1,111
2	111,38		1,096
3	111,15		1,101
4	111,49		1,092
5	110,77		1,111
6	111,06		1,117
Среднее значение	111,19		1,1048
RSD, %	0,230		0,895
Поправочный коэффициент примеси D бромгексина			
Концентрация	$C_D = 1,96$ мкг/мл	Содержание 4-бром-2- [[циклогексил(метил)амино]метил]анилина в СО	$P_D =$ 78,54%

Продолжение таблицы 7

№ раствора	Площадь пика примеси D	Поправочный коэффициент k_D
1	130,67	0,719
2	131,65	0,704
3	132,44	0,702
4	132,84	0,697
5	132,57	0,705
6	132,65	0,711
Среднее значение	132,14	0,706
RSD, %	0,626	1,093
Раствор для расчета поправочных коэффициентов примесей (1,0%)		
Концентрация $C_0 = 4,44$ мкг/мл	Содержание бромгексина гидрохлорида в РСО $P_0 = 99,7 \%$	
№ раствора	Площадь пика бромгексина	
1	253,95	
2	253,21	
3	253,52	
4	253,12	
№ раствора	Площадь пика бромгексина	
5	254,42	
6	253,04	
Среднее значение	253,54	
RSD, %	0,214	
Поправочный коэффициент примеси E бромгексина		
Концентрация $C_E = 4,11$ мкг/мл	Содержание (3RS)-6,8-дибром-3-циклогексил-3-метил-1,2,3,4-тетрагидрохиназолин-3-ия в СО $P_E = 91,56\%$	
№ раствора	Площадь пика примеси E	Поправочный коэффициент k_E
1	276,82	0,780
2	276,96	0,777
3	277,33	0,777
4	276,41	0,778
5	276,88	0,781
6	275,21	0,782
Среднее значение	276,60	0,779
RSD, %	0,268	0,250

Правильность, линейность и диапазон.

При оценке правильности и линейно-динамического диапазона готовят 5 модельных растворов примесей А, В, С, D.

Изначально готовят исходные растворы каждой из примесей, растворяя точную навеску и тщательно перемешивая на шейкере. Затем эти исходные растворы смешивают с модельными растворами бромгексина и

вспомогательных веществ, получая серию растворов с различной концентрацией примесей (таблица 8)

Таблица 8 – Результаты испытания

№ модельного раствора	Навеска СО примеси, мг	Концентрация раствора (X) в % от теоретической по проекту НД
2	5,0	0,125
3	10,0	0,25
4	20,0	0,5
5	24,0	0,6

Модельные растворы №2 -5 примесей А, В, С, D (0,125% - 0,6%).

Все растворы перед хроматографированием фильтруют, используя мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с размером пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 2 мл фильтрата.

Для приготовления модельного раствора №1, содержащих 0,05% примесей А, В, С, D берут 1,0 мл модельного раствора № 4 примесей А, В, С, D (0,5%) помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Отдельно готовят и модельные растворы примеси Е. Исходный раствор готовят согласно данным таблицы 9.

Соответствующие навески стандартных образцов примеси Е помещают в мерные колбы на 50 мл, тщательно перемешивают.

1,0 мл полученных растворов помещают в мерные колбы вместимостью 10 мл, доводят объемы растворов растворителем до метки и перемешивают.

Таблица 9 – Концентрации примеси Е

№ модельного раствора	Навеска СО примеси, мг	Концентрация раствора (X) в % от теоретической по проекту НД
2	6,0	0,3
3	12,0	0,6
4	20,0	1,0
5	24,0	1,2

Затем готовят модельные растворы примеси Е в присутствии вспомогательных веществ и бромгексина с содержанием примеси от 0,3% до 1,2%.

Модельный раствор №1 примеси Е с концентрацией 0,05% готовят из 1,0% раствора, разбавляя его в 2 раза.

Готовят 5 модельных растворов бромгексина.

Исходный раствор бромгексина готовят согласно данным таблицы 10.

Таблица 10 – Концентрации бромгексина

№ модельного раствора	Навеска СО примеси, мг	Концентрация раствора (X) в % от теоретической по проекту НД
2	4,0	0,2
3	10,0	0,5
4	20,0	1,0
5	24,0	1,2

В ней указаны массы стандартного образца бромгексина гидрохлорида, которые следует растворить в 50 мл растворителя при тщательном перемешивании.

1,0 мл полученных растворов помещают в мерные колбы вместимостью 10 мл, доводят объемы растворов растворителем до метки и перемешивают.

Далее готовят модельные растворы №2 -5 бромгексина с различной концентрацией (0,2% - 1,2%). Модельный раствор №1 бромгексина (0,05%) готовят разбавлением в два раза раствора с концентрацией 1%.

Хроматографируют полученные модельные растворы и раствор сравнения в условиях, описанных в разделе «Продукты деградации бромгексина».

Для оценки правильности рассчитывают степень соответствия между известным истинным значением и значением, полученным по введенной методике. Правильность методики определяем величиной отношения «найденного» к «введенному».

$$\text{Правильность (\%)} = \frac{Y_i}{X_i} \times 100; \quad (14)$$

где,

Y_i – найдено в, мкг/мл;

X_i – введено, мкг/мл

$$Y_i \text{ (мкг / мл)} = \frac{S_i \times k_i \times C_0 \times P_0}{S_0 \times P_i} \quad (15)$$

где,

S_i – площадь пика определяемого вещества на хроматограмме модельного раствора (для каждой из 5-и концентраций);

S_0 – площадь пика бромгексина на хроматограмме раствора сравнения;

C_0 – концентрация бромгексина гидрохлорида в растворе сравнения, мкг/мл;

P_0 – содержание основного вещества в РСО бромгексина гидрохлорида, %;

k_i – поправочный коэффициент примеси (для примеси А $k_i = 0,67$, В $k_i = 0,87$, С $k_i = 1,1$, Е $k_i = 0,85$, D $k_i = 0,88$).

$$X_i(\text{мкг} / \text{мл}) = \frac{C_{\text{факт}} \times P_i}{100\%} \quad (16)$$

где,

$C_{\text{факт}}$ – фактическая концентрация модельного раствора (для каждой из 5-и концентраций), мкг/мл;

P_i – содержание основного вещества в СО взятых для приготовления модельных растворов, %.

В качестве критерия линейности рассчитывают значение квадрата коэффициента корреляции (r^2):

$$r^2 = \left(\frac{n \cdot \sum_1^n (x_i \times y_i) - \sum_1^n x_i \times \sum_1^n y_i}{\sqrt{\left[n \times \sum_1^n x_i^2 - \left(\sum_1^n x_i \right)^2 \right] \times \left[n \times \sum_1^n y_i^2 - \left(\sum_1^n y_i \right)^2 \right]}} \right)^2 \quad (17)$$

где,

n – объем выборки;

x_i – концентрация определяемого вещества в растворе;

y_i – экспериментально измеренное значение.

Критерии приемлемости:

- правильность должна находиться в пределах 97-103 % (относительное стандартное отклонение ± 3 %)

- значение квадрата коэффициента линейной корреляции $r^2 \geq 0,995$.

Таблица 11 - Валидация правильности, линейности метода ВЭЖХ раздела «Продукты деградации бромгексина»

Раствор сравнения		
	Концентрация C_0 , мкг/мл	Среднее значение площади пика, (S_0)
Бромгексина гидрохлорид	2,056	127,96
Модельные растворы примесей А, В, С, D		
Правильность, повторяемость примесь А бромгексина		

Модельные растворы примесей (примесь А бромгексина)

Продолжение таблицы 11

№ модел. раствора	Площадь пика, (S ₁)	Площадь пика, (S ₂)	Площадь пика, (S ₃)	Среднее значение площади пика примеси А, (S _i)	RSD, %
1	19,53	20,36	18,64	19,51	4,41
2	54,30	55,21	53,11	54,21	1,94
3	104,28	105,33	105,42	105,01	0,60
4	203,30	202,19	202,68	202,72	0,27
5	244,35	243,31	242,92	243,53	0,30
№ модель. раствора	Концентрация примеси А в % (около)	«Введено» концентрация примеси А в модельном растворе (X _i) мкг/мл	Среднее значение площади пика примеси А, (S _i)	«Найдено», (Y _i) мкг/мл	Правильность R _i = Y _i * 100 / X _i в %
1	0,05 %	0,221	19,51	0,209	94,32
2	0,125 %	0,553	54,21	0,580	104,83
3	0,25 %	1,107	105,01	1,124	101,54
4	0,50 %	2,213	202,72	2,169	98,01
5	0,60 %	2,656	243,53	2,606	98,11
Среднее значение правильности, \bar{R} , %					99,36
Относительное стандартное отклонение (RSD), %					4,01 < 5,0 соответствует
Систематическая погрешность $\delta\% = \bar{R} - 100 = 99,36 - 100,00 \leq 3,0\%$					0,64 < 3,0 соответствует
Линейность и диапазон примесь А					
График линейности					
Коэффициент линейной корреляции (r ²)					0,9996 > 0,995 соответствует

Продолжение таблицы 11

Правильность, повторяемость примесь В бромгексина					
Модельные растворы (примесь В бромгексина)					
№ модель. раствора	Площадь пика, (S ₁)	Площадь пика, (S ₂)	Площадь пика, (S ₃)	Среднее значение площади пика примеси В, (S _i)	RSD, %
1	16,18	16,31	15,33	15,94	3,34
2	42,14	40,85	41,91	41,63	1,65
3	83,96	84,02	83,17	83,72	0,57
4	164,37	165,64	165,14	165,05	0,39
5	188,90	191,35	190,66	190,30	0,66
№ модель. раствора	Концентрация примеси В в % (около)	«Введено» концентрация примеси В в модельном растворе (X _i) мкг/мл	Среднее значение площади пика примеси В, (S _i)	«Найдено», (Y _i) мкг/мл	Правильность R _i = Y _i * 100 / X _i в %
1	0,05 %	0,226	15,94	0,222	97,96
2	0,125 %	0,566	41,63	0,579	102,26
3	0,25 %	1,132	83,72	1,164	102,90
4	0,50 %	2,263	165,05	2,296	101,44
5	0,60 %	2,716	190,30	2,647	97,46
Среднее значение правильности, \bar{R} , %					100,40
Относительное стандартное отклонение (RSD), %					2,51 < 5,0 соответствует
Систематическая погрешность $\delta\% = \bar{R} - 100 = 100,40 - 100,00 \leq 3,0\%$					0,40 < 3,0 соответствует
Линейность и диапазон примесь В					
График линейности					
Коэффициент линейной корреляции (r ²)					0,9987 > 0,995 соответствует

Продолжение таблицы 11

Правильность, повторяемость примесь С бромгексина					
Модельные растворы (примесь С бромгексина)					
№ модель. раствора	Площадь пика, (S ₁)	Площадь пика, (S ₂)	Площадь пика, (S ₃)	Среднее значение площади пика примеси С, (S _i)	RSD, %
1	11,83	11,07	12,05	11,65	4,41
2	30,64	29,24	29,12	29,67	2,85
3	59,62	60,22	60,97	60,27	1,12
4	118,25	119,63	119,89	119,26	0,74
5	138,80	137,52	136,99	137,77	0,68
№ модель. раствора	Концентрация примеси С в % (около)	«Введено» концентрация примеси С в модельном растворе (X _i), мкг/мл	Среднее значение площади пика примеси С, (S _i)	«Найдено», (Y _i) мкг/мл	Правильность R _i = Y _i * 100 / X _i в %
1	0,05 %	0,204	11,65	0,205	100,24
2	0,125 %	0,511	29,67	0,522	102,01
3	0,25 %	1,022	60,27	1,060	103,72
4	0,50 %	2,044	119,26	2,097	102,61
5	0,60 %	2,453	137,77	2,423	98,79
Среднее значение правильности, \bar{R} , %					101,47
Относительное стандартное отклонение (RSD), %					1,93 < 5,0 соответствует
Систематическая погрешность $\delta\% = \bar{R} - 100 = 101,47 - 100,00 \leq 3,0\%$					1,47 < 3,0 соответствует
Линейность и диапазон примесь С					
График линейности					
Коэффициент линейной корреляции (r ²)					0,9989 > 0,995 соответствует

Продолжение таблицы 11

Правильность, повторяемость примесь D бромгексина					
Модельные растворы (примесь D бромгексина)					
№ модель. раствора	Площадь пика, (S ₁)	Площадь пика, (S ₂)	Площадь пика, (S ₃)	Среднее значение площади пика примеси D, (S _i)	RSD, %
1	15,30	15,62	14,99	15,30	2,06
2	38,05	37,94	38,97	38,32	1,48
3	76,32	77,05	76,06	76,48	0,67
4	148,19	149,11	148,06	148,45	0,39
5	172,94	174,62	174,11	173,89	0,50
№ модель. раствора	Концентрация примеси D в % (около)	«Введено» концентрация примеси D в модельном растворе (X _i), мкг/мл	Среднее значение площади пика примеси D, (S _i)	«Найдено», (Y _i) мкг/мл	Правильность R _i = Y _i * 100 / X _i в %
1	0,05 %	0,205	15,30	0,211	102,73
2	0,125 %	0,513	38,32	0,528	102,89
3	0,25 %	1,027	76,48	1,054	102,67
4	0,50 %	2,054	148,45	2,047	99,65
5	0,60 %	2,453	173,89	2,397	97,75
Среднее значение правильности, \bar{R} , %					101,14
Относительное стандартное отклонение (RSD), %					2,30 < 5,0 соответствует
Систематическая погрешность $\delta\% = \bar{R} - 100 = 101,14 - 100,00 \leq 3,0\%$					1,14 < 3,0 соответствует
Линейность и диапазон примесь D					
График линейности					
Коэффициент линейной корреляции (r ²)					0,9995 > 0,995 соответствует
Правильность, повторяемость примесь E бромгексина					
Модельные растворы примеси E бромгексина					
№ модель. раствора	Площадь пика, (S ₁)	Площадь пика, (S ₂)	Площадь пика, (S ₃)	Среднее значение площади пика примеси E, (S _i)	RSD, %
1	13,64	13,39	14,99	14,01	6,15
2	81,30	83,36	87,65	84,10	3,85
3	164,72	172,33	176,81	171,29	3,57
4	278,97	286,22	284,32	283,17	1,33
5	347,11	349,77	347,37	348,08	0,42

Продолжение таблицы 11

№ модель. раствора	Концентрация примеси E в % (около)	«Введено» концентрация примеси E в модельном растворе (X _i), мкг/мл	Среднее значение площади пика примеси E, (S _i)	«Найдено», (Y _i) мкг/мл	Правильность R _i = Y _i * 100 / X _i в %
1	0,05 %	0,196	14,01	0,191	97,01
2	0,30 %	1,178	84,10	1,144	97,08
3	0,60 %	2,357	171,29	2,330	98,86
4	1,00 %	3,928	283,17	3,852	98,06
5	1,20 %	4,714	348,08	4,735	100,45
Среднее значение правильности, \bar{R} , %					98,29
Относительное стандартное отклонение (RSD), %					1,45 < 5,0 соответствует
Систематическая погрешность $\delta\% = \bar{R} - 100 = 98,29 - 100,00 \leq 3,0\%$					1,71 < 3,0 соответствует
Линейность и диапазон примесь E					
График линейности					
<p>Площадь пика</p> <p>Концентрация, мкг/мл</p> <p>$y = 73,5014x - 1,7678$ $R^2 = 0,9996$</p>					
Коэффициент линейной корреляции (r^2)					0,9996 > 0,995 соответствует
Правильность, повторяемость определения неидентифицированной примеси бромгексина					
Модельные растворы бромгексина					
№ модель. раствора	Площадь пика, (S ₁)	Площадь пика, (S ₂)	Площадь пика, (S ₃)	Среднее значение площади пика бромгексина, (S _i)	RSD, %
1	12,72	11,86	13,08	12,55	4,99
2	51,36	50,67	49,21	50,41	2,18
3	124,08	126,21	126,87	125,72	1,16
4	244,75	241,34	239,99	242,03	1,01

5	297,11	299,95	298,55	298,54	0,48
---	--------	--------	--------	--------	------

Продолжение таблицы 11

№ модель. раствора	Концентрация бромгексина г/хл в % (около)	«Введено» концентрация бромгексина г/хл в модельном растворе (X_i), мкг/мл	Среднее значение площади пика бромгексина, (S_i)	«Найдено», (Y_i) мкг/мл	Правильность $R_i = Y_i * 100 / X_i$ в %
1	0,05 %	0,197	12,55	0,200	101,56
2	0,20 %	0,790	50,41	0,805	101,97
3	0,50 %	1,974	125,72	2,008	101,71
4	1,00 %	3,948	242,03	3,865	97,91
5	1,20 %	4,738	298,54	4,768	100,64
Среднее значение правильности, \bar{R} , %					100,76
Относительное стандартное отклонение (RSD), %					1,66 < 5,0 соответствует
Систематическая погрешность $\delta\% = \bar{R} - 100 = 100,76 - 100,00 \leq 3,0\%$					0,76 < 3,0 соответствует
Линейность и диапазон. Бромгексин					
График линейности					
Коэффициент линейной корреляции (r^2)					0,9994 > 0,995 соответствует

Таким образом, все критерии укладываются в обозначенные диапазоны. Правильность – 97-103%, квадрат коэффициент корреляции более 0,995, линейность в нужном диапазоне так же сохраняется.

Для оценки прецизионности необходимо было провести не менее 6 определений растворов с концентрацией соединения, близкой к реальной задаче.

Проводят приготовление шести модельных растворов с содержанием идентифицированных примесей 100 % относительно максимального допустимого содержания соответствующих примесей, и с содержанием плацебо в концентрации соответствующей испытываемому раствору: модельный раствор №4 примесей А, В, С, D (0,05 %), модельный раствор №4 примеси Е (1,0%), модельный раствор бромгексина № 2 (0,2 %) (приготовление приведено в разделе «Правильность, повторяемость, линейность и диапазон».

Проводят анализ в условиях валидируемой методики.

Содержание анализируемых веществ в модельных растворах, рассчитанное по результатам анализов каждого из растворов, представлено в виде извлечения R_i , (см. Правильность); вычисляют относительное стандартное отклонение (RSD) полученных результатов.

$$RSD(\%) = \frac{\sqrt{\frac{\sum_1^n S_i^2 - n\bar{S}^2}{n-1}}}{\bar{S}} \times 100 \quad (18)$$

где

n – объем выборки = 6 – для оценки повторяемости, 12 – для оценки внутрилабораторной прецизионности;

S – площадь пика бромгексина на хроматограмме раствора сравнения;

\bar{S} – средняя площадь пика бромгексина на хроматограмме раствора сравнения;

Σ – знак суммирования.

Критерии приемлемости

Относительное стандартное отклонение (RSD):

Повторяемость - не более 5,0 %;

Внутрилабораторная прецизионность – не более 10,0 %

Разница результатов анализа двух аналитиков в разные дни на том же оборудовании не должна превышать максимально допустимой неопределенности результатов анализа (при доверительной вероятности 95 %): $|\bar{R}_1 - \bar{R}_2| \leq \Delta_{\text{Imp}} \leq 5 \%$

Таблица 12 - Валидация прецизионности методики определения родственных примесей

№ п/п модельного раствора №4 примесей А, В, С, D (0,05%)	Содержание примеси А	
	Исполнитель 1, R ₁ ,%	Исполнитель 2, R ₂ ,%
1	2	3
1	98,94	100,54
2	98,01	99,37
3	99,17	99,52
4	99,79	100,88
5	99,27	100,47
6	99,89	100,62
Среднее значение	99,18	100,23
$ \bar{R}_1 - \bar{R}_2 \leq 5 \%$	1,05 ≤ 5 %	
RSD _{n=6} , % (повторяемость)	0,69 ≤ 5 %	0,63 ≤ 5 %
RSD _{n=12} , % (внутрилабораторная прецизионность)	0,83 ≤ 10 %	
№ п/п модельного раствора №4 примесей А, В, С, D (0,05%)	Содержание примеси В	
	Исполнитель 1, R ₁ ,%	Исполнитель 2, R ₂ ,%
1	100,21	101,21
2	100,47	100,87
3	99,47	101,44
4	98,33	100,83
5	100,14	101,42
6	99,08	99,65
Среднее значение	99,62	100,90
$ \bar{R}_1 - \bar{R}_2 \leq 5 \%$	1,28 ≤ 5 %	
RSD _{n=6} , % (повторяемость)	0,82 ≤ 5 %	0,66 ≤ 5 %
RSD _{n=12} , % (внутрилабораторная прецизионность)	0,97 ≤ 10 %	
№ п/п модельного раствора №4 примесей А, В, С, D (0,05%)	Содержание примеси С	
	Исполнитель 1, R ₁ ,%	Исполнитель 2, R ₂ ,%
1	100,53	101,07
2	100,12	101,29
3	99,18	100,71
4	98,95	100,05
5	100,48	101,34
6	99,56	99,76
Среднее значение	99,80	100,70

Продолжение таблицы 12

1	2	3
$ \bar{R}_1 - \bar{R}_2 \leq 5 \%$	$0,90 \leq 5 \%$	
RSD _{n=6} , % (повторяемость)	$0,67 \leq 5 \%$	$0,66 \leq 5 \%$
RSD _{n=12} , % (внутрилабораторная прецизионность)	$0,79 \leq 10 \%$	
№ п/п модельного раствора №4 примесей А, В, С, D (0,05%)	Содержание примеси D	
	Исполнитель 1, R ₁ ,%	Исполнитель 2, R ₂ ,%
1	99,32	100,57
2	99,01	101,24
3	99,54	101,67
4	98,67	100,98
5	98,34	101,02
6	98,09	100,07
Среднее значение	98,83	100,93
$ \bar{R}_1 - \bar{R}_2 \leq 5 \%$	$2,1 \leq 5 \%$	
RSD _{n=6} , % (повторяемость)	$0,57 \leq 5 \%$	$0,55 \leq 5 \%$
RSD _{n=12} , % (внутрилабораторная прецизионность)	$1,22 \leq 10 \%$	
№ п/п модельного раствора №4 примеси Е (1,0%)	Содержание примеси Е	
	Исполнитель 1, R ₁ ,%	Исполнитель 2, R ₂ ,%
1	98,16	99,23
2	99,97	100,02
3	99,98	99,01
4	98,07	99,12
5	98,13	100,19
6	99,55	100,77
Среднее значение	98,98	99,72
$ \bar{R}_1 - \bar{R}_2 \leq 5 \%$	$0,74 \leq 5 \%$	
RSD _{n=6} , % (повторяемость)	$0,96 \leq 5 \%$	$0,71 \leq 5 \%$
RSD _{n=12} , % (внутрилабораторная прецизионность)	$0,90 \leq 10 \%$	
№ п/п модельного раствора №2 бромгексина (0,2%)	Содержание бромгексина гидрохлорида	
	Исполнитель 1, R ₁ ,%	Исполнитель 2, R ₂ ,%

1	97,91	100,04
2	98,35	100,22
3	99,97	99,78
4	98,61	99,57
5	99,44	100,85
6	99,88	99,13
Среднее значение	99,03	99,93
$ \bar{R}_1 - \bar{R}_2 \leq 5 \%$	$0,9 \% \leq 5 \%$	

Продолжение таблицы 12

RSD _{n=6} , % (повторяемость)	$0,86 \leq 5 \%$	$0,59 \leq 5 \%$
RSD _{n=12} , % (внутрилабораторная прецизионность)	$0,85 \leq 10 \%$	

Требования прецизионности соответствует.

Предел количественного определения

Предел количественного определения родственных примесей рассчитывают на основе результатов линейной зависимости, используя значение стандартного отклонения остаточных значений для свободного члена линейной зависимости (S_a) и углового коэффициента линейной регрессии (b).

Рассчитывают предел количественного определения по формуле:

$$PKO = \frac{10 \cdot S_a}{b} \quad (19)$$

Критерии приемлемости

Рассчитанное значение концентрации ПКО в нормализованных координатах не должно превышать 32% относительно максимального допустимого содержания примеси.

Таблица 13 - Предел количественного определения аналитической методики раздела «Родственные примеси»

Предел количественного определения примеси А бромгексина	
Угловой коэффициент линейной регрессии (b)	91,026
Стандартное отклонение остаточных значений для свободного члена линейной зависимости (S _a)	1,812
Предел количественного определения примеси А, мкг/мл	0,199
Предел количественного определения примеси А относительно максимального допустимого содержания примеси А (0,5 %) в препарате составил $9,95 \leq 32 \%$	

Продолжение таблицы 13

Вывод	чувствительность методики является достаточной для определения примеси А в препарате и составляет около 0,05 % относительно содержания действующего вещества в испытуемом растворе	
Предел количественного определения примеси В бромгексина		
Угловой коэффициент линейной регрессии (b)	70,704	
Стандартное отклонение остаточных значений для свободного члена линейной зависимости (S _a)	2,472	
Предел количественного определения примеси В, мкг/мл	0,350	
Предел количественного определения примеси В относительно максимального допустимого содержания примеси В (0,5 %) в препарате составил $17,5 \leq 32 \%$		
Вывод	чувствительность методики является достаточной для определения примеси В в препарате и составляет около 0,088 % относительно содержания действующего вещества в испытуемом растворе	
Предел количественного определения примеси С бромгексина		
Угловой коэффициент линейной регрессии (b)	56,713	
Стандартное отклонение остаточных значений для свободного члена линейной зависимости (S _a)	1,668	
Предел количественного определения примеси С, мкг/мл	0,294	
Предел количественного определения примеси С относительно максимального допустимого содержания примеси С (0,5 %) в препарате составил $14,7 \leq 32 \%$		
Вывод	чувствительность методики является достаточной для определения примеси С в препарате и составляет около 0,074 % относительно содержания действующего вещества в испытуемом растворе	
Предел количественного определения примеси D бромгексина		
Угловой коэффициент линейной регрессии (b)	70,707	
Стандартное отклонение остаточных значений для свободного члена линейной зависимости (S _a)	1,342	
Предел количественного определения примеси D, мкг/мл	0,190	
Предел количественного определения примеси D относительно максимального допустимого содержания примеси D (0,5 %) в препарате составил $9,49 \leq 32 \%$		
Вывод	чувствительность методики является достаточной для определения примеси D в препарате и составляет около 0,048 % относительно содержания действующего вещества в испытуемом растворе	
Предел количественного определения примеси E бромгексина		
Угловой коэффициент линейной регрессии (b)	73,501	
Стандартное отклонение остаточных значений для свободного члена линейной зависимости (S _a)	2,445	
Предел количественного определения примеси E, мкг/мл	0,333	

Предел количественного определения примеси Е относительно максимального допустимого содержания примеси Е (1,0 %) в препарате составил $8,32 \leq 32 \%$	
Вывод	чувствительность методики является достаточной для определения примеси Е в препарате и составляет около 0,083 % относительно содержания действующего вещества в испытуемом растворе
Предел количественного определения неидентифицированных примесей бромгексина	
Угловой коэффициент линейной регрессии (b)	62,194
Стандартное отклонение остаточных значений для свободного члена линейной зависимости (S_a)	2,467

Продолжение таблицы 13

Предел количественного определения бромгексина г/л, мкг/мл	0,397
Предел количественного определения бромгексина г/л относительно максимального допустимого содержания неидентифицированной примеси (0,2%) в препарате составил $9,93\% \leq 32 \%$	
Вывод	чувствительность методики является достаточной для определения неидентифицированной примеси в препарате и составляет около 0,099 % относительно содержания действующего вещества в испытуемом растворе

Робастность

Готовят 3 раствора сравнения в соответствии с требованиями раздела НД «Продукты деградации бромгексина».

Растворы хроматографируют сразу после приготовления ($S_{нач}$) и после хранения при комнатной температуре в течение 8 часов (S_i).

Критерии приемлемости

В случае выполнения указанных ниже соотношений растворы считаются стабильными:

$$\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100 \leq 5,0\% \quad (20)$$

где,

S_i - площадь пика определяемого компонента на хроматограмме раствора в i -ый момент времени;

$S_{нач}$ - площадь пика определяемого компонента на хроматограмме раствора в начальный момент времени.

Таблица 14 - Стабильность растворов

Наименование, № раствора	Площадь пика в исходном растворе ($S_{нач}$)	Площадь пика через 8 часов (S_i)	Разница в содержании $\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100, \%$	
	Бромгексин			
Раствор сравнения №1	135,6	138,2	1,92 %	
Раствор сравнения №2	138,3	140,5	1,59 %	
Раствор сравнения №3	130,5	131,9	1,07 %	
Стабильность РПХС				
Наименование, № раствора	Площадь пика в исходном растворе ($S_{нач}$)	Площадь пика через 8 часов (S_i)	Разница в содержании $\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100, \%$	
	Бромгексин			
РПЧХС №1	22915	23159	1,06 %	
РПЧХС №2	22661	22865	0,90 %	
РПЧХС №3	23412	23547	0,58 %	
Примесь С				
РПЧХС №1	13,02	13,41	2,99 %	
1	2	3	4	
РПЧХС №2	13,41	13,57	1,19 %	
РПЧХС №3	14,11	14,52	2,91 %	
Примесь D				
РПЧХС №1	33,97	34,32	1,03 %	
РПЧХС №2	34,68	35,02	0,98 %	
РПЧХС №3	35,04	35,54	1,42 %	
Стабильность РПЧХС				
Наименование, № раствора	Площадь пика в исходном растворе ($S_{нач}$)	Площадь пика через 8 часов (S_i)	Разница в содержании $\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100, \%$	
	Бромгексин			
РПЧХС №1	28,9	30,2	4,49 %	
РПЧХС №2	32,8	33,4	1,83 %	
РПЧХС №3	33,5	35,04	4,59 %	
Стабильность испытуемого раствора				
Время	Сразу после	Через 3 часа,	Через 5	Через 8 часов,

	приготовления, (S _{нач})	(S ₃)	часов, (S ₅)	(S ₈)
Площадь пика примеси В	10,60	10,15	17,64	18,95
Разница в содержании		4,24 % < 5 %	66,45% > 5 %	78,81% > 5%
не более 5 %		соответствует	не соответствует	не соответствует

Продолжение таблицы 14

Площадь пика примеси Е	43,37	45,27	60,47	64,18
Разница в содержании		4,38 % < 5 %	39,43 % > 5%	47,98 % > 5%
не более 5 %		соответствует	не соотв	не соотв
Площадь пика неидентиф. примеси с ВУ 23,107 (RRT 0,60)	-	-	15,62	75,81
Разница в содержании	-	-	20,6% > 5%	100 % > 5%
не более 5 %		соответствует	не соответствует	не соответствует
Площадь пика бромгексина	23545	23518	23489	23501
Разница в содержании	-	0,11 % < 5 %	0,24 % < 5 %	0,19 % < 5 %
не более 5 %		соответствует	соответствует	соответствует

Растворы сравнения, РППХС, РПЧХС выдерживают требования по стабильности в течение 8 часов.

Испытуемый раствор выдерживают требования по стабильности в течение 3 часов.

3.2 Валидация методики определения родственных примесей «Продукты деградации метилпарагидроксибензоата»

Таблица 15 - Валидационные характеристики методики определения родственных примесей

Раздел проекта НД	Метод анализа	Валидационная характеристика
Продукты деградации метилпарагидроксибензоата	ВЭЖХ	Специфичность и правильность Линейность и диапазон Прецизионность и робастность Предел количественного определения

Методика испытания:

Раствор СО 4-гидроксибензойной кислоты. Около 8,2 мг СО 4-гидроксибензойной кислоты (Sigma – Aldrich кат. № PHR1048) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 70 мл растворителя, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, доводят раствор растворителем до метки и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы. 1,0 мл раствора СО 4-гидрокси бензойной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

В инжектор хроматографа вводят растворитель, раствор для проверки чувствительности хроматографической системы, раствор СО 4-гидроксибензойной кислоты и испытуемый раствор.

Время удерживания пика 4-гидроксибензойной кислоты около 3 мин, время удерживания пика метилпарагидроксибензоата около 8 мин.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если при хроматографировании раствора стандартного образца 4-гидроксибензойной кислоты выполняются следующие условия:

- число теоретических тарелок хроматографической колонки, характеризующее ее эффективность по 4-гидроксибензойной кислоте, не менее 5 тысяч;

- фактор асимметрии, рассчитанный для пика 4-гидроксibenзойной кислоты не превышает значения 2,0;

- относительное стандартное отклонение для площади пика 4-гидроксibenзойной кислоты не превышает 5,0 %.

Хроматографическая система считается чувствительной к 4-гидроксibenзойной кислоте, если

- отношение сигнал/шум для пика 4-гидроксibenзойной кислоты – не менее 10,0.

Содержание 4-гидроксibenзойной кислоты в препарате в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 50 \times 1 \times \rho \times P \times 100 \times 5}{S_0 \times a \times 100 \times 10 \times L \times K} = \frac{S \times a_0 \times 25 \times \rho \times P}{S_0 \times a \times L \times K}, \quad (21)$$

где,

S – площадь пика 4-гидроксibenзойной кислоты на хроматограмме испытуемого раствора;

S₀ – площадь пика 4-гидроксibenзойной кислоты на хроматограмме раствора СО 4-гидроксibenзойной кислоты;

a – навеска препарата, в граммах;

a₀ – навеска СО 4-гидроксibenзойной кислоты, в миллиграммах;

L – содержание метилпарагидроксibenзоата в 5 мл препарата, в миллиграммах;

ρ – плотность препарата, в г/см³;

P – содержание 4-гидроксibenзойной кислоты в СО, для Sigma-Aldrich выражается в процентах; для USP RS – в миллиграммах на миллиграмм;

K – коэффициент учета выражения содержания основного вещества в СО 4-гидроксibenзойной кислоты, K = 100 для Sigma-Aldrich; K = 1 для USP RS.

Содержание 4-гидроксибензойной кислоты в препарате должно быть не более 5,0 %.

Специфичность

Для доказательства специфичности валидируемой методики хроматографировали следующие растворы: растворитель, раствор «плацебо», испытуемый раствор. При этом следят за наличием или отсутствием пиков со временем удерживания, совпадающим со временем удерживания пика 4-гидроксибензойной кислоты на хроматограмме раствора стандартного образца 4-гидроксибензойной кислоты.

Проводят измерение времени удерживания (t_R) пика 4-гидроксибензойной кислоты на хроматограмме испытуемого раствора и раствора стандартного образца 4-гидроксибензойной кислоты [42].

Специфичность методики считается приемлемой, если на хроматограммах растворов «плацебо» и растворителя отсутствуют пики с временами удерживания, равными удерживанию 4-гидроксибензойной кислоты, а также если отклонение времени удерживания пика этой кислоты на хроматограмме исследуемой смеси от времени удерживания на хроматограмме стандартного образца отличается меньше, чем на 2%.

Таблица 16 – Параметры хроматографического исследования продуктов деградации метилпарагидроксибензоата, доказывающие специфичность аналитической методики определения

t_R пика на хроматограмме раствора стандартного образца 4-гидроксибензойной кислоты, мин (А)	2,784
t_R пика на хроматограмме испытуемого раствора, мин (Б)	2,787
Отклонение t_R пика, %	0,11
Наличие пиков с t_R пика 4-гидроксибензойной кислоты на хроматограмме раствора СО	
На хроматограмме раствора «плацебо»	отсутствуют
На хроматограмме растворителя	отсутствуют

Чувствительность методики (минимальное определяемое количество).

Для определения нижнего предела детектирования необходимо оценить соотношение сигнал/шум. Для этого готовят серию растворов с 4-гидроксибензойной кислотой, начиная с 0,01 % рабочей концентрации; растворы хроматографируют в условиях, описанных в разделе «Продукты деградации метилпарагидроксибензоата». Рассчитывают отношение сигнал/шум.

Для концентрации, при которой отношение сигнал/шум $(S/N) \geq 10$, готовят пять растворов, хроматографируют, рассчитывают относительное стандартное отклонение (RSD) [42].

Критерий приемлемости

При соотношении сигнал-шум $(S/N) \geq 10$, концентрация образца равна пределу количественного определения при значении относительного стандартного отклонения $(RSD) \leq 5,0 \%$

Таблица 17- Определение порога чувствительности

№	Концентрация 4-гидроксибензойной кислоты, мкг/мл	Отношение сигнал/шум	Площадь пика	RSD, %	Концентрация, % относительно содержания основного вещества в испытуемом растворе
1	0,82	116,2	7003	1,29	0,05 %
2	0,82	113,7	6852		
3	0,82	115,0	6927		
4	0,82	114,6	6885		
5	0,82	113,4	6763		

Предел количественного определения (минимальная концентрация) 4-гидроксибензойной кислоты составил 0,82 мкг/мл при среднем значении относительного стандартного отклонения 1,29 %.

Прецизионность

Для оценки прецизионности аналитического метода важна оценка результатов не менее шести определений для образцов с содержанием определяемого вещества, близким к номинальному.

Шесть растворов стандартного образца 4-гидроксибензойной кислоты хроматографируют и обрабатывают результаты измерений, рассчитывая относительное стандартное отклонение (RSD) [48].

$$RSD(\%) = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n S_i^2 - n\bar{S}^2}{n-1}}}{\bar{S}} \times 100 \quad (22)$$

где,

n – объем выборки = 6 – для оценки повторяемости, 12 – для оценки внутрилабораторной прецизионности;

S – площадь пика 4-гидроксибензойной кислоты на хроматограмме раствора СО;

\bar{S} – средняя площадь пика 4-гидроксибензойной кислоты на хроматограмме раствора СО;

Σ – знак суммирования.

Критерии приемлемости

Повторяемость не должна выходить за рамки 5,0 %;

Внутрилабораторная прецизионность не должна превышать 10,0 %

Таблица 18 - Валидация прецизионности методики определения родственных примесей

№ раствора	Площадь пика 4-гидроксибензойной кислоты	
	Первый	Второй
1	507229	502145
2	506513	500449
3	501651	507394

4	505231	504149
5	502894	506447
6	504976	503697

Продолжение таблицы 18

Среднее значение	504976	504046
RSD _{n=6} , % (повторяемость)	044	051
RSD _{n=6} , % (внутрилабораторная прецизионность)	0,47	

Прецизионность соответствует требованиям.

Правильность, линейность и диапазон:

Готовят 5 модельных растворов по следующей методике:

Приготовление исходного раствора 4-гидроксибензойной кислоты № 1.

Соответствующие навески 4-гидроксибензойной кислоты, указанные в таблице ниже для раствора № 1, помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 140 мл растворителя, перемешивают на орбитальном шейкере 350 об/мин в течение 10 мин или обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Приготовление исходного раствора 4-гидроксибензойной кислоты № 2-7.

Соответствующие навески 4-гидроксибензойной кислоты, указанные в таблице ниже для раствора № 2-7, помещают в мерные колбы вместимостью 200 мл, прибавляют 140 мл растворителя, перемешивают на орбитальном шейкере 350 об/мин в течение 10 мин или обрабатывают ультразвуком в

течение 10 мин, доводят объем растворов растворителем до метки и перемешивают.

Приготовление модельных растворов.

Соответствующие навески смеси плацебо, указанные в таблице 19, помещают в мерные колбы вместимостью 10 мл, прибавляют 3 мл метанола, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, добавляют 1,0 мл соответствующего исходного раствора 4-гидроксibenзойной кислоты., доводят объемы растворов до метки метанолом [42].

Таблица 19 – Приготовление модельных растворов

№ раствора	4-гидроксibenзойная кислота, мг	Смесь плацебо, г	Концентрация раствора (X) в % от теоретической по проекту НД
1	16,4	5,5	0,05 (ПКО)
2	3,28	5,5	1,0
3	6,56	5,5	2,0
4	9,84	5,5	3,0
5	13,12	5,5	4,0
6	16,40	5,5	5,0
7	19,68	5,5	6,0

Хроматографируют полученные модельные растворы и раствор СО 4-гидроксibenзойной кислоты в условиях, описанных в разделе «Продукты деградации метилпарагидроксibenзоата».

Для оценки правильности определяют степень соответствия между известным истинным значением и значением, полученным по данной методике. Правильность методики определяем величиной отношения «найденного» к «введенному» [41-42].

$$\text{Правильность (\%)} = \frac{Y_i}{X_i} \times 100 \quad (23)$$

где,

Y_i – найдено в, мкг/мл;

X_i – введено, мкг/мл

$$Y_i = \frac{S_i \times a_0}{S_0 \times a_i} \times V \times 100 \quad (24)$$

S_i – площадь пика СО 4-гидроксибензойной кислоты на хроматограмме модельного раствора (для каждой из 5-и концентраций);

S_0 – площадь пика СО 4-гидроксибензойной кислоты на хроматограмме раствора СО 4-гидроксибензойной кислоты;

a_i – фактическая навеска 4-гидроксибензойной кислоты для приготовления модельного раствора, мг;

a_0 – фактическая навеска 4-гидроксибензойной кислоты для приготовления раствора сравнения, мг;

V – коэффициент, учитывающий концентрации и разведение растворов.

$$X_i = \frac{C_{\text{факт}}}{C_{\text{теор}}} \times 100 \quad (25)$$

где,

$C_{\text{факт}}$ – фактическая концентрация модельного раствора (для каждой из 5-и концентраций), мкг/мл;

$C_{\text{теор}}$ – теоретическая концентрация раствора СО 4-гидроксибензойной кислоты, мг/мл

В качестве критерия линейности рассчитывают значение квадрата коэффициента корреляции (r^2):

$$r^2 = \left(\frac{n \cdot \sum_1^n (x_i \times y_i) - \sum_1^n x_i \times \sum_1^n y_i}{\sqrt{\left[n \times \sum_1^n x_i^2 - \left(\sum_1^n x_i \right)^2 \right] \times \left[n \times \sum_1^n y_i^2 - \left(\sum_1^n y_i \right)^2 \right]}} \right)^2 \quad (26)$$

где,

n – объем выборки;

x_i – концентрация определяемого вещества в растворе;

y_i – экспериментально измеренное значение.

Критерии приемлемости

- Правильность должна находиться в пределах 97-103 %;
- Квадрат коэффициента линейной корреляции должен быть не менее 0,995.

Таблица 20 - Валидация правильности, линейности метода ВЭЖХ раздела «Продукты деградации метилпарагидроксибензоата»

Раствор №1	Раствор № 2	Раствор № 3	Раствор № 4	Раствор № 5	Раствор № 6	Раствор № 7
Площадь пика 4-гидроксibenзойной кислоты на хроматограмме раствора СО (S_0)						
505131						
Площадь пика 4-гидроксibenзойной кислоты на хроматограмме модельного раствора (S)						
5062	96747	203059	408554	302241	506254	597734
Навеска СО 4-гидроксibenзойной кислоты для приготовления раствора СО, мг (a)						
8,25						
Навеска СО 4-гидроксibenзойной кислоты для приготовления модельного раствора, мг (a_0)						
16,42	3,23	6,54	9,88	13,19	16,36	19,62

Концентрация модельного раствора в % от теоретической по НД, % (X)						
0,05	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0

Продолжение таблицы 20

Коэффициент, учитывающий концентрации и разведение модельных растворов (V)						
2	0,4	0,8	1,2	1,6	2	2,4
Введено, % (X)						
1,00	19,69	39,88	60,24	80,43	99,76	119,63
Найдено, % (Y)						
1,01	19,57	40,57	59,96	80,94	101,08	119,42
Правильность, %						
100,58	99,35	101,73	99,52	100,64	101,33	99,82
Линейность и диапазон						
Квадрат коэффициента линейной корреляции						
0,9998						

Правильность составила 99,35 – 101,73 %, что не выходит за пределы допустимого диапазона. Квадрат коэффициента линейной корреляции составил 0,9998, линейность подтверждена в рассматриваемом диапазоне.

Робастность

Готовят 3 раствора СО 4-гидроксibenзойной кислоты и 3 испытуемых раствора в соответствии с требованиями раздела НД «Продукты деградации метилпарагидроксibenзоата» [42].

Растворы проверяют после хранения при комнатной температуре в течение 8 часов.

Критерий приемлемости

В случае выполнения указанных ниже соотношений растворы считаются стабильными:

$$\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100 \leq 2,0 \%, \quad (27)$$

где,

S_i – площадь пика 4-гидроксibenзойной кислоты на хроматограмме испытуемого раствора (раствора СО) в i - момент времени;

$S_{нач}$ – площадь пика 4-гидроксibenзойной кислоты на хроматограмме испытуемого раствора (раствора СО) в начальный момент времени;

Таблица 21 - Стабильность растворов

№ раствора	Сразу после приготовления, ($S_{нач}$)	Через 8 часов, (S_i)	Разница в содержании $\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100, \%$
Раствор СО № 1	507229	506118	0,22 %
Раствор СО № 2	506513	507139	0,12 %
Раствор СО № 3	501651	502363	0,14 %
№ раствора	Сразу после приготовления, ($S_{нач}$)	Через 8 часов, (S_i)	Разница в содержании $\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100, \%$
Испытуемый раствор № 1	119333	120412	0,90 %
Испытуемый раствор № 2	120512	119864	0,54 %
Испытуемый раствор № 3	119164	118758	0,34 %

Растворы СО 4-гидроксibenзойной кислоты и испытуемые растворы выдерживают требования по стабильности в течение 8 часов [48].

3.3 Определение срока годности препарата методом «ускоренного старения»

Исследование стабильности препарата «Бромгексин раствор для приема внутрь 4 мг/5 мл» при хранении методом «ускоренного старения» в стеклянном флаконе из коричневого стекла. Испытание проводилось при температуре 40 °С (таблица 22).

Таблица 22 – Исследование стабильности

Серия	Срок хранения	Описание	pH	Плотность	Продукты деградации бромгексина	Продукты деградации метилпарагидроксибензоата	Извлекаемый объем	Количественное определение
		Бесцветная прозрачная или слабо опалесцирующая жидкость с характерным запахом	ГФ РФ Потенциометрический От 2,5 до 3,5	ГФ РФ метод 1 От 1,088 до 1,108 г/см ³ .	ВЭЖХ Любая единичная примесь – не более 0,5 %. Сумма примесей – не более 1,0 %.	ВЭЖХ 4-гидроксибензойная кислота – не более 5,0 %.	ГФ РФ, В соответствии с требованиями.	ВЭЖХ. Содержание C ₁₄ H ₂₀ Br ₂ N ₂ ·HCl (бромгексина гидрохлорида) в 5 мл препарата должно быть от 3,6 мг до 4,4 мг. ВЭЖХ. Содержание C ₈ H ₈ O ₃ (метилпарагидроксибензоата) в 5 мл препарата должно быть от 7,38 мг до 9,02 мг. ГХ. Содержание C ₂ H ₆ O (этанола 95 %) в 5 мл препарата должно быть от 127,5 мг до 172,5 мг.
1	2	3	4	5	6	7	8	9
010717	29.07.17	Соотв.	3,2	1,091г/	0,02%;	1,29 %	60 мл	3,97 мг; 8,43 мг; 152,21 мг
	13.09.17 46 сут	Соотв.	3,1	1,100г/ см ³	0,15%; 0,47%	1,30 %	-	3,96 мг; 8,42 мг; 151,67 мг

	29.10.17 92 сут	Соотв.	3,3	1,096г/ см ³	0,18%; 0,52%	1,78 %	-	3,94 мг; 8,41 мг; 151,57 мг
	14.12.17 138 сут	Соотв.	3,4	1,095г/ см ³	0,23%; 0,67%	2,62 %	-	3,94 мг; 8,41 мг; 151,51 мг

Продолжение таблицы 22

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	29.01.18	Соотв.	3,2	1,099г/	0,29%;	2,79 %	-	3,93 мг; 8,41 мг; 151,13 мг
	16.03.18 230 сут	Соотв.	3,1	1,094г/ см ³	0,31%; 0,69%	3,61 %	-	3,92 мг; 8,37 мг; 150,12 мг
	01.05.18 276 сут	Соотв.	3,3	1,092г/ см ³	0,32%; 0,75%	3,85 %	60 мл	3,90 мг; 8,37 мг; 149,57 мг
020717	30.07.17	Соотв.	3,2	1,097г/	0,01%;	1,32 %	60 мл	3,99 мг; 8,41 мг; 152,12 мг
	14.09.17 46 сут	Соотв.	3,2	1,099г/ см ³	0,24%; 0,51%	1,51 %	-	3,96 мг; 8,41 мг; 151,35 мг
	30.10.17 92 сут	Соотв.	3,1	1,100г/ см ³	0,26%; 0,61%	1,57 %	-	3,96 мг; 8,40 мг; 149,37 мг
	15.12.17 138 сут	Соотв.	3,3	1,092г/ см ³	0,30%; 0,61%	2,04 %	-	3,92 мг; 8,40 мг; 149,31 мг
	30.01.18 184 сут	Соотв.	3,1	1,101г/ см ³	0,34%; 0,68%	2,32 %	-	3,91 мг; 8,40 мг; 149,15 мг
	17.03.18 230 сут	Соотв.	3,4	1,095г/ см ³	0,35%; 0,69%	3,66 %	-	3,91 мг; 8,38 мг; 149,11 мг
	02.05.18 276 сут	Соотв.	3,2	1,100г/ см ³	0,41%; 0,79%	3,92 %	60 мл	3,90 мг; 8,37 мг; 148,67 мг
030717	31.07.17 0 сут	Соотв.	3,2	1,100г/ см ³	0,04%; 0,42%	1,63 %	60 мл	3,99 мг; 8,43 мг; 152,18 мг
	15.09.17 46 сут	Соотв.	3,0	1,095г/ см ³	0,10%; 0,47%	2,01 %	-	3,98 мг; 8,42 мг; 152,03 мг
	31.10.17 92 сут	Соотв.	3,4	1,095г/ см ³	0,13%; 0,60%	2,24 %	-	3,96 мг; 8,42 мг; 150,61 мг
	16.12.17 138 сут	Соотв.	3,3	1,095г/ см ³	0,18%; 0,71%	2,42 %	-	3,93 мг; 8,41 мг; 148,84 мг
	31.01.18 184 сут	Соотв.	3,2	1,092г/ см ³	0,23%; 0,71%	3,16 %	-	3,91 мг; 8,41 мг; 148,73 мг
	18.03.18 230 сут	Соотв.	3,0	1,092г/ см ³	0,28%; 0,72%	3,25 %	-	3,91 мг; 8,40 мг; 148,69 мг
	03.05.18	Соотв.	3,1	1,096г/	0,41%;	3,32 %	60 мл	3,91 мг; 8,38 мг; 148,68 мг

Исследование стабильности препарата «Бромгексин раствор для приема внутрь 4 мг/5 мл» при хранении методом «ускоренного старения» во

флаконе из полиэтилентерефталата. Испытание проводилось при температуре 40 °С (таблица 23).

Таблица 23 – Исследование стабильности

Серия	Срок хранения	Описание	рН	Плотность	Продукты деградации бромгексина	Продукты деградации метилпарагидроксибензоата	Извлекаемый объем	Количественное определение
		Бесцветная прозрачная или слабо опалесцирующая жидкость с характерным запахом	ГФ РФ Потенциометрический От 2,5 до 3,5	ГФ РФ метод 1 От 1,088 до 1,108 г/см ³ .	ВЭЖХ Любая единичная примесь – не более 0,5 %. Сумма примесей – не более 1,0 %.	ВЭЖХ 4-гидроксибензойная кислота – не более 5,0 %.	ГФ РФ, В соответствии с требованиями.	<p>ВЭЖХ. Содержание C₁₄H₂₀Br₂N₂·HCl (бромгексина гидрохлорида) в 5 мл препарата должно быть от 3,6 мг до 4,4 мг.</p> <p>ВЭЖХ. Содержание C₈H₈O₃ (метилпарагидроксибензоата) в 5 мл препарата должно быть от 7,38 мг до 9,02 мг.</p> <p>ГХ. Содержание C₂H₆O (этанола 95 %) в 5 мл препарата должно быть от 127,5 мг до 172,5 мг.</p>
040717	01.08.17 0 сут	Соотв	3,2	1,092г/см ³	0,11%; 0,44%	1,82%	60 мл	4,00 мг; 8,42 мг; 152,04 мг
	16.09.17 46 сут	Соотв	3,1	1,091г/см ³	0,13%; 0,52%	1,89%	-	3,99 мг; 8,41 мг; 151,70 мг
	01.11.17 92 сут	Соотв	3,2	1,094г/см ³	0,19%; 0,52%	2,79%	-	3,99 мг; 8,40 мг; 151,15 мг
	17.12.17 138 сут	Соотв	3,2	1,093г/см ³	0,22%; 0,55%	2,88%	-	3,98 мг; 8,40 мг; 149,51 мг
	01.02.18 184 сут	Соотв	3,1	1,100г/см ³	0,31%; 0,71%	3,39%	-	3,98 мг; 8,40 мг; 149,44 мг
	19.03.18 230 сут	Соотв	3,0	1,091г/см ³	0,37%; 0,77%	3,54%	-	3,97 мг; 8,39 мг; 149,44 мг
	04.05.18 276 сут	Соотв	3,3	1,098г/см ³	0,42%; 0,79%	3,59%	60 мл	3,94 мг; 8,39 мг; 148,82 мг
050717	02.08.17 0 сут	Соотв	3,2	1,092г/см ³	0,09%; 0,41%	1,27%	60 мл	4,00 мг; 8,43 мг; 151,80 мг
	17.09.17 46 сут	Соотв	3,1	1,094г/см ³	0,11%; 0,50%	1,46%	-	3,97 мг; 8,43 мг; 150,32 мг

	02.11.17 92 сут	Соотв	3,1	1,097г/ см ³	0,11%; 0,51%	2,91%	-	3,96 мг; 8,42 мг; 149,94 мг
	18.12.17 138 сут	Соотв	3,1	1,100г/ см ³	0,19%; 0,57%	3,90%	-	3,95 мг; 8,41 мг; 149,69 мг
	02.02.18 184 сут	Соотв	3,3	1,093г/ см ³	0,24%; 0,59%	4,13%	-	3,93 мг; 8,41 мг; 149,36 мг
	20.03.18 230 сут	Соотв	3,2	1,099г/ см ³	0,36%; 0,64%	4,55%	-	3,92 мг; 8,38 мг; 149,27 мг

Продолжение таблицы 23

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	05.05.18 276 сут	Соотв	3,3	1,093г/ см ³	0,41%; 0,79%	4,69%	60 мл	3,91 мг; 8,37 мг; 149,15 мг
060717	03.08.17 0 сут	Соотв	3,3	1,100г/ см ³	0,07%; 0,44%	2,12%	60 мл	4,00 мг; 8,43 мг; 152,09 мг
	18.09.17 46 сут	Соотв	3,1	1,101г/ см ³	0,09%; 0,57%	2,18%	-	4,00 мг; 8,43 мг; 151,92 мг
	03.11.17 92 сут	Соотв	3,0	1,094г/ см ³	0,14%; 0,63%	2,61%	-	3,99 мг; 8,41 мг; 151,77 мг
	19.12.17 138 сут	Соотв	3,3	1,101г/ см ³	0,24%; 0,63%	2,61%	-	3,97 мг; 8,40 мг; 151,50 мг
	03.02.18 184 сут	Соотв	3,4	1,092г/ см ³	0,28%; 0,71%	2,68%	-	3,95 мг; 8,40 мг; 149,57 мг
	21.03.18 230 сут	Соотв	3,1	1,094г/ см ³	0,39%; 0,72%	3,30%	-	3,95 мг; 8,38 мг; 149,01 мг
	06.05.18 276 сут	Соотв	3,3	1,096г/ см ³	0,42%; 0,82%	3,90%	60 мл	3,94 мг; 8,37 мг; 148,66 мг

Результаты экспериментального срока хранения препарата «Бромгексин раствор для приема внутрь 4 мг/5 мл» при хранении во флаконе стеклянном из коричневого стекла.

Экспериментальный срок годности при 40 °С – 276 сут (κ=4)
Серия 010717

$$\frac{276 \times 4}{365} = 3 \text{ (года)} \quad (28)$$

Серия 020717

$$\frac{276 \times 4}{365} = 3 \text{ (года)} \quad (29)$$

Серия 030717

$$\frac{276 \times 4}{365} = 3 \text{ (года)} \quad (30)$$

Результаты экспериментального срока хранения препарата «Бромгексин раствор для приема внутрь 4 мг/5 мл» при хранении во флаконе из полиэтилентерефталата.

Экспериментальный срок годности при 40 °С – 276 сут (к=4)

Серия 040717

$$\frac{276 \times 4}{365} = 3 \text{ (года)} \quad (31)$$

Серия 050717

$$\frac{276 \times 4}{365} = 3 \text{ (года)} \quad (32)$$

Серия 060717

$$\frac{276 \times 4}{365} = 3 \text{ (года)} \quad (33)$$

Экспериментально найденный срок годности препаратов: «Бромгексин раствор для приема внутрь 4 мг/5 мл» во флаконе стеклянном из коричневого стекла – 3 года «Бромгексин раствор для приема внутрь 4 мг/5 мл» во флаконе из полиэтилентерефталата – 3 года.

Выводы по разделу 3

1. Проведена валидация методик определения родственных примесей препарата Бромгексин раствор 4мг/5мл.

2. Изучена стабильность препарата методом ускоренного старения.

Заключение

1. Проведен детальный литературный обзор существующих методик анализа препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5 мл»;
2. Изучена технология производства активной фармацевтической субстанции и технология производства препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5 мл»;
3. В ходе стресс-тестирования в исследуемом препарате, помимо основных примесей, была обнаружена примесь деградации метилпарабена, которая не была описана ни в одной фармакопейной статье;
4. Разработаны новые условия хроматографического исследования препарата. При анализе препарата согласно разработанным хроматографическим условиям удалось добиться большей эффективности, увеличить разрешение;
5. В ходе исследования препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5 мл» были идентифицированы примеси;
6. Методика определения родственных примесей препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5 мл», была модифицирована. В результате модификации она была разделена на две части «Продукты деградации бромгексина» и «Продукты деградации метилпарагидроксибензоата»;
7. Проведен расчёт примесей в лекарственном препарате, как в свежих пробах, так и в искусственно состаренных вплоть до серий, у которых вышел срок годности. Все серии препарата соответствуют требованиям спецификации;
8. Модифицированная методика прошла полную процедуру валидации;
9. Методика будет использоваться для контроля качества препарата «Бромгексин раствор 4 мг/5 мл» на фармацевтическом предприятии «Озон», что позволит возобновить производство данного препарата на площадках предприятия.

Список используемых источников

1. Бромгексин (Bromhexine) / Регистр лекарственных средств России. Информация для медицинских специалистов [сайт]. – URL: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1338.htm (дата обращения 30.03.2020).
2. ФС.2.1.0009.15 Бромгексина гидрохлорид / Фармакопей.рф [сайт]. – URL: <https://pharmacopoeia.ru/fs-2-1-0009-15-bromgeksina-gidrohlorid/> (дата обращения 30.03.2020).
3. Sehgal S., Mohan M. Bromhexine // Indian pediatrics. – 1990. – No 27 (5). – P. 479-483.
4. 8. Zanasi A., Mazzolini M., Kantar A. A reappraisal of the mucosactive activity and clinical efficacy of bromhexine // Multidisciplinary Respiratory Medicine. – 2017. – No 7.
5. Padrid P., Church D. B. Drugs used in the management of respiratory diseases // Small Animal Clinical Pharmacology. – 2008. –P. 458-468.
6. Клиническая фармакология: учеб. пособие / М. К. Кевра [и др.] ; под ред. проф. М. К. Кевры. – Минск: Вышэйшая школа, 2015. – 574 с.
7. 15. Wang L., Yu L., Li N., Wang Y., Yang M., Peng Y., Guo H., Ye L. Bromhexine elevates REP2 expression to stimulate secretion from human primary conjunctiva fornix epithelial cells // FEBS Letters. – 2020. – 594 (1). – P. 153-160.
8. Бромгексина гидрохлорид. Фармакопейная статья. – URL: <https://www.rosminzdrav.ru/> (дата обращения 03.04.2020).
9. Brelvi S. A. Bromhexine hydrochloride // Ven petrochem & Pharma. – 2016.
10. Промышленный регламент на производство Бромгексин раствор для приема внутрь 4 мг/5мл ПР 11025316. – Жигулевск: ООО «Озон», 2017. – 73 с.
11. ICH Topic Q 3 B (R2). Impurities in new drug products, 2006. – 14 p.

12. ICH Harmonised tripartite Guideline. Impurities in new drug substances Q3A (R2), 2006. – 11 p.
13. Ekins S. Progress in computational toxicology / S. Ekins // J. Pharm. Toxicol. Methods. – 2014. – V. 69. – P.115–140.
14. Fowler B. Computational Toxicology: methods and applications for risk assessment / B. Fowler. – Academic Press, 2013. – 274 p.
15. Computational Systems Toxicology; Edited by J. Hoeng, M. C. Peitsch. – Academic Press, 2015. – 436 p.
16. Золотов Ю. А. История и методология аналитической химии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю. А. Золотов, В. И. Вершинин. – Москва : Издательский центр «Академия», 2007. – 464 с
17. Boyd R. Trace Quantitative Analysis by Mass Spectrometry / R. Boyd, C. Basic, R. Bethem. – Wiley & Sons, 2008. – 735 p.
18. ICH Harmonised tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). – 2005. – 13 p.
19. Konieczka P. Quality Assurance and quality control in the analytical chemical laboratory: a Practical Approach / P. Konieczka, J. Namiesnik. – CRC Press, 2009. – 232 p.
20. Annex 7 WHO guidelines on transfer of technology in pharmaceutical manufacturing. WHO Technical Report Series. – 2011. – № 961. – P. 285–309.
21. Волков М. Ю., Заболоцкая А. А. Применение метода ускоренного старения для установления сроков годности // Биотехнология. - 2011. - №1. - С. 7-10.
22. Новый порядок установления сроков годности лекарственных средств // Ремедиум, 1999, № 12 С. 66-67.
23. Мешковский А. П. Испытание стабильности и установление сроков годности лекарственных препаратов // Фарматека, 2000, № 2 С.25-
24. Regional Guideline For the WHO Eastern Mediterranean Region. Suitability Testing of Active Substances and Pharmaceutical products, 19 April 2006. In: Working document QAS/05.179.

25. Suitability of drug dosage forms. WHO TRS 790, Geneva, 1990
26. Suitability Testing of New Drug Substances and Products. Q1A. ICH, 2003.
27. Емшанова С. В., Потанина О. Г., Буданова Е. В., Чистяков В. В. ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАКОПЕЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ. - XIV изд. - М.: 2018. - 1815 с.
28. Спутник хроматографиста / Рудаков, Востров, Федоров, Филиппов, Селеменев, Приданцев, Приданцев А. А. и др.; под ред. Селеменев В. Ф. - Воронеж: Водолей, 2004. - 528 с.
29. Винарский В. А. Хроматография [Электронный ресурс]. Курс лекций в двух частях. Часть 1. Газовая хроматография. - — Электрон. текст. дан. (4,1 Мб). — Мн.: Научно-методический центр “Электронная книга БГУ”, 2003.
30. Практическое руководство по влиянию чистоты воды на ВЭЖХ, ЖК, МС и смежные методы. – 52 с. [электронный ресурс]. – URL: https://www.reatorg.ru/upload/iblock/a79/Merck-Millipore_Vliyanie-chistoty-vody-na-VEZHKN_ZHKN_MS-i-smezhnye-metody.pdf (дата обращения 30.03.2020).
31. Илларионова Е. А., Сыроватский И. П. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Теоретические основы метода: учебное пособие. - ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, Кафедра фармацевтической и токсикологической химии. – Иркутск: ИГМУ, 2018. – 50 с.
32. International Conference on Harmonization (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH, Q2(R1) (2005).
33. Европейская фармакопея. Том 1. - М.: Ремедиум, 2011. - 220 с.
34. Эпштейн Н. А., Емшанова С. В. О требованиях к пригодности хроматографической системы при контроле качества лекарственных субстанций и препаратов методом ВЭЖХ // химико - фармацевтический журнал. - 2018. - №11. - С. 34-40.

35. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации / Под ред.: Юргеля Н. В., Младенцева А. Л., Бурдейна А. В. и др. - М.: изд. «Спорт и Культура - 2000», 2007. 192 с.

36. ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик. /Общая фармакопейная статья. 2015. 13 с.

37. Руководство для предприятий фармацевтической промышленности: методические рекомендации / Под ред.: Юргеля Н. В., Младенцева А. Л., Бурдейна А. В. и др. - М.: изд. «Спорт и Культура - 2000», 2007. 192 с.

38. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. ВЭЖХ, ТСХ, титрование и ГЖХ. Обоснование референтных стандартов. Тесты пригодности системы, перенос методов, ревалидация. Перевод выполнен Ж. И. Аладышевой, О. Р. Спицким. М.: Научная редакция В.В. Береговых, 2008. 132 с.

39. МИ 2336-2002. Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки. М.: ИПК Издательство стандартов, 2002. 58 с.

40. Береговых В. В. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. - М.: Литтерра, 2008. - 132 с.

41. Стукалова Э. А., Филоненко А. Д., Григорьева О. Б. Продукты деградации фармацевтического препарата бромгексин // Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования сборник статей по материалам XXXIV международной научно-практической конференции. - М.: Интернаука, 2020. - С. 77-84.

42. Чухутина О. А. Разработка и валидация методики определения содержания родственных примесей в лекарственном препарате азитромицин // Евразийский союз ученых. - 2020. - № 1-1 (70). - С. 66-74.

43. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Под ред. Береговых В.В. Москва, 2008 - 132 с.

44. Аладышева Ж.И., Береговых В.В., Мешковский А.П. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве. Москва, 2005

Приложение А

Хроматограммы к валидации

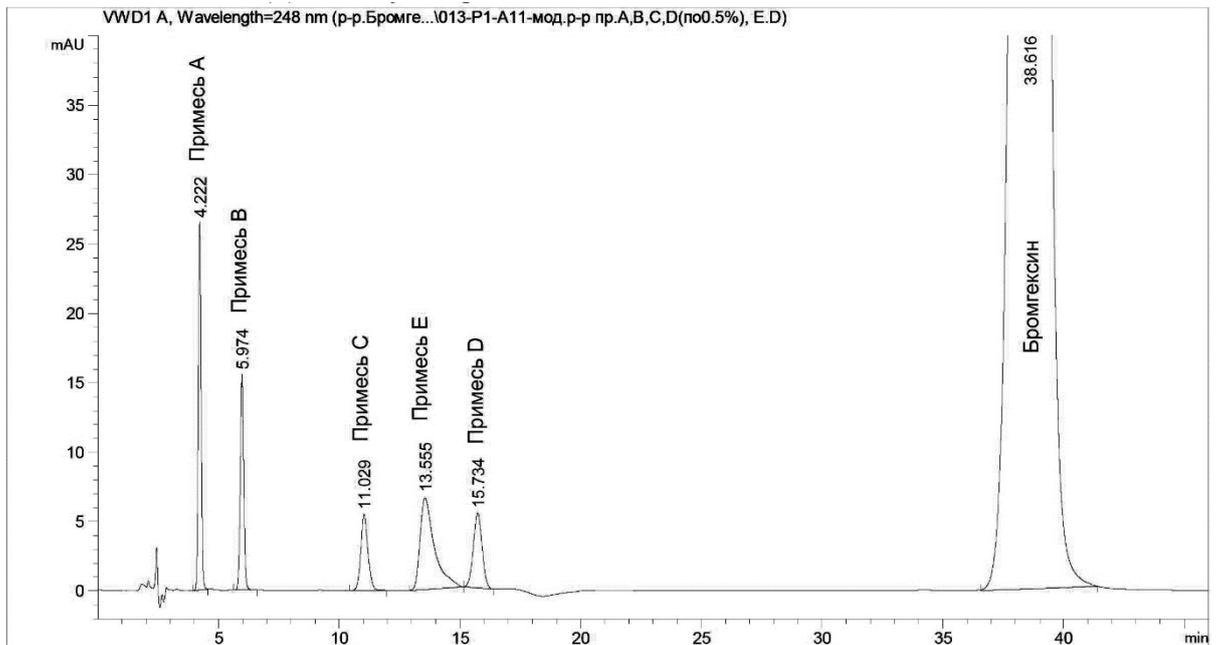
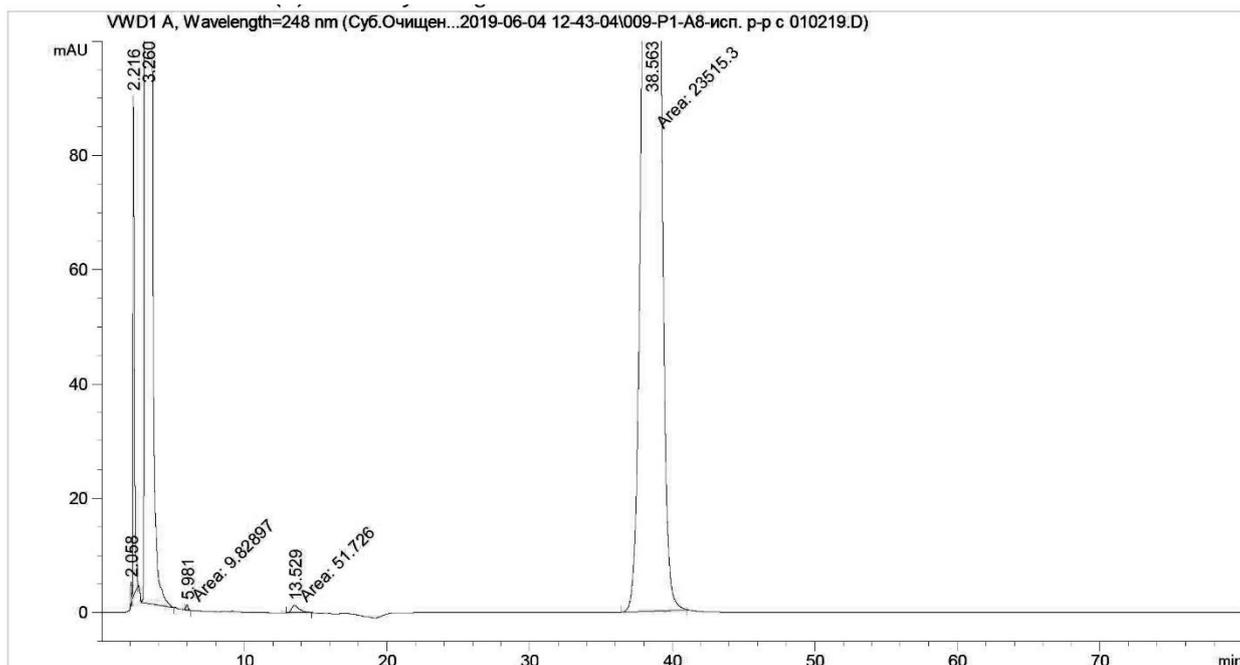


Рисунок А.1 - Хроматограмма модельной смеси примесей бромгексина (содержащий примеси А, В, С, Д (0,5 %), Е (1%))

Продолжение Приложения А



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=248 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.058	BB	0.0704	17.23964	3.91064	0.0175
2	2.216	BV R	0.0974	626.58167	87.66335	0.6361
3	3.260	VB R	0.2896	7.42839e4	3678.78882	75.4116

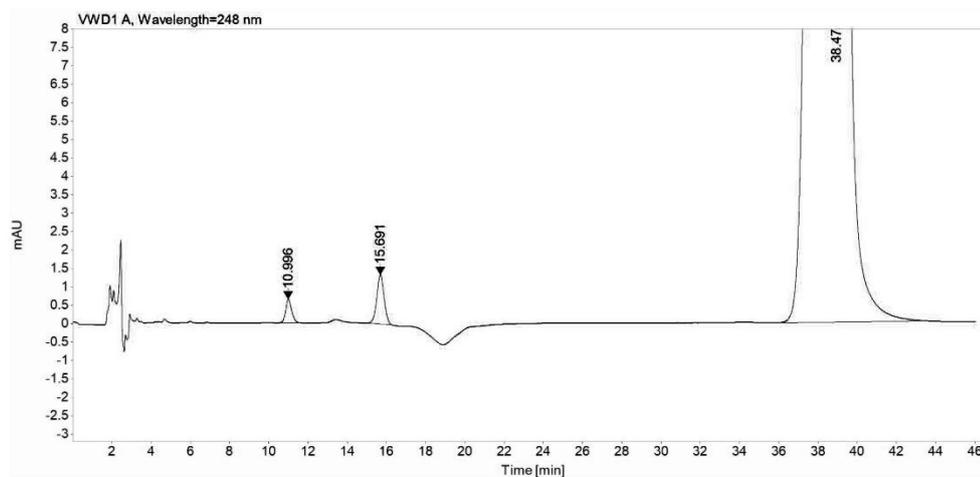
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
4	5.981	MM	0.1731	9.82897	9.46162e-1	9.978e-3
5	13.529	MM	0.6480	51.72597	1.33032	0.0525
6	38.563	MM	1.0697	2.35153e4	366.39578	23.8723

Totals : 9.85045e4 4139.03508

Рисунок А.2 – Испытуемый раствор

Продолжение Приложения А

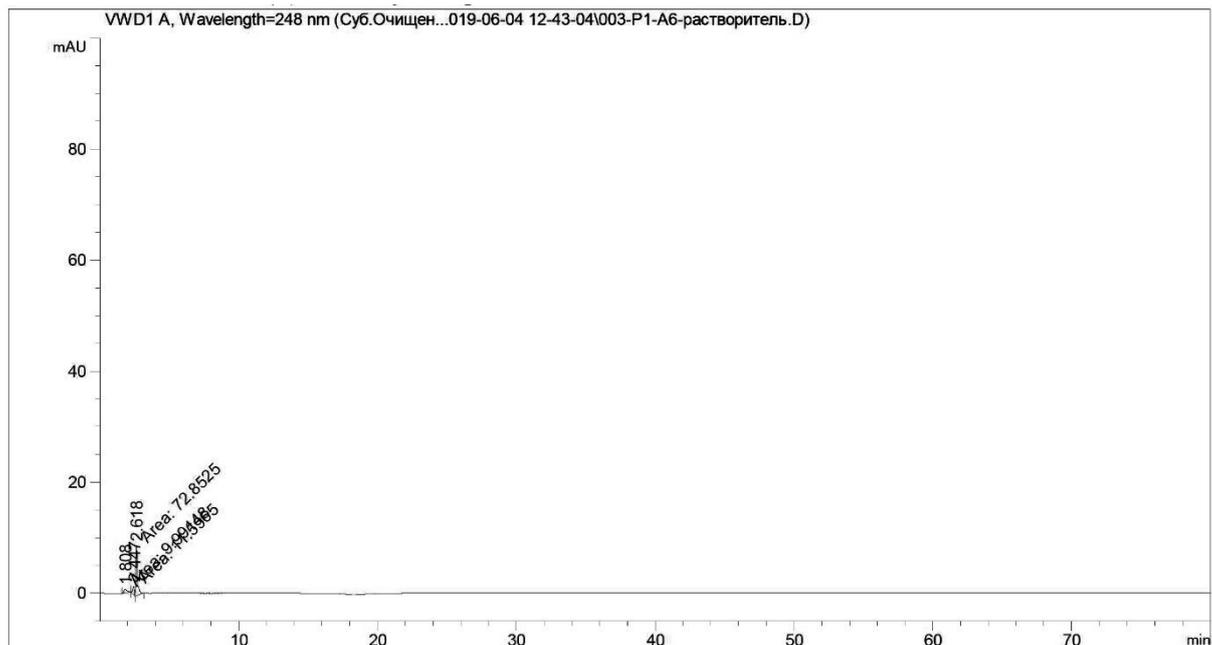
Sample name: p-p ППХС
Injection date: 6/4/2019 11:50:43 AM



Sample Name	RT	Area	Area, %	Height	Разрешение	Эффективность (Т.Т.)	Асимметрия
p-p ППХС	11.00	13.41	0.1	0.6		6824.3	1.15
p-p ППХС	15.69	34.68	0.2	1.3	7.84	8815.8	0.95
p-p ППХС	38.47	22778.36	99.8	352.0	19.46	8404.1	0.99
		Average	7608.82				
		RSD	172.66				

Рисунок А.3 – Хроматограмма для пригодности хроматографической системы

Продолжение Приложения А



=====
 Area Percent Report
 =====

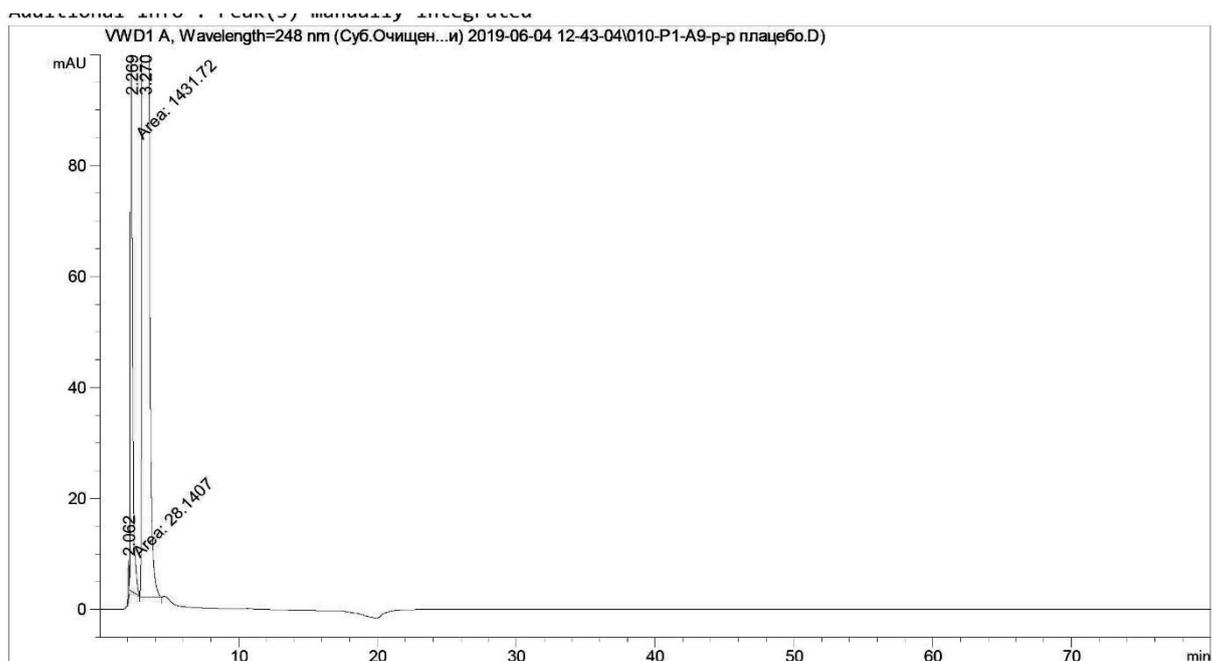
Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=248 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.808	MM	0.2557	9.99148	6.51213e-1	10.5796
2	2.447	MM	0.1183	11.59654	1.63440	12.2792
3	2.618	MM	0.1338	72.85254	9.07282	77.1412

Рисунок А.4 – Хроматограмма растворителя

Продолжение Приложения А



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=248 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.062	MM	0.0705	28.14066	6.65632	0.0395
2	2.269	MM	0.1634	1431.72095	146.05609	2.0079
3	3.270	BB	0.2682	6.98445e4	3734.25635	97.9526

Рисунок А.5 – Хроматограмма раствора «плацебо»

Продолжение Приложения А

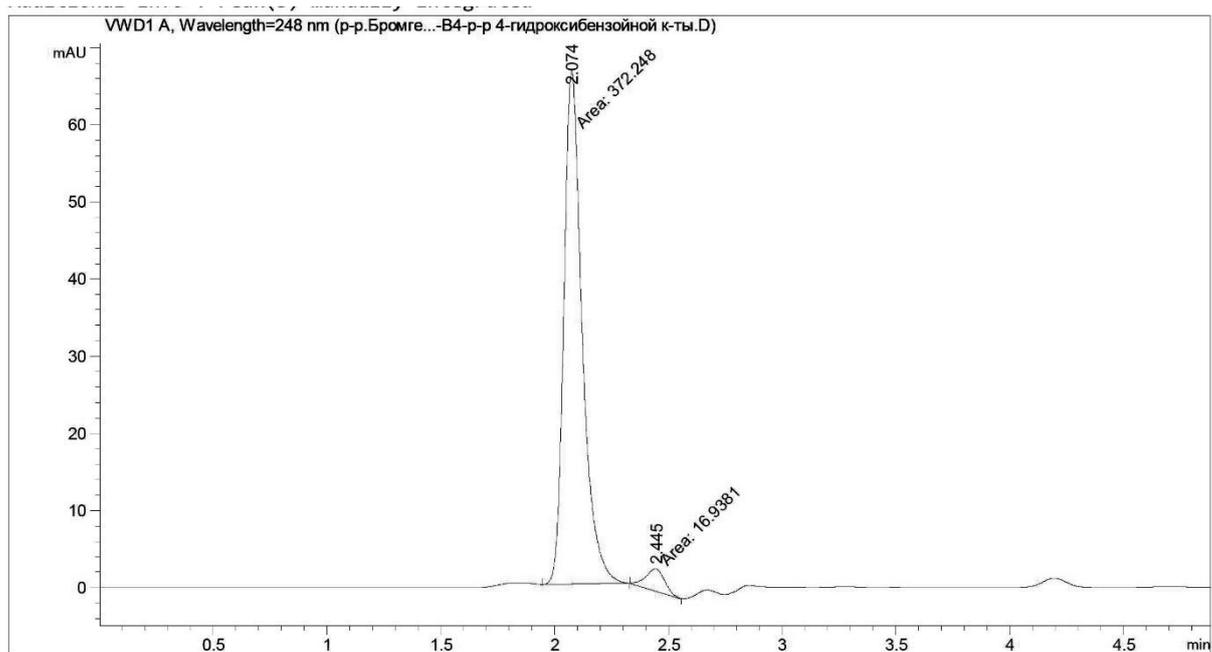


Рисунок А.6 – Хроматограмма 4-гидроксибензойной кислоты