

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 контроля качества лекарственного препарата
«Азитромицин капсулы 250 мг»

Студент

О.А. Чухутина

(И.О. Фамилия)

_____ (личная подпись)

Научный
руководитель

к.т.н., доцент О.С. Авдякова

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

Тольятти 2020

Содержание

| | |
|---|----|
| Введение..... | 4 |
| 1 Теоретическая часть..... | 9 |
| 1.1 Азитромицин, история и свойства..... | 9 |
| 1.2 Методы контроля качества лекарственного препарата «Азитромицин капсулы 250 мг» производителя ООО «ОЗОН» | 12 |
| 2 Экспериментальная часть..... | 28 |
| 2.1 Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии | 28 |
| 2.2 Валидация аналитических методик..... | 30 |
| 2.2.1. Описание объекта валидации | 30 |
| 2.2.2 Этап 1. Приготовление смеси плацебо | 34 |
| 2.2.3 Этап 2. Валидация аналитической методики разделов «Подлинность», «Количественное определение» | 34 |
| 2.2.4 Этап 3. Валидация аналитической методики раздела «Растворение»..... | 46 |
| 2.2.5 Этап 4. Валидация аналитической методики определения родственных примесей методом ВЭЖХ..... | 57 |
| 3 Технологическая часть | 77 |
| 3.1 Технология производства лекарственного препарата «Азитромицин капсулы 250 мг» производителя ООО «ОЗОН». | 77 |
| 3.1.1 Развешивание сырья | 77 |
| 3.1.2 Сушка крахмала | 77 |
| 3.1.3 Калибровка АФС..... | 79 |
| 3.1.4 Смешение..... | 79 |
| 3.1.5 Смешение и опудривание..... | 79 |
| 3.1.6 Капсулирование и обеспыливание | 80 |
| 3.1.7 Фасовка капсул в контурную ячейковую упаковку | 81 |

| | |
|---|----|
| 3.1.8 Фасовка капсул в банки из полиэтилентерефталата | 83 |
| 3.1.9 Упаковка в пачки и гофроящики | 84 |
| Заключение | 89 |
| Список используемой литературы и используемых источников..... | 90 |

Введение

Актуальность и научная значимость настоящего исследования

Для обеспечения фармацевтической безопасности России согласно номенклатуре особо значимых фармацевтических средств и вакцин в ближайшие годы Российская Федерация должна увеличить производство медицинских препаратов-джейнериков на 70-80% [1-5].

Азитромицин является полусинтетическим антибиотиком и включен в список лекарственных препаратов, жизненно значимых для человека, основанный Всемирной организацией здравоохранения. В 2005 году патент компании Pfliva на право безраздельно владеть новым антибиотиком закончился, и у множества других фармацевтических предприятий появилась заманчивая перспектива начать выпуск джейнерического Азитромицина. Рынок тотчас заполнился десятками джейнериков Азитромицина, которые стали приемлемы практически всем.

Актуальная задача фармацевтических компаний - производить лекарственный препарат, который эффективен и безопасен в использовании, обладает высокой конкурентоспособностью за счет своего высокого качества. Контролю качества лекарственных средств придается самое серьезное значение во всем мире, так как речь идет о жизни и здоровье миллионов людей. В отличие от других видов товаров, к качеству лекарственного средства неприменимо понятие сортности, они все должны быть только высокого качества. В связи с этим к качеству лекарственных средств предъявляются повышенные требования, которые должны обеспечиваться строгим соблюдением технологии и условий производственного процесса.

Под качеством лекарственных средств подразумевается соответствие промышленно производимых серий лекарственных препаратов и разработанного, утвержденного и зарегистрированного образца (стандарта) лекарственного препарата по визуальным, физическим, химическим и

биологическим показателям [6].

Решение задачи повышения качества и конкурентоспособности препарата Азитромицин является научно значимым, так как подобные исследования не проводились.

Объект исследования: контроль качества лекарственного препарата Азитромицин капсулы с дозировкой 250 мг.

Предмет исследования: методика контроля качества лекарственного препарата Азитромицин капсулы 250 мг.

Цель исследования: актуализация методов контроля качества лекарственного препарата Азитромицин капсулы 250 мг.

Гипотеза исследования состоит в том, что применяемые в настоящее время методы контроля качества препарата Азитромицин имеют целый ряд недостатков, в то время как существуют другие аналитические методы, например, высокоэффективная жидкостная хроматография. Высокоэффективная жидкостная хроматография является одним из самых эффективных методов разделения и анализа сложных смесей. Замена применяемых методов контроля на более эффективные позволит ужесточить контроль за качеством и облегчить процедуру проведения анализов.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- подобрать эффективную замену методов контроля лекарственного препарата, используемых в производстве (тонкослойная хроматография, спектрофотометрический, титриметрический),
- доказать эффективность и точность предлагаемого метода,
- повысить контроль качества лекарственного препарата Азитромицин капсулы дозировка 250 мг.

Теоретико-методологическую основу исследования составили научные статьи, методическая литература, нормативные документы, общие фармакопейные статьи, Государственная фармакопея Российской Федерации.

Базовыми для настоящего исследования явились также:

- технология производства лекарственного препарата «Азитромицин капсулы 250 мг» производителя ООО «ОЗОН»,
- методы контроля качества лекарственного препарата «Азитромицин капсулы 250 мг» производителя ООО «ОЗОН».

Методы исследования:

В процессе выполнения работы проводилась оценка качества готовой продукции аналитическими методами анализа: тонкослойная хроматография, спектрофотометрия, титриметрический анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Были проведены эксперименты по изменению технологического процесса производства лекарственного препарата Азитромицин на базе предприятия ООО «ОЗОН».

Основной метод исследования – валидация предлагаемой аналитической методики, включающая следующие разделы: «Описание», «Подлинность», «Растворение», «Родственные примеси», «Вода», «Микробиологическая чистота», «Однородность дозирования», «Количественное определение», «Упаковка», «Маркировка», «Хранение», «Срок годности».

Опытно-экспериментальная база исследования - производство препарата Азитромицин на ООО «ОЗОН», лаборатория по контролю качества ООО «ОЗОН», жидкостный хроматограф Waters “Alliance” № 1 № C1287E184A.

Научная новизна исследования заключается

- в выборе и освоении метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для контроля качества препарата Азитромицин;
- в изучении влияния технологических параметров на качество препарата Азитромицин и выбор оптимальных условий для стадии сушки.

Теоретическая значимость исследования заключается в доказательстве возможности идентифицирования в препарате Азитромицин 15 видов родственных примесей, определения любой неидентифицированной примеси, а также суммы примесей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, тогда как метод тонкослойной хроматографии позволяет определять только 4 показателя по содержанию неидентифицированных примесей.

Практическая значимость исследования

Актуализация методики с применением высокоэффективного жидкостного хроматографа для проведения анализов лекарственного препарата Азитромицин дает возможность более точно определить показатели качества препарата на базе ООО «ОЗОН», что послужит улучшению качества препарата и, как следствие, повышению его конкурентоспособности.

Достоверность и обоснованность результатов исследования обеспечивались:

- применением действующих стандартов проведения валидации аналитической методики ;
- использованием поверенного лабораторного оборудования;
- испытанием современного хроматографа Waters “Alliance”.

Личное участие автора состоит:

- в сборе, анализе и упорядочивании информации, касающейся темы диссертации;
- непосредственное проведение аналитических определений качества препарата Азитромицин различными методами;
- организации и проведении исследований по валидации метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для контроля качества препарата Азитромицин;

- постановке и проведении экспериментов по влиянию технологических параметров производства препарата на его качество;
- обобщении результатов исследования и написании диссертации.

Апробация и внедрение результатов работы велись в течение всего исследования. Его результаты докладывались на Научно-практической конференции «Студенческие дни науки в ТГУ», секция «Химическая технология и ресурсосбережение», апрель 2020.

На защиту выносятся:

1. Результаты актуализации методики высокоэффективной жидкостной хроматографии для проведения анализов лекарственного препарата Азитромицин.

2. Предложения по оптимизации стадии сушки при производстве лекарственного препарата Азитромицин на предприятии ООО «ОЗОН».

Структура магистерской диссертации. Работа состоит из введения, 3 разделов, заключения, содержит 33 таблицы, 1 рисунок, список использованной литературы (38 источников). Основной текст работы изложен на 93 странице.

1 Теоретическая часть

1.1 Азитромицин, история и свойства

Азитромицин впервые синтезирован в 1980 году известной хорватской фармацевтической компанией Pliva. Стоит отметить, что основанная в 1921 года компания Pliva занималась в большей степени выпуском джейнерических фармацевтических препаратов и с самого основания не смогла стать известным ни одним инновационным открытием в фармацевтической сфере. И только 1980 г был сделан «шаг вперед», который прославил неизвестную фирму, превратив ее название всеобщий известный бренд. Состав ученых под руководством доктора Слободана Докик: Габриела Кобрехай, Горяна Радоболья-Лазаревски и Зринки Тамбурашевой сделали открытие нового антибактериального препарата, который получил название Азитромицин.

«Компания в 1981 году на применения Азитромицина получила патент, и 1986 году фирма Pliva с одной из главных фармацевтических компаний планеты Pfizer заключила значимый договор о передаче прав на продажу инновационного антибиотика в Америке и Западной Европе. Фирма Pliva оставила за собой право продажи не в Восточной и Центральной Европе и под брендом Сумамед в 1988 году выпустила первый оригинальный Азитромицин. В 1991 году компания Pfizer выпустила препарат под названием Зитромакс на территории США и Западной Европы. Азитромицин в 2010 году стал самым выписываемым антибиотиком в США. Интересные данные о его популярности пришли из Швеции: в то время как макролиды всего в 3% случае рекомендуются, Азитромицин по употребляемости получил третье место среди используемых антибактериальных средств, применяемых в амбулаторных условиях.

Азитромицин был добавлен в список лекарственных препаратов, жизненно значимых для человека, основанной Всемирной организацией здравоохранения. В 2005 году патент компании Pliva на право безраздельно владеть новым антибиотиком закончился, и у множества других фармацевтических предприятий появилась заманчивая перспектива начать выпуск дженерического Азитромицина. Рынок тотчас заполнился десятками дженериков Азитромицина, которые стали приемлемы практически всем. На сегодняшний день Сумамед так же производится, но его дороговизна очень часто заставляет медиков и потребителей отдавать предпочтение менее дорогим препаратам, содержащим то же действующее вещество.

Формула азитромицина - «(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-3,4,10 Тригидрокси-13-[(2,6-дидезокси-3-С-метил-3-О-метил-α-L-рибогексопиранозил)окси]-3,5,6,8,10,12,14-гептаметил-11-{[3,4,6-тридезокси-3-(диметиламино)-β-D-ксило-гексопиранозил]окси}-2-этил-1-окса-6-азациклопентадекан-15-он, дигидрат». На рисунке 1 представлена формула азитромицина.

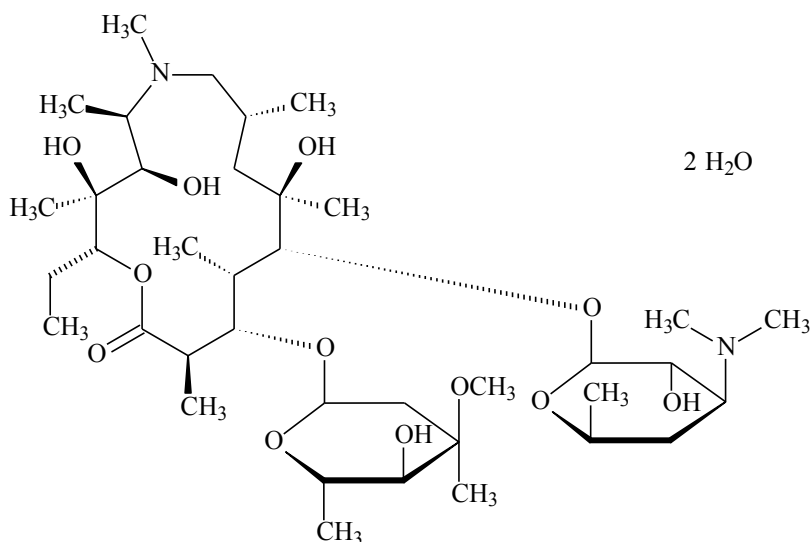


Рисунок 1 - Формула азитромицина

Азитромицин – это кристаллический порошок белого цвета, который способен растворяться в воде. Он является антибиотиком, который по способу получения является полусинтетическим, а также представляет подкласс азалидов и отличается по структуре от типичных макролидов»[11].

«Класс макролидных антибиотиков берет свое начало в 1952 году. Тогда американскими учеными фармацевтической компании "Эли Лилли" из почвенного актиномицета, был создан родоначальник макролидов - Эритромицин. На протяжении многих лет он благополучно применялся для лечения инфекций, вызванных грамположительными бактериями как взаимозаменяемый препарат у пациентов с аллергией на пенициллины»[12]. Но данное лекарство надо было применять по несколько раз в день, оно быстро распадалось в организме и имело ряд отрицательных эффектов, поэтому учёные продолжали синтезировать новые антибиотики этой группы, улучшать и совершенствовать их. Сейчас создано уже больше 20-ти макролидных антибактериальных средств. Макролиды делятся на подклассы. Фармакологи перестроили структуру лекарственного соединения, на пути к созданию Азитромицина, который был открыт первым в подклассе азалидов [13].

Состав лекарственного препарата «Азитромицин капсулы 250 мг» производителя ООО «ОЗОН» на одну капсулу представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Состав лекарственного препарата «Азитромицин капсулы 250 мг»

| Наименование вещества | Количество вещества |
|--|---------------------|
| 1 | 2 |
| Действующее вещество: | |
| Азитромицина дигидрата | 265,3 мг |
| в пересчете на активное вещество (азитромицин) | 250,0 мг |
| Вспомогательные вещества: | |

Продолжение таблицы 1

| 1 | 2 |
|---|----------|
| Целлюлоза микрокристаллическая (Eur. Ph., USP-NF) | 104,7 мг |
| Крахмал кукурузный (Eur. Ph., USP-NF) | 28,0 мг |
| Повидон К-17 (Eur. Ph., USP-NF) | 6,0 мг |
| Магния стеарат (Eur. Ph., USP-NF) | 6,0 мг |
| Масса содержимого капсулы | 410,0 мг |
| Капсула твердая желатиновая № 0 | |
| Состав корпуса капсулы: | |
| Краситель железа оксид желтый | 0,0733 % |
| Титана диоксид | 1,0000 % |
| Желатин | до 100 % |
| Состав крышечки капсулы: | |
| Краситель железа оксид желтый | 0,0733 % |
| Титана диоксид | 1,0000 % |
| Желатин | до 100 % |
| Масса капсулы с содержимым | 506,0 мг |

1.2 Методы контроля качества лекарственного препарата «Азитромицин капсулы 250 мг» производителя ООО «ОЗОН»

Капсулы № 0. Корпус и крышечка капсулы желтого со слегка коричневым оттенком цвета, непрозрачные.

Содержимое капсул – порошок белого или белого со слегка желтоватым оттенком цвета.

При визуальном осмотре капсулы препарата должны быть гладкими без повреждений и видимых включений (воздушных и/или механических).

Форма капсулы цилиндрическая, концы которой являются полусферы. Капсула состоит из двух частей: крышечка и корпус. Каждая часть должна входить друг в друга без зазоров. Также капсулы могут иметь специальные углубления и выступы для формирования «замка».

Подлинность: На хроматограмме пластинки 1 раздела «Родственные примеси» пятно испытуемого раствора 2 по положению должно соответствовать пятну СОВС 1 азитромицина.

Средняя масса капсулы и содержимого капсулы: Средняя масса определяется путем совместного взвешивания двадцати закрытых (наполненных) капсул, полученное значение массы делится на двадцать. После этого каждая капсула взвешивается отдельно, и полученная масса каждой отдельной капсулы сравнивается со средней массой. Допускается отклонение массы каждой отдельной капсулы $\pm 10\%$ от средней массы капсулы. После этого двадцать капсул аккуратно открываются, содержимое капсул полностью устраняется, и каждая оболочка взвешивается. Затем определяется средняя масса содержимого капсулы. Допускается отклонение массы содержимого каждой капсулы $\pm 10\%$ от средней массы содержимого капсулы, но также еще и допускается отклонение массы содержимого двух капсул (из двадцати) $\pm 25\%$.

Если имеется от двух до шести капсул с отклонением массы от средней в пределах диапазона от 10 до 25 %, то дополнительно определяется масса содержимого каждой капсулы и средняя масса содержимого еще сорока капсул (в сумме анализируют шестьдесят капсул). Из шестидесяти капсул допускается наличие не более шести капсул с отклонениями от средней массы капсулы более $\pm 10\%$, но менее $\pm 25\%$

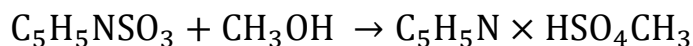
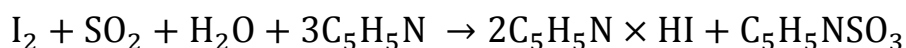
Масса капсулы: 0,455 г - 0,557 г (0,506 г + 10 %);

Масса содержимого капсулы: 0,369 г - 0,451 г (0,410 г + 10 %).

Вода (не более 5 %).

Определение воды производится методом Фишера (взаимодействие реактива Фишера с водой).

Реактив Фишера (раствор диоксида серы, йода и пиридина в метаноле) взаимодействует с водой в две стадии согласно стехиометрическим уравнениям:



Таким образом можно быстро и с высокой точностью определить содержание воды в органических и неорганических соединениях, а также в растворителях и летучих соединениях.

Данным способом может быть определена как кристаллизационная, так и гигроскопическая вода. Химические соединения, используемые в данном методе, способны к поглощению воды из атмосферы, в связи с этим должны соблюдаться меры по предотвращению поглощения соединениями влаги из атмосферы.

Параллельно проводится контрольный опыт - титруется 5 мл метанола. Для титрования используется закрытая система из лабораторного оборудования. Система состоит из бюретки, сосуда для передачи реактива и колбы для проведения титрования, которые соединяются с бюреткой. Колба и бюретка оснащаются осушительной трубкой (кальция хлорид ГОСТ 4460-77; силикагель ГОСТ 8984-75 и т.д.). Титрование проводится при постоянном перемешивании (с помощью магнитной мешалки).

Метод определения. В сухую колбу объемом 100 мл переливается 5 мл метанола, затем в эту же колбу помещается точная навеска испытуемого вещества (содержащая примерно от 0,03 до 0,05 г воды), перемешивается 1 минуту и титруется реактивом Фишера. Реактив прибавляется порциями по 0,1 - 0,05 мл до момента приближения к конечной точке.

Окончания титрования определяется двумя способами: путем наблюдения за изменением цвета испытуемого раствора от жёлтого до красновато-коричневого это визуальным способом, и титруют раствор до момента, когда испытуемый раствор не сможет проводить ток это электрометрическим титрование. Составления графиков при использовании электрометрического титрования совсем не обязательно, связи с тем, что изменение тока в конце титрования выявлено явно.

Формула вычисления содержания воды (X, %):

$$X = \frac{(a-b) \times T \times 100}{v} \quad (1)$$

где

а - объем реактива Фишера, который потрачен на титрование в основном опыте, мл;

б - объем реактива Фишера, который потрачен на титрование в контрольном опыте, мл;

в - навеска испытуемого вещества, г;

T - титр реактива Фишера, г/мл.

Приготовление реактива Фишера. Реактив Фишера (ТУ 6-09-1487-76) состоит из двух обособленных растворов № 1 и № 2, которые перед использованием смешивают в пропорции 1:2,17 (соотношение объемов растворов). Титр полученного реактива приблизительно равен 0,004 г/мл. Разбавляют реактив до титра приблизительно 0,001 г/мл путем смешивания полученного раствора с метанолом в пропорции 1:1, такой раствор применяют только при электрометрическом титровании до конечной точки.

Установка титра. В сухую колбу объемом 100 мл переливается 5 мл метанола, затем в эту же колбу помещается точная навеска испытуемого вещества (содержащая примерно 0,04 г воды), далее раствор титруют реактивом Фишера, добавляя его по 0,1 – 0,05 мл. Параллельно проводится титрование 5 мл метанола.

Формула вычисления титра (W, г/мл):

$$W = \frac{a}{b-v} \quad (2)$$

где а - навеска воды, г;

б - объем реактива Фишера, который потрачен на титрование навески воды в метаноле, мл;

в - объем реактива Фишера, который потрачен на титрование в контрольном опыте, мл.

Для определения титра разбавленного реактива берется точная навеска воды примерно 0,01 г.

Определение титра реактива производится перед каждым использованием реактива. Реактив хранится в стеклянной емкости с пробкой в сухом и защищенном от света месте.

Растворение: Опыт проводится согласно требованиям ОФС 42-0003-04.

Для проведения опыта по растворению используется оборудование типа «Вращающаяся корзинка». Среда растворения капсул – буферный раствор фосфатный (рН = 6,8, объем – 900 мл), скорость вращения оборудования – 100 об/мин, время растворения – 45 мин.

По прошествии 45 минут от начала растворения отбирается 50 миллилитров раствора и проливают его через фильтровальную бумагу (первые 15 миллилитров фильтрата утилизируются).

В мерную колбу объемом 25 миллилитров помещаются 2 мл фильтрата, затем прибавляются 10 миллилитров раствора серной кислоты (50 %). Колба с содержимым помещается в водяную баню на 7 минут, после чего, колбу с раствором охлаждают до комнатной температуры. Объем раствора в колбе доводится до метки путем добавления раствора серной кислоты (50 %), затем перемешивается.

С помощью спектрофотометра измеряется оптическая плотность испытуемого раствора в кювете с толщеного слоя 10 миллиметров при длине волны 481 нанометра. Параллельно проводится опыт определения оптической плотности раствора СО азитромицина дигидрата. Раствор сравнения – раствор серной кислоты (50 %).

Формула вычисления количества азитромицина (X, %):

$$X = \frac{D_1 \times m_0 \times 900 \times 25 \times 2 \times P \times 0,9423 \times 100}{D_0 \times 0,25 \times 2 \times 100 \times 25 \times 100} = \frac{D_1 \times m_0 \times 9 \times 0,9423 \times P}{D_0 \times 0,25} \quad (3)$$

где D_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора СО азитромицина дигидрата;

m_0 – навеска СО азитромицина дигидрата, г;

P – содержание азитромицина в СО, %;

Содержание азитромицина, оказавшегося в растворе за 45 минут перемешивания, должно быть не менее 75 % (Q) от количества, указанного на этикетке.

Приготовление раствора СО азитромицина. Точная навеска азитромицина дигидрата (USP RS или ГСО) в количестве 0,03 грамма помещается в мерную колбу объемом 100 миллилитров, растворяется в буферном растворе фосфатном (рН 6,8); содержимое колбы доводится до метки фосфатным буферным раствором и перемешивается. 2 миллилитра полученного раствора отбирается и переносится в мерную колбу объемом 25 миллилитров, прибавляется 10 миллилитров раствора серной кислоты (50 %). Затем колба с содержимым помещается в кипящую водяную баню на 7 минут, после чего раствор охлаждается до комнатной температуры. Раствор серной кислоты (50 %) добавляется в колбу, доводя до метки, затем раствор перемешивается.

Приготовление буферного раствора фосфатного (рН 6,8). В мерную колбу объемом 1000 миллилитров вносится 500 миллилитров раствора 0,1 М фосфата калия, 40 миллилитров раствора 0,1 М гидроксида натрия, доводится водой до метки объем содержимой колбы. Величина рН раствора определяется потенциометрическим методом, для определения применяют фосфорную кислоту или 0,1 М раствор гидроксид натрия.

Приготовление раствора серной кислоты. В мерную колбу объемом 1000 миллилитров переливается 490 миллилитров воды и к ней осторожно (маленькими порциями) при постоянном охлаждении и перемешивании приливается 510 миллилитров концентрированной серной кислоты.[14]

Родственные примеси:

- В мерную колбу объемом 50 мл помещается 2,05 грамм содержимого капсул азитромицина, приливается 40 миллилитров смеси

хлороформа и метанола (соотношение 1:1), тщательно перемешивается в течении 10 минут. Затем объем содержимого колбы доводится до метки равнообъемной смесью хлороформа и метанола и проливается через фильтровальную бумагу. Первые порции фильтрата утилизируются (испытуемый образец 1).

В мерную колбу объемом 25 миллилитров помещается 1 миллилитр полученного фильтрата, объем колбы доводится до метки путем добавления равнообъемной смеси хлороформа и метанола, полученный раствор перемешивается (испытуемый образец 2).

Перед нанесением испытуемых образцов хроматографическая пластина находится в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 30 минут.

На линию старта хроматографической пластинки 1 Сорбфил (размером 10x15 сантиметров) или аналогичной, наносится 0,02 миллилитров (500 микрограмм) испытуемого образца 1; 0,02 миллилитра (20 микрограмм) испытуемого образца 2; 0,02 миллилитра (20 микрограмм) раствора СОВС 1 азитромицина; 0,035 миллилитра (3,5 микрограмма) и 0,025 миллилитра (2,5 микрограмма) раствора СОВС 2 азитромицина.

Высушивается на воздухе пластина 1, на которой были нанесены пробы, после это пластина устанавливается в камеру, где находится смесь растворителей н-гексан-этилацетат-диэтиламин (в соотношении 25:15:2) и методом восходящей хроматографии проводят исследование.

Вынимается пластина 1 из камеры, когда на $\frac{3}{4}$ длины от линии старта продвинется фронт растворителей, сушится на воздухе 10 минут, затем при температуре 100 - 105 °С на протяжении 10 минут выдерживается в сушильном шкафу и, не охлаждая, проводится проявление в парах хлористого водорода до появления пятен.

Сравнивается интенсивность окраски пятен примесей, которые были получены при хроматографировании испытуемого образца 1, с

интенсивностью окраски пятен азитромицина, полученных при хроматографировании раствора СОВС 2 азитромицина (0,7 % и 0,5 %). Только одно дополнительное пятно не должно превышать по интенсивности пятно раствора СОВС 2, соответствующего 0,7 %. Любое другое дополнительное пятно на хроматограмме испытуемого раствора не должно превышать по интенсивности пятно раствора СОВС 2, соответствующего 0,5 %.

Общее число дополнительных пятен на хроматограмме испытуемого образца не должно превышать пяти. Пятно на старте при нанесении испытуемого образца, образованного вспомогательными веществами и не учитывается.

– Приготовление раствора СОВС 1 азитромицина. В мерную колбу объемом 25 миллилитров добавляется 0,025 грамм азитромицина дигидрата (USP RS или ГСО), приливается равнообъемную смесь хлороформа и метанола, перемешивается. Срок годности раствора с момента приготовления – 7 дней,

– Приготовление раствора СОВС 2 азитромицина. В мерную колбу объемом 10 миллилитров добавляется 1 миллилитр раствора СОВС 1 азитромицина дигидрата и содержимое колбы доводится до метки равнообъемной смесью хлороформа и метанола, перемешивается. Используется только свежеприготовленный раствор

В качестве испытуемого образца используется раствор 1, приготовленный в первой части определения родственных примесей.

Перед нанесением испытуемых образцов хроматографическая пластина находится в сушильном шкафу при температуре 100 – 105 °С в течение 30 минут.

На линию старта хроматографической пластинки 2 Сорбфил (размером 10x15 сантиметров) или аналогичной, наносится 0,02 миллилитра (500

микрограмм) испытуемого образца 1 и 0,01 миллилитра (1,5 микрограмма) стандартного раствора дезозаминилазитромицина А.

В хроматографическую камеру, в которой содержится смесь растворителей этилацетат – метилэтилкетон - концентрированная муравьиная кислота - вода (в соотношении 3:3:1:1) помещают пластину 2 с нанесенными на ней пробами, и далее проводят испытание методом восходящей хроматографии.

Когда фронт растворителя продвинется примерно на $\frac{3}{4}$ длины пластинки 2, ее достают и обрабатывают реактивом Драгендорфа, сушат 5 минут на воздухе, затем обрабатывают раствором натрия нитрита (5 %).

Пятна азитромицина и дезозаминилазитромицина А очень быстро исчезают, но это можно предотвратить тем, что хроматограмму непосредственно после обрабатывания раствором натрия нитрита покрывают стеклянной пластинкой.

Дополнительное пятно на хроматограмме испытуемого образца, соответствующее дезозаминилазитромицину А, по размеру и интенсивности не должно превышать пятна дезозаминилазитромицина А на хроматограмме стандартного раствора.

Содержание примеси дезозаминилазитромицина А должно быть не более 0,3 % по отношению к основному веществу.

– Приготовление раствора стандартного образца дезозаминилазитромицина А. В мерную колбу объемом 50 миллилитров помещается 0,015 грамм стандартного образца (USP, BP) примеси дезозаминилазитромицина А, туда же добавляет 40 миллилитров равнообъемной смеси хлороформа и метанола и перемешивается, после этого объем содержимого колбы доводится до метки равнообъемной смесью хлороформа и метанола.

В мерную колбу объемом 10 миллилитров переносится 5 миллилитров полученного раствора, после этого объем содержимого колбы доводится до метки равнообъемной смесью хлороформа и метанола.

– Приготовление раствора для проявления (реактив Драгендорфа). В мерной колбе объемом 100 миллилитров смешивается 5 миллилитров раствора висмута нитрата (1,7 %), смесь холодной (ледяной) уксусной кислоты и воды (в соотношении 20:80), 5 миллилитров раствора калия иодида (40 %) и 20 миллилитров холодной (ледяной) уксусной кислоты, затем содержимое колбы доводится до метки водой.

Микробиологическая чистота: В 1 грамме лекарственного препарата допускается наличие не более 100 дрожжевых и плесневых грибов (суммарно) при отсутствии *Escherichia coli*.

Анализ микробиологической чистоты лекарственных препаратов включает в себя количественное определение жизнеспособных бактерий и грибов, наличие которых недопустимо.

Анализируют препараты в асептических условиях, применяя разрешенные методы и питательные среды для контроля нестерильных лекарственных препаратов.

Препараты, которые обладают антимикробным действием подавляют рост определенных микроорганизмов при проведении анализа.

Эксперименты показывают действие препарата в отношении следующих тест-микроорганизмов: *Bacillus subtilis* (*Bacillus cereus*), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*. во избежание корректной оценки результатов.

Определение антимикробного действия лекарственного средства.

Образцы лекарственного препарат по 1 г (мл) в количестве 5 штук разводят средой N 3 (1 проба), средой N 8 (2 пробы) и в соотношении 1:10 фосфатным буферным раствором pH 7,0 (2 пробы).

На жидкой среде N 1 при температуре от 30 до 35 градусов в

протяжении 18-20 часов выращивают культуры *Bacillus subtilis* (*Bacillus cereus*), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. При температуре от 20 до 25 градусов продолжительностью 48 часов на жидкой среде N 2 выращивают культуру *Candida albicans*.

Стерильным изотоническим раствором хлорида натрия (0,9%) разводят культуры 1:1000 в заранее приготовленные пробы лекарственного препарат в среде N 8 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*), в среде N 3 (*Escherichia coli*) и в буферном растворе (*Bacillus subtilis*, *Candida albicans*) вносят по 1 мл взвеси каждого тест-штамма (по отдельности). Написанные в данной статье методы используются для обнаружения микроорганизмов. Показывают антимикробное действие лекарственного препарата на определенной питательной среде в случае отсутствия на ней роста тест-штаммов.

Пользуются разнообразными методами для устранения антимикробного действия лекарственного препарата: 1) взяв большее количество растворителя, увеличивают разведение лекарственного препарата; 2) нейтрализуют антимикробное действие лекарственного препарата, но не уменьшая рост микроорганизмов (например, пенициллиназу - для пенициллинов и цефалоспоринов, пара-аминобензойную кислоту - для сульфаниламидов) добавляя соответствующий специфический инактиватор необходимого количество; 3) совмещают методы 1 и 2; 4) в питательные среды добавляют неспецифические инактиваторы, нейтрализующие антимикробное действие лекарственного средства (например, 4% твина-80, 0,5% соевого лецитина); 5) если лекарственное средство растворимо, а все вышеперечисленные методы неэффективны, используют метод мембранной фильтрации; 6) это испытания не проводят если нельзя использовать метод мембранной фильтрации в связи с природой лекарственного средства а все вышеперечисленные методы устранения его антимикробного действия в отношении данного тест-штамма неэффективны.

Отбор и приготовление проб лекарственных средств для испытаний проводят следующим образом.

Среднюю пробу не менее 15 грамм отбирают от каждой серии лекарственного препарата, взятую не менее чем из 10 разных упаковок. Для каждого раздела исследования для одного анализа используют образцы по 3 г (мл). Итого по 9 г (мл) лекарственного препарата используют для проведения одного анализа. Образец в количестве 3 г (мл) используют при повторении исследования по одному из разделов исследования.

Образец для анализа готовят в виде суспензии, эмульсии или раствора в зависимости от физических свойств лекарственной формы:

- твердые лекарственные формы, которые сложно растворяются, измельчают при помощи определенного оборудования и суспендируют в фосфатном буферном растворе pH 7,0 или соответствующей жидкой питательной среде, рекомендованной для определенного вида испытания;

Для определения общего числа бактерий и грибов в 1 г (мл) лекарственного препарата и определения отсутствия бактерий семейств *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* используют приготовленные разведения образцов.

Количественное определение микроорганизмов: «Исследование проводят в чашках Петри диаметром 90-100 мм методом двухслойного агара. Для того, чтобы объем раствора (эмульсии, суспензии) был 100 мл, пробу препарата в количестве 10 грамм (мл) растворяют, эмульгируют или суспендируют в фосфатном буферном растворе pH 7,0. Просматривают посеы ежедневно».

Определение общего числа бактерий:

«В каждую пробирку, где уже имеется 4 мл расплавленной и охлажденной до температуры от 45 до 50 градусов среды N 1, добавляют пробы приготовленного раствора (суспензии, эмульсии) в количестве 1 мл. Содержимое пробирки быстро перемешивают и вливают в чашку Петри,

содержащую 15-20 мл застывшей питательной среды N 1». Верхний слой агара равно распределяют быстрым движением чашки Петри. Застывшие чашки со средой переворачивают и инкубируют при температуре от 30 до 35 градусов на протяжении 5 суток. Подсчитывают число бактериальных колоний на двух чашках через 48 ч и окончательно через 5 суток, находят среднее значение и, умножая его на показатель разведения, вычисляют число бактерий в 1 г (мл) образца.

Чтоб результат был достоверным считают только чашки, в которых проросло от 30 до 300 колоний. Результаты отмечают следующим образом: В 1 г (мл) лекарственного средства менее 10 бактерий, при условии, что при разведении образца 1:10 нет роста. Делают ряд дальнейших последовательных разведений образца (1:100, 1:1000 и т.д.), при условии, что число колоний на чашке превышает 300 при этом выбирая для посева разведение, наиболее соответствующее указанному выше уровню.

Определение общего числа грибов:

«Проводят исследование описанным выше методом двухслойного агара применяя среду N 2. Инкубирование посевов проводят в течение 5 суток с температурой 20-25 градусов. На двух чашках через 72 часа и окончательно через 5 суток подсчитывают общее число колоний дрожжевых и плесневых грибов, находят среднее значение и, умножая его на показатель разведения, т.е. на 10, определяют число грибов в 1 г (мл) образца. Делают ряд дальнейших разведений образца в случае, если число колоний грибов на чашке превышает 300». Даже если их число менее 30 на чашке учитывают все колонии грибов»[15].

Количественное определение:

– Определение проводят методом диффузии в агар с тест-микробом *Bac. cereus*, var. *Mycoides* НВ по СО азитромицина дигидрата (USP RS или ГСО). Для приготовления чашек используют среду № 9. Посевная доза – 20

млн. спор на 1 мл среды. Засеянную среду разливают по 10 мл на каждую чашку (один слой).

Точную навеску СО азитромицина дигидрата (USP RS или ГСО) растворяют в спирте из расчета 1 мл спирта на 10 мг стандартного образца, после чего добавляют буфер № 4 до концентрации 1000 мкг/мл (основной раствор).

Из основного раствора готовят испытуемый раствор стандарта, используя буфер № 4. Контрольная концентрация раствора стандарта – 2 мкг/мл. Для построения стандартной кривой используют пять концентраций: 1,28; 1,6; 2,0; 2,5; 3,12 мкг/мл.

Для приготовления испытуемого раствора анализируемого препарата содержимое 20 капсул препарата тщательно растирают в ступке, берут точную навеску (около 25 мг), растворяют в этиловом спирте из расчета 1 мл спирта на 10 мг препарата. Полученный раствор разводят буфером № 4 до концентрации 1 мг/мл (основной раствор). Основной испытуемый раствор разводят буфером № 4 до концентрации соответствующей контрольной концентрации раствора стандарта (2 мкг/мл).

Точность определения должна быть такова, чтобы доверительные пределы при Р 95 % отклонялись от среднего значения не более, чем на + 5.

Содержание азитромицина в одной капсуле X (в граммах) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \times B}{10^6} \quad (4)$$

где А – активность испытуемого раствора препарата, мкг/мг;

В – средняя масса содержимого капсул, мг;

10^6 – пересчетный коэффициент.

Содержание азитромицина в одной капсуле должно быть не менее 0,225 г и не более 0,275 г.

– Титриметрический метод

Содержимое капсул в количестве 0,41 г помещают в емкость, вместимостью 50 мл, добавляют ледяной уксусной кислоты в количестве 30 и растворяют в течение 5 минут на ультразвуковой бане. Добавляют ангидрида кислоты уксусной в количестве 5 мл, в течение 10 минут перемешивают и титруют 0,1 моль/л HClO_4 . Конец титрования определяют потенциометрически. Параллельно выполняют титрование холостой пробы.

1 мл 0,1 моль/л HClO_4 соответствует 37,45 мг $\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{N}_2\text{O}_{12}$.

Содержание азитромицина в одной капсуле должно быть не менее 0,225 г и не более 0,275 г.

Метод ТСХ, титриметрический метод, спектрофотометрический метод имеют недостатки.

«Титриметрический метод является:

- длительным, трудоемким, токсичным, в некоторых случаях определение ведется по фармакологически неактивной части молекулы.

Метод ТСХ:

- имеет низкую чувствительность определения
- зависимость от трудноконтролируемых внешних условий
- поскольку для разделения используется "открытая" система, результаты зависят от окружающей среды (например, относительная влажность влияет на состояние гидрофильных слоев, что приводит к необходимости контроля влажности среды; поверхность пластинки способна улавливать загрязняющие вещества из воздуха, из-за чего могут искажаться количественные результаты);
- осложнена работа с летучими образцами или с веществами, чувствительными к кислороду или к свету»[15].

Выводы по 1 разделу

Описаны и проанализированы действующие методы контроля качества лекарственного препарата Азитромицин на ООО «ОЗОН: тонкослойной хроматографии, титриметрический и спектрофотометрический методы.

Количественное определение препарата в настоящее время ведут титриметрическим методом, который имеет ряд недостатков: длительность, трудоемкость, токсичность, в некоторых случаях определение ведется по фармакологически неактивной части молекулы.

Для определения подлинности и родственных примесей в препарате Азитромицин применяется тонкослойная хроматография, которая имеет следующие недостатки: низкую чувствительность определения; зависимость от трудноконтролируемых внешних условий (относительная влажность, загрязнение воздуха). Кроме того, метод тонкослойной хроматографии позволяет определять только 4 показателя по содержанию неидентифицированных примесей.

Контролю качества лекарственных препаратов уделяется большое внимание в фармацевтической промышленности. Для повышения контроля качества лекарственного препарата «Азитромицин капсулы 250 мг» необходима актуализация методов контроля на соответствие нормативным документам.

2 Экспериментальная часть

2.1 Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) занимает важнейшее место в фармацевтическом анализе. Методики, которые указаны в нормативных документах, требуют дорогого импортного оборудования, недоступного для большинства российских лабораторий, также большого разнообразия элюентов, сорбентов, растворителей. В связи с этим, исследования в этом направлении являются перспективными.

Вследствие этого необходимо актуализировать методику контроля качества по показателям: «количественное определение», «подлинность», «растворение», «родственные примеси» используя метод ВЭЖХ [16].

Для проведения эксперимента с целью актуализации методики была проанализирована 2 серия препарата, заложенная на стабильность в период срока хранения 1,5 года и 2,5 года. Полученные результаты представлены в таблицах 2 и 3 [17].

Для проверки корректной работы методики была проведена валидация аналитических методик.

Таблица 2 - Результат стабильности

| Параметр | Метод | 1 серия (1,5года) | 2 серия (2,5 года) | Метод | 1 серия (1,5года) | 2 серия (2,5 года) |
|----------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|-------|-------------------|--------------------|
| подлинность | ТСХ | соотв | соотв | ВЭЖХ | соотв | соотв |
| растворение | Спектрофотометрический | 91 | 87 | ВЭЖХ | 101 | 100 |
| количественное определение | титриметрический | 0,266 | 0,271 | ВЭЖХ | 0,269 | 0,272 |

Таблица 3 - Результат стабильности по показателю родственные примеси

| Родственные примеси | | | | | |
|--|--------------------|--------------------|--|--------------------|--------------------|
| Метод ТСХ | 1 серия (1,5 года) | 2 серия (2,5 года) | Метод ВЭЖХ | 1 серия (1,5 года) | 2 серия (2,5 года) |
| Только одной неидентифицированной примеси не более 0,7 %. | <0,7 | <0,7 | Примеси В - не более 2,0 %, | 0,178 | 0,174 |
| Любой другой неидентифицированной примеси не более 0,5 %. | <0,5 | <0,5 | Примеси G - не более 2,0 %. | 0,199 | 0,201 |
| Общее число дополнительных пятен на хроматограмме испытуемого раствора не должно превышать пяти. | н/о | 3 | Примеси А - не более 1,0 %, | н/о | н/о |
| Не более 0,3 % дезаминалазитромици на А. | <0,3 | <0,3 | Примеси С - не более 1,0 %, | н/о | н/о |
| - | - | - | Примеси Е - не более 1,0 %, | 0,069 | 0,058 |
| - | - | - | Примеси F - не более 1,0 %, | 0,029 | 0,029 |
| - | - | - | Примеси Н - не более 1,0 %, | н/о | н/о |
| - | - | - | Примеси 1 - не более 1,0 %, | н/о | н/о |
| - | - | - | Примеси L - не более 1,0 %, | н/о | н/о |
| - | - | - | Примеси М - не более 1,0 %, | н/о | н/о |
| - | - | - | Примеси N - не более 1,0 %, | 0,058 | 0,064 |
| - | - | - | Примеси О - не более 1,0 %, | 0,25 | 0,28 |
| - | - | - | Примеси Р - не более 1,0 %, | 0,169 | 0,416 |
| - | - | - | Сумма примесей D и .1 - не более 2.0 %. | 0,1 | 0,12 |
| - | - | - | Любой неидентифицированной примеси - не более 0,5 %. | 0,12 | 0,139 |
| - | - | - | Сумма примесей - не более 5.0 %. | 1,172 | 1,481 |

2.2 Валидация аналитических методик

Необходимо оценить валидационные характеристики аналитических методик. Экспериментально доказать, что методики пригодны для решения предполагаемых задач [18].

2.2.1. Описание объекта валидации

Объектом валидации являются методики анализа препарата «Азитромицин капсула 250 мг,». Указанная нормативная документация представлена следующими разделами: «Описание», «Подлинность», «Растворение», «Родственные примеси», «Вода», «Микробиологическая чистота», «Однородность дозирования», «Количественное определение», «Упаковка», «Маркировка», «Хранение», «Срок годности» [19].

Проводится валидация методик, разработанных на предприятии: «Подлинность», «Растворение», «Родственные примеси», «Количественное определение». Данные методики применяются к лекарственной форме, состав которой указан в таблице 4.

Таблица 4 - Состав препарата «Азитромицин капсула 250 мг»

| Состав на одну капсулу | Количество, мг |
|--|----------------|
| 1 | 2 |
| Действующее вещество | |
| Азитромицина дигидрат | 265,3 |
| в пересчете на активное вещество (азитромицин) | 250,0 |
| Вспомогательные вещества: | |
| Целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ-112) | 104,7 |
| Крахмал кукурузный | 28,0 |
| Повидон-К17 | 6,0 |
| Магния стеарат | 6,0 |
| Масса содержимого капсулы | 410,0 |
| Капсула твердая желатиновая № 0 | |

Продолжение таблицы 4

| 1 | 2 |
|--|----------------------------------|
| Состав корпуса капсулы: Титана диоксид Краситель железа оксид желтый Желатин | 1,0000 % 0,0733 % до 100 % |
| Состав крышечки капсулы: Титана диоксид Краситель железа оксид желтый Желатин | 1,0000 % 0,0733 % до 100 % |
| Масса капсулы с содержимым | 506,0 |

Проводится оценка характеристик аналитических методик в ходе текущего анализа серии препарата с дополнительным применением, при необходимости, модельных смесей и растворов (таблицы 5,6). Приготовление реактивов и растворов, не описанных в настоящем протоколе, осуществляется в соответствии с проектом НД. [20]

Таблица 5 - Используемое оборудование, средства измерений и материалы

| № п/п | Наименование | Сведения о поверке |
|-------|---|--|
| 1 | Жидкостный хроматограф Waters "Alliance" № 1 № C1287E184A | Дата последней поверки: апрель 2019 дата следующей поверки: апрель 2020 |
| 2 | Весы аналитические Mettler Toledo MS105DU № B046086274 | Дата последней поверки: декабрь 2018 дата следующей поверки: декабрь 2019 |

Таблица 6 - Испытания и критерии приемлемости

| Номер этапа | Наименование испытания | Критерии приемлемости |
|-------------|-------------------------------|-----------------------|
| 1 | 2 | 3 |
| Этап 1 | Приготовление смеси «плацебо» | Не нормируется |

Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 |
|--------|---|---|
| Этап 2 | Валидация аналитической методики раздела «Подлинность», «Однородность дозирования», | <p>«Специфичность» 1) На хроматограммах раствора плацебо и растворителя должны отсутствовать пики с временами удерживания, совпадающими с временем удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора СО.</p> <p>Проверка пригодности хроматографической системы В соответствии с НД</p> <p>Прецизионность $RSD_{n=6} \leq 2,0 \%$; $RSD_{n=12} \leq 5,0 \%$</p> <p>Правильность 97-103 %</p> <p>Линейность и диапазон $r^2 \geq 0,995$</p> <p>Робастность $\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100 \leq 2,0\%$</p> |
| Этап 3 | Валидация аналитической методики раздела «Растворение» | <p>«Специфичность» 1) На хроматограммах раствора плацебо и растворителя должны отсутствовать пики с временами удерживания, совпадающими с временем удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора СО. 2) Отклонение времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора от времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора СО должно быть не более 2,0 %»[28].</p> <p>Проверка пригодности хроматографической системы В соответствии с НД</p> <p>Проверка пригодности хроматографической системы В соответствии с НД</p> <p>Повторяемость $RSD_{n=6} \leq 2,0 \%$</p> <p>Правильность 97-103 %</p> <p>Линейность и диапазон $r^2 \geq 0,995$</p> <p>Робастность $\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100 \leq 2,0\%$</p> |

Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 |
|--------|--|---|
| Этап 3 | | <p>Проверка пригодности хроматографической системы В соответствии с НД</p> <p>Проверка пригодности хроматографической системы В соответствии с НД</p> <p>Повторяемость $RSD_{n=6} \leq 2,0 \%$</p> <p>Правильность 97-103 %</p> <p>Линейность и диапазон $r^2 \geq 0,995$</p> <p>Робастность $\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100 \leq 2,0\%$</p> |
| Этап 4 | Валидация аналитической методики раздела «Родственные примеси» | <p>«Специфичность»</p> <p>1) На хроматограммах раствора плацебо, растворителя должны отсутствовать пики с временами удерживания, совпадающими с временами удерживания пиков азитромицина и примесей А, В, С, Е, F, G, I, J, L, М, N, O, P на хроматограмме раствора для идентификации пиков;</p> <p>2) Отклонение времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора от времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора для идентификации пиков не должно превышать 2 %».</p> <p>Проверка пригодности хроматографической системы В соответствии с НД</p> <p>Прецизионность $RSD_{n=6} \leq 5,0 \%$; $RSD_{n=12} \leq 10,0 \%$</p> <p>Правильность 97-103 %</p> |

Продолжение таблицы 6

| 1 | 2 | 3 |
|--------|---|--|
| Этап 4 | | <p>Линейность и диапазон $r^2 \geq 0,995$</p> <p>Робастность $\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100 \leq 2,0\%$</p> <p>Предел количественного определения При соотношении сигнал-шум (S/N) ≥ 10, концентрация образца равна пределу количественного определения</p> |

2.2.2 Этап 1. Приготовление смеси плацебо

Методика испытания: 7,236 г целлюлозы микрокристаллической помещают в фарфоровую ступку №4 и затирают ею поры, после чего добавляют 1,935 г крахмала кукурузного, 0,415 г Повидона-K17, 0,415 г магния стеарата, растирают и перемешивают в течение 3 минут, периодически счищая смесь с пестика, стенок и дна ступки.

2.2.3 Этап 2. Валидация аналитической методики разделов «Подлинность», «Количественное определение»

Цель испытания: провести валидацию аналитических методик разделов «Подлинность», «Количественное определение». Оценить валидационные характеристики, представленные в таблице 7.

Таблица 7 - Валидационные характеристики

| Раздел НД | Метод анализа | Валидационная характеристика |
|----------------------------|---------------|--|
| Подлинность* | ВЭЖХ | Специфичность |
| Количественное определение | ВЭЖХ | Специфичность Проверка пригодности хроматографической системы Прецизионность Правильность Линейность и диапазон Робастность |

* - определение подлинности методом ВЭЖХ проводится в составе раздела «Количественное определение».

Оборудование, средства измерения и материалы: аналитические весы, жидкостный хроматограф с УФ-спектрофотометрическим детектором, центрифуга, УЗ-ванна, колбы, пипетки.

Методика испытания

Определение проводят методом ВЭЖХ.

Буферный раствор рН 6,5. Около 3,4 г дикалия гидрофосфата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. рН полученного раствора доводят фосфорной кислотой, концентрированной до $6,5 \pm 0,05$.

Срок годности раствора 1 суток.

Растворитель. 6,7 г дикалия гидрофосфата растворяют в 900 мл воды, доводят рН раствора до $8,0 \pm 0,05$ фосфорной кислотой концентрированной и доводят объем водой до 1000 мл. Смешивают 40 объемов полученного раствора и 60 объемов ацетонитрила для хроматографии.

Срок годности раствора 3 суток.

Подвижная фаза. Смешивают буферный раствор рН 6,5, ацетонитрил для хроматографии и воду в соотношении 10: 35 : 55. Перед использованием подвижную фазу фильтруют через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют любым удобным способом.

Срок годности раствора 3 суток.

Испытуемый раствор. Около 82,0 мг (точная навеска) растертого содержимого 20 капсул, для которых предварительно определили среднюю массу содержимого капсул, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 70 мл растворителя и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин. После охлаждения раствора до комнатной температуры, объем раствора доводят растворителем до метки, перемешивают и

фильтруют через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм или центрифугируют в течение 5 мин при 10000 об/мин.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор СО азитромицина. Около 50,0 мг (точная навеска) СО азитромицина (EP CRS) или около 53,1 мг (точная навеска) азитромицина дигидрата (USP RS) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 70 мл растворителя, обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин, охлаждают раствор до комнатной температуры, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

«Условия хроматографирования:

Колонка: хроматографическая колонка размером 150 × 4,6 мм из нержавеющей стали, заполненная октадецилсилильным силикагелем с размером частиц 5 мкм, например, XTerra RP 18. Применение альтернативной колонки разрешается, если удовлетворяет требованиям проверки пригодности хроматографической системы;

Подвижная фаза: буферный раствор pH 6,5 – ацетонитрил для хроматографии – вода (10: 35 : 55);

Скорость потока: 1,0 мл/мин;

Детектор: УФ, 215 нм;

Температура колонки: 50 °С;

Объем пробы: 50 мкл»[39].

«Время удерживания пика азитромицина около 6 мин (* – приводится в качестве справочной информации)»[28].

Данные условия считаются рекомендованными, в случае необходимости разрешена их замена для обеспечения пригодности хроматографической системы в соответствии с требованиями ГФ РФ,

ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», раздел «Корректировка условий хроматографирования»[28].

«По 50 мкл раствора СО азитромицина (получая не менее трех хроматограмм) и испытуемого раствора хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ-спектрофотометрическим детектором.

Достоверными результаты исследования считаются, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

«Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограммах раствора СО азитромицина выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика азитромицина не более 2,0;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная для пика азитромицина, не менее 2000 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика азитромицина, не более 2,0 %.

Содержание $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ (азитромицина) в капсуле в миллиграммах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 100 \times P \times G}{S_0 \times 100 \times a \times K} = \frac{S \times a_0 \times P \times G}{S_0 \times a \times K} \quad (5)$$

где S – площадь пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика азитромицина на хроматограмме раствора СО азитромицина;

a – навеска растертого содержимого капсул, в миллиграммах;

a_0 – навеска СО азитромицина, в миллиграммах;

P – содержание основного вещества в СО азитромицина (для EP CRS выражается в процентах и для USP RS в микрограммах на миллиграмм);

K – коэффициент учета выражения содержания основного вещества в СО азитромицина (K = 100 для EP CRS; K = 1000 для USP RS);

G – средняя масса содержимого капсулы, в миллиграммах.

Содержание $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ (азитромицина) должно быть от 225,0 до 275,0 мг в капсуле»[21].

Специфичность

«В условиях валидируемой методики хроматографируют следующие растворы: растворитель, раствор плацебо, испытуемый раствор, раствор СО азитромицина.

Раствор плацебо. Около 28,9 (точная навеска) смеси плацебо помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 70 мл растворителя и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин. После охлаждения раствора до комнатной температуры, объем раствора доводят растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм или центрифугируют в течение 5 мин при 10000 об/мин.

Раствор используют свежеприготовленным.

Для подтверждения специфичности методики, заключающейся в возможности точно и специфично провести исследование искомого вещества при отсутствии интерференции пиков растворителя и компонентов плацебо, анализируют хроматограммы раствора «плацебо», растворителя, отмечая наличие пиков с временами удерживания, совпадающими с временем удерживания азитромицина на хроматограмме раствора СО азитромицина.

Проводят измерение времени удерживания (t_R) пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора и раствора СО»[22].

«Критерии приемлемости

1. На хроматограммах раствора плацебо и растворителя должны отсутствовать пики с временами удерживания, совпадающими с временем удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора СО.

2. На хроматограмме испытуемого раствора должен присутствовать пик азитромицина с временем удерживания, совпадающим с временем удерживания пика азитромицина на хроматограммах раствора СО;

3. Отклонение времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора от времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора СО должно быть не более 2,0 %.

Результаты занесены в таблицу 8.

Таблица 8 - Валидация специфичности аналитических методик определения подлинности и количественного содержания

| Специфичность времен удерживания (t_R) пика азитромицина | |
|---|-------------|
| t_R пика на хроматограмме раствора СО, мин (А) | |
| 6,484 | |
| t_R пика на хроматограмме испытуемого раствора, мин (Б) | |
| 6,441 | |
| Отклонение t_R пика, % | |
| 0,66 | |
| Наличие пиков с t_R, совпадающим с t_R пика азитромицина | |
| На хроматограмме раствора «плацебо» | отсутствует |
| На хроматограмме растворителя | отсутствует |

Заключение

Методика определения подлинности и количественного определения методом ВЭЖХ является специфичной, т.к.:

- на хроматограммах раствора плацебо и растворителя отсутствуют пики с временами удерживания, совпадающими с временем удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора СО;

- на хроматограмме испытуемого раствора присутствуют пик азитромицина с временем удерживания, совпадающим с временами удерживания пика азитромицина на хроматограммах раствора СО;

- отклонение времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора от времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора СО не более 2,0 %»[39].

Проверка пригодности хроматографической системы

Выполняют проверку пригодности согласно НД.

«Критерии приемлемости

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограммах раствора СО азитромицина выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика азитромицина не более 2,0;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная для пика азитромицина, не менее 2000 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика азитромицина, не более 2,0 %»[28]. Результаты занесены в таблицу 9.

Таблица 9 - Проверка пригодности хроматографической системы

| На хроматограмме раствора СО азитромицина | |
|--|------|
| Относительное стандартное отклонение площади пика азитромицина (RSD) | 0,48 |
| Эффективность хроматографической колонки по пику азитромицина (N) | 4621 |
| Фактор асимметрии пика азитромицина (As) | 1,15 |

Заключение

Условия пригодности хроматографической системы выполнены.

Прецизионность

«Прецизионность аналитического метода оценивают по результатам не менее шести определений для образцов с содержанием определяемого вещества, близким к номинальному.

Готовят шесть испытуемых растворов согласно разделу «Количественное определение». Проводят анализ в условиях валидируемой методики, вычисляют относительное стандартное отклонение (RSD).

Для оценки внутрилабораторной прецизионности анализ проводит другой аналитик в другой день на том же оборудовании.

$$RSD(\%) = \sqrt{\frac{\sum_1^n s_i^2 - n\bar{s}^2}{n-1}} \times 100, \quad (6)$$

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

S - площадь пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора;

\bar{S} - средняя площадь пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора.

Критерии приемлемости

Относительное стандартное отклонение (RSD)

Повторяемость - не более 2,0 %;

Внутрилабораторная прецизионность – не более 5,0 %.

Результаты занесены в таблицу 10.

Таблица 10 - Валидация прецизионности методики определения количественного содержания

| № раствора | Площадь пика азитромицина | |
|------------|---------------------------|---------------|
| | Исполнитель 1 | Исполнитель 2 |
| 1 | 2 | 3 |
| 1 | 312551 | 315412 |
| 2 | 311625 | 312554 |
| 3 | 312435 | 311697 |
| 4 | 314215 | 312471 |
| 5 | 310228 | 313551 |

Продолжение таблицы 10

| | | |
|---|--------|--------|
| 1 | 2 | 3 |
| 6 | 312697 | 311697 |
| Среднее значение | 312291 | 312897 |
| RSD _{n=6} , % (повторяемость) | 0,42 | 0,45 |
| RSD _{n=12} , % (внутрилабораторная прецизионность) | | 0,43 |

Заключение

Прецизионность соответствует требованиям»[39].

Правильность, линейность и диапазон

Готовят 5 модельных растворов (таблица 10) по следующей методике:

Соответствующие навески веществ, указанных в таблице 11 помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 70 мл растворителя и обрабатывают ультразвуком в течение 10 мин. После охлаждения раствора до комнатной температуры, объем раствора доводят растворителем до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм или центрифугируют в течение 5 мин при 10000 об/мин. Раствор используют свежеприготовленным [23].

Таблица 11 – Концентрации модельных растворов

| № раствора | Азитромицина дигидрат, мг | Смесь плацебо, мг | Концентрация раствора (X) в % от теоретической по проекту НД |
|------------|---------------------------|-------------------|--|
| 1 | 42,4 | 28,9 | 80 |
| 2 | 47,8 | 28,9 | 90 |
| 3 | 53,1 | 28,9 | 100 |
| 4 | 58,4 | 28,9 | 110 |
| 5 | 63,7 | 28,9 | 120 |

Хроматографируют полученные модельные растворы и раствор СО азитромицина в условиях, описанных в разделе «Количественное определение».

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

$$\text{Правильность}(\%) = \frac{Y_i}{X_i} \times 100 \quad (7)$$

где Y_i – найдено в % к концентрации раствора СО;

X_i – введено в % от концентрации раствора СО;

$$Y_i = \frac{S_i \times a_0 \times P_0}{S_0 \times a_i \times P_i} \times V \times 100 \quad (8)$$

где, S_i – площадь пика азитромицина на хроматограмме модельного раствора (для каждой из 5-и концентраций);

S_0 – среднее значение площади пика азитромицина на хроматограмме раствора СО;

a_i – фактическая навеска субстанции азитромицина дигидрата для приготовления модельного раствора, мг;

a_0 – фактическая навеска СО азитромицина дигидрата для приготовления раствора СО, мг;

P_0 – содержание основного вещества в стандартном образце, %

P_i – содержание основного вещества в субстанции для приготовления модельных растворов, %;

V – коэффициент, учитывающий концентрации и разведение растворов.

$$X_{i=\frac{C_{\text{факт}}}{C_{\text{теор}}}} \times 100\% \quad (9)$$

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

$C_{\text{теор}}$ – теоретическая концентрация раствора СО по НД, мг/мл.

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

$$r^2 = \left(\frac{n \sum_1^n (x_i \times y_i) - \sum_1^n x_i \times \sum_1^n y_i}{\sqrt{[n \times \sum_1^n x_i^2 - (\sum_1^n x_i)^2] \times [n \times \sum_1^n y_i^2 - (\sum_1^n y_i)^2]}} \right)^2 \quad (10)$$

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. Результат занесены в таблицу 12.

«Таблица 12 - Валидация правильности, линейности метода ВЭЖХ раздела «Количественное определение»

| Раствор №1 | Раствор №2 | Раствор №3 | Раствор №4 | Раствор №5 |
|---|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Площадь пика азитромицина на хроматограмме раствора СО (S_0) | | | | |
| 349225 | | | | |
| Площадь пика азитромицина на хроматограмме модельного раствора (S) | | | | |
| 282754 | 313035 | 352476 | 380869 | 421918 |
| Навеска СО азитромицина дигидрата для приготовления раствора СО, мг (a_0) | | | | |
| 53,02 | | | | |
| Навеска субстанции азитромицина дигидрата для приготовления модельных растворов, мг (a) | | | | |
| 42,46 | 47,82 | 53,04 | 58,51 | 63,65 |
| Концентрация модельного раствора в % от теоретической по НД, % (X) | | | | |
| 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| Коэффициент, учитывающий концентрации и разведение модельных растворов (V) | | | | |
| 0,8 | 0,9 | 1 | 1,1 | 1,2 |
| Введено, % (X) | | | | |
| 79,96 | 90,06 | 99,89 | 110,19 | 119,87 |

Продолжение таблицы 12

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|-------|--------|--------|--------|
| Найдено, % (Y) | | | | |
| 80,88 | 89,45 | 100,89 | 108,71 | 120,77 |
| Правильность, % | | | | |
| 101,15 | 99,32 | 101,01 | 98,66 | 100,75 |
| Линейность и диапазон | | | | |
| Квадрат коэффициента линейной корреляции | | | | |
| 0,9960 | | | | |

Заключение

Правильность составила 98,66-101,15 %, что не выходит за пределы допустимого диапазона (97-103 %). Квадрат коэффициента линейной корреляции составил 0,9960, линейность подтверждена в рассматриваемом диапазоне» [39].

Робастность

Готовят 3 раствора СО азитромицина и 3 испытуемых раствора в соответствии с требованиями раздела НД «Количественное определение».

Растворы проверяют после хранения при комнатной температуре в течение 8 ч (две точки измерения: сразу после приготовления ($S_{нач}$) и через 8 ч (S_0)).

Критерии приемлемости

В случае выполнения указанных ниже соотношений растворы считаются стабильными:

$$\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100 \leq 2,0\% \quad (11)$$

где, S_i – площадь пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора (раствора СО) в i -ый момент времени;

$S_{нач}$ – площадь пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора (раствора СО) в начальный момент времени. Результаты занесены в таблицу 13.

«Таблица 13 - Стабильность растворов»

| Стабильность растворов. | | | |
|-----------------------------|--|-----------------------------|--|
| Наименование, № раствора | Сразу после приготовления, ($S_{нач}$) | Через 8 часов, (S_i) | Разница в содержании $\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100, \%$ |
| Время | | | |
| Раствор СО №1 | 351135 | 349854 | 0,36 % |
| Раствор СО №2 | 347905 | 349004 | 0,32 % |
| Раствор СО №3 | 348635 | 345215 | 0,98 % |
| Испытуемый раствор № 1 | 312551 | 314975 | 0,78 % |
| Испытуемый раствор № 2 | 311625 | 315224 | 1,15 % |
| Испытуемый раствор № 3 | 312435 | 314215 | 0,57 % |

Заключение

Растворы СО азитромицина и испытуемые растворы выдерживают требования по стабильности в течение 8 часов» [39].

2.2.4 Этап 3. Валидация аналитической методики раздела «Растворение»

Цель испытания: провести валидацию аналитических методик раздела «Растворение». Оценить валидационные характеристики, представленные в таблице 14.

Таблица 14 - Валидационные характеристики «Растворение»

| Раздел НД | Метод анализа | Валидационная характеристика |
|-------------|---------------|---|
| Растворение | ВЭЖХ | Специфичность Проверка пригодности хроматографической системы Повторяемость Правильность Линейность и диапазон Робастность |

Оборудование, средства измерения и материалы: аналитические весы, жидкостный хроматограф с УФ-спектрофотометрическим детектором, УЗ-ванна, колбы, пипетки.

Методика испытания

Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.4.2.0014.15 «Растворение для твердых дозированных лекарственных форм», используя аппарат типа «Лопастная мешалка», оснащенный держателями Sinkers кат. № 65-190-012, или стальными грузилами кат. № 302-9065-6. Метод определения ВЭЖХ. Приготовление подвижной фазы и условия хроматографирования описаны в разделе «Количественное определение».

Среда растворения – 14,2 г динатрия гидрофосфата безводного растворяют в 500 мл воды, доводят рН раствора до $6,0 \pm 0,05$ хлористоводородной кислотой 25 % и доводят объем водой до 1000 мл;

Объем среды растворения – 900 мл;

Температура среды растворения – $37 \pm 0,5$ °С;

Скорость вращения мешалки – 100 об/мин;

Время растворения – 45 мин.

Растворитель. 17,5 г дикалия гидрофосфата растворяют в 900 мл воды, доводят рН раствора до $8,0 \pm 0,05$ фосфорной кислотой и доводят объем водой до 1000 мл. Смешивают 80 объемов полученного раствора и 20 объемов ацетонитрила для хроматографии.

Срок годности раствора 3 суток.

Испытуемый раствор. В каждый сосуд для растворения помещают по одной капсуле. Через 45 мин отбирают пробу раствора объемом 50 мл и фильтруют через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. 10,0 мл полученного фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор СО азитромицина. Около 11,1 мг (точная навеска) СО азитромицина (EP CRS) или около 11,7 мг (точная навеска) СО азитромицина дигидрата (USP RS) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 40 мл среды растворения; обрабатывают ультразвуком в течение 20 мин, охлаждают раствор до комнатной температуры, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

По 50 мкл раствора СО азитромицина (получая не менее трех хроматограмм) и испытуемого раствора хроматографируют на жидкостном хроматографе с УФ-спектрофотометрическим детектором в условиях, описанных в разделе «Количественное определение».

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограммах раствора СО азитромицина выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика азитромицина не более 2,0;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная для пика азитромицина, не менее 1000 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение площади, рассчитанное для пика азитромицина, не более 2,0 %.

Количество $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ (азитромицина), перешедшее в раствор из капсулы, в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 900 \times 25 \times P \times 100}{S_0 \times 100 \times L \times 10 \times K} = \frac{S \times a_0 \times P \times 2250}{S_0 \times L \times K}, \quad (12)$$

где, S – площадь пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_0 – площадь пика азитромицина на хроматограмме раствора СО азитромицина;

a_0 – навеска СО азитромицина, в миллиграммах;

P – содержание основного вещества в СО азитромицина (для EP CRS выражается в процентах и для USP RS в микрограммах на миллиграмм);

K – коэффициент учета выражения содержания основного вещества в СО азитромицина ($K = 100$ для EP CRS; $K = 1000$ для USP RS);

L – заявленное содержание азитромицина в капсуле, в миллиграммах.

Через 45 мин в раствор должно перейти не менее 75 % (Q) $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ (азитромицина) [25].

Специфичность

В условиях валидируемой методики хроматографируют следующие растворы: растворитель, раствор плацебо, испытуемый раствор, раствор СО азитромицина.

Раствор плацебо. Около 144,7 мг (точная навеска) смеси плацебо помещают в сосуд для растворения (среда растворения – 14,2 г динатрия гидрофосфата безводного растворяют в 500 мл воды, доводят рН раствора до $6,0 \pm 0,05$ хлористоводородной кислотой 25 % и доводят объем водой до 1000 мл; объем среды растворения – 900 мл; температура среды растворения – $37 \pm 0,5$ °С; скорость вращения мешалки – 100 об/мин; время растворения – 45 мин.). Через 45 мин отбирают пробу раствора объемом 50 мл и фильтруют через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. 10,0 мл полученного фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

«Для подтверждения специфичности методики, заключающейся в возможности точно и специфично провести исследование искомого вещества при отсутствии интерференции пиков растворителя и компонентов плацебо, анализируют хроматограммы раствора «плацебо», растворителя, отмечая наличие пиков с временами удерживания, совпадающими с временем

удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора СО азитромицина»[26].

Проводят измерение времени удерживания (t_R) пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора и раствора СО.

«Критерии приемлемости

1. На хроматограммах раствора плацебо и растворителя должны отсутствовать пики с временами удерживания, совпадающими с временем удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора СО.

2. Отклонение времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора от времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора СО должно быть не более 2,0 %. Результаты занесены в таблицу 15.

Таблица 15 - Валидация специфичности аналитической методики определения растворения[39]

| | |
|---|-------------|
| Специфичность времен удерживания (t_R) пика азитромицина | |
| t_R пика на хроматограмме раствора СО, мин (А) | |
| 6,497 | |
| t_R пика на хроматограмме испытуемого раствора, мин (Б) | |
| 6,512 | |
| Отклонение t_R пика, % | |
| 0,23 | |
| Наличие пиков с t_R , совпадающим с t_R пика азитромицина | |
| На хроматограмме раствора «плацебо» | отсутствует |
| На хроматограмме растворителя | отсутствует |

Заключение

Методика растворения методом ВЭЖХ является специфичной, т.к.:

- на хроматограммах раствора плацебо и растворителя отсутствуют пики с временами удерживания, совпадающими с временем удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора СО;

- отклонение времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора от времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора СО не более 2,0 %»[39].

Проверка пригодности хроматографической системы

Выполняют проверку пригодности согласно НД.

Критерии приемлемости

Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограммах раствора СО азитромицина выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика азитромицина не более 2,0;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная для пика азитромицина, не менее 1000 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение площади, рассчитанное для пика азитромицина, не более 2,0 %»[39]. Результаты занесены в таблицу 16.

Таблица 16 - Проверка пригодности хроматографической системы

| На хроматограмме раствора СО | |
|---|------|
| 1 | 2 |
| Относительное стандартное отклонение площади азитромицина (RSD) | 0,31 |
| Эффективность хроматографической колонки по пику азитромицина (N) | 6220 |
| Фактор асимметрии пика азитромицина (As) | 1,21 |

Заключение

Условия пригодности хроматографической системы выполнены.

Повторяемость

«Повторяемость аналитического метода оценивают по результатам не менее шести определений для образцов с содержанием определяемого вещества, близким к номинальному.

Готовят шесть испытуемых растворов согласно разделу «Растворение». Проводят анализ в условиях валидируемой методики, вычисляют относительное стандартное отклонение (RSD).

$$RSD(\%) = \sqrt{\frac{\sum_i^n s_i^2 - n\bar{s}^2}{n-1}} \times 100 \quad (13)$$

где n - объем выборки = 6 – для оценки повторяемости

S – площадь пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора;

\bar{S} - среднее значение площади пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора;

Σ - знак суммирования» [28].

«Критерии приемлемости

Относительное стандартное отклонение (RSD);

Повторяемость - не более 2,0 %.

Результаты занесены в таблицу 17.

Таблица 17 - Валидация повторяемости методики определения растворения

| № раствора | Площадь пика азитромицина |
|--|---------------------------|
| 1 | 64689 |
| 2 | 67726 |
| 3 | 67448 |
| 4 | 65094 |
| 5 | 66712 |
| 6 | 65457 |
| Среднее значение | 66187 |
| RSD _{n=6} , % (повторяемость) | 1,94 |

Заключение

Прецизионность соответствует требованиям»[39].

Правильность, линейность и диапазон

Готовят 5 модельных растворов по следующей методике:

Среда растворения – 14,2 г динатрия гидрофосфата безводного растворяют в 500 мл воды, доводят рН раствора до $6,0 \pm 0,05$ хлористоводородной кислотой 25 % и доводят объем водой до 1000 мл;

Объем среды растворения – 900 мл;

Температура среды растворения – $37 \pm 0,5$ °С;

Скорость вращения мешалки – 100 об/мин;

Время растворения – 45 мин.

Соответствующие навески веществ, указанных в таблице 18, помещают в сосуды для растворения. Через 45 мин отбирают пробу раствора объемом 50 мл и фильтруют через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. 10,0 мл полученного фильтрата переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Таблица 18 – Навески для модельной смеси

| № раствора | Азитромицина дигидрата, мг | Смесь плацебо, мг | Концентрация раствора (X) в % от теоретической по проекту НД |
|-------------------|-----------------------------------|--------------------------|---|
| 1 | 132,65 | 144,7 | 50,0 |
| 2 | 165,81 | 144,7 | 62,5 |
| 3 | 198,98 | 144,7 | 75,0 |
| 4 | 265,30 | 144,7 | 100,0 |
| 5 | 318,36 | 144,7 | 120,0 |

Хроматографируют полученные модельные растворы и раствора СО азитромицина в условиях, описанных в разделе «Растворение».

Для оценки правильности определяют степень соответствия между известным истинным значением и значением, полученным по данной

методике. Правильность методики определяем величиной отношения «найденного» к «введенному» [27].

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

где, Y_i – найдено в % к концентрации раствора СО;

X_i – введено в % от концентрации раствора СО;

$$Y_i = \frac{S_i \times a_0 \times P_0}{S_0 \times a_i \times P_i} \times V \times 100 \quad (15)$$

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

S_0 – среднее значение площади пика азитромицина на хроматограмме раствора СО;

a_i – фактическая навеска субстанции азитромицина дигидрата для приготовления модельного раствора, мг;

a_0 – фактическая навеска СО азитромицина дигидрата для приготовления раствора СО, мг;

P_0 – содержание основного вещества в стандартном образце, %

P_i – содержание основного вещества в субстанции для приготовления модельных растворов, %;

V – коэффициент, учитывающий концентрации и разведение растворов.

$$X_{i=\frac{C_{\text{факт}}}{C_{\text{теор}}}} \times 100\% \quad (16)$$

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

$C_{\text{теор}}$ – теоретическая концентрация раствора СО по НД, мг/мл.

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

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

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.

Результаты занесены в таблицу 19.

«Заключение»

Правильность составила 98,80-101,74 %, что не выходит за пределы допустимого диапазона (97-103 %). Квадрат коэффициента линейной корреляции составил 0,9991, линейность подтверждена в рассматриваемом диапазоне.

Таблица 19 - Валидация правильности, линейности метода ВЭЖХ раздела «Растворение»

| Раствор №1 | Раствор №2 | Раствор №3 | Раствор №4 | Раствор №5 |
|---|------------|------------|------------|------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Площадь пика азитромицина на хроматограмме раствора СО (S_0) | | | | |
| 66187 | | | | |
| Площадь пика азитромицина на хроматограмме модельного раствора (S) | | | | |
| 33306 | 41369 | 48673 | 66854 | 80025 |
| Навеска СО азитромицина дигидрата для приготовления раствора СО, мг (a_0) | | | | |
| 11,78 | | | | |
| Навеска субстанции азитромицина дигидрата для приготовления модельных растворов, мг (a) | | | | |
| 132,58 | 165,87 | 198,90 | 265,24 | 318,42 |
| Концентрация модельного раствора в % от теоретической по НД, % (X) | | | | |
| 50 | 62,5 | 75 | 100 | 120 |

Продолжение таблицы 19

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|--------|-------|--------|--------|
| Коэффициент, учитывающий концентрации и разведение модельных растворов (V) | | | | |
| 11,34 | 14,17 | 17,01 | 22,67 | 27,21 |
| Введено, % (X) | | | | |
| 49,97 | 62,52 | 74,97 | 99,98 | 120,02 |
| Найдено, % (Y) | | | | |
| 50,69 | 62,91 | 74,07 | 101,72 | 121,71 |
| Правильность, % | | | | |
| 101,44 | 100,62 | 98,80 | 101,74 | 101,41 |
| Линейность и диапазон | | | | |
| Квадрат коэффициента линейной корреляции | | | | |
| 0,9991 | | | | |

Робастность

Готовят 3 раствора СО азитромицина и 3 испытуемых раствора в соответствии с требованиями раздела НД «Растворение».

Растворы проверяют после хранения при комнатной температуре в течение 8 ч (две точки измерения: сразу после приготовления ($S_{нач}$) и через 8 ч (S_0)»[39].

Критерии приемлемости

В случае выполнения указанных ниже соотношений растворы считаются стабильными:

$$\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100 \leq 2,0\% \quad (18)$$

где, S_i – площадь пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора (раствора СО) в i -ый момент времени;

$S_{нач}$ – площадь пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора (раствора СО) в начальный момент времени.

Результаты занесены в таблицу 20.

Таблица 20 - Стабильность растворов

| Стабильность растворов. | | | |
|-----------------------------|--|-------------------------------------|--|
| Наименование, № раствора | Сразу после приготовления, (S _{нач}) | Через 8 часов, (S _i) | Разница в содержании $\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100, \%$ |
| Время | | | |
| Раствор СО №1 | 68846 | 68489 | 0,52 % |
| Раствор СО №2 | 69270 | 68311 | 1,38 % |
| Раствор СО №3 | 69094 | 69799 | 1,02 % |
| Испытуемый раствор № 1 | 64689 | 64412 | 0,43 % |
| Испытуемый раствор № 2 | 67726 | 67496 | 0,34 % |
| Испытуемый раствор № 3 | 67448 | 68059 | 0,91 % |

Заключение

Растворы СО азитромицина и испытуемые растворы выдерживают требования по стабильности в течение 8 часов.

2.2.5 Этап 4. Валидация аналитической методики определения родственных примесей методом ВЭЖХ

Цель испытания: провести валидацию аналитических методик раздела «Родственные примеси». Оценить валидационные характеристики, представленные в таблице 21.

Таблица 21 – Валидационные характеристики «Родственные примеси»

| Раздел проекта НД | Метод анализа | Валидационная характеристика |
|---------------------|---------------|--|
| Родственные примеси | ВЭЖХ | Специфичность Проверка пригодности хроматографической системы Предел количественного определения Прецизионность Правильность Линейность и диапазон Робастность |

Оборудование, средства измерения и материалы: аналитические весы, жидкостный хроматограф с УФ-спектрофотометрическим детектором, УЗ-ванна, колбы, пипетки.

Методика испытания

Определение проводят методом ВЭЖХ.

Растворы, содержащие азитромицин и его примеси, защищают от действия света.

Буферный раствор рН 8,9. Около 4,5 г **динатрия гидрофосфата додекагидрата** помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 950 мл воды и растворяют при перемешивании. Доводят рН полученного раствора фосфорной кислотой или натрия гидроксида раствором 10 % до $8,9 \pm 0,05$, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Срок годности раствора 1 сутки.

Подвижная фаза А. Буферный раствор рН 8,9. Перед использованием подвижную фазу фильтруют через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют любым удобным способом.

Срок годности раствора 1 сутки.

Подвижная фаза Б. Смешивают метанол для жидкостной хроматографии и ацетонитрил для хроматографии в соотношении 25: 75. Перед использованием подвижную фазу фильтруют через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм и дегазируют любым удобным способом.

Срок годности раствора 3 сутки.

Растворитель. Около 1,73 г аммония дигидрофосфата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 950 мл воды и растворяют при перемешивании. Доводят рН полученного раствора аммиака раствором, концентрированным 25 % до $10,0 \pm 0,05$, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 350 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют 300 мл ацетонитрила для

хроматографии, 350 мл метанола для жидкостной хроматографии и перемешивают.

Срок годности раствора 3 сутки.

Испытуемый раствор. Около 328,0 мг (точная навеска) порошка содержимого 20 капсул, для которых предварительно определили среднюю массу содержимого, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют около 20 мл смеси растворителей, обрабатывают ультразвуком в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры. Доводят объем раствора смесью растворителей до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор сравнения. Около 8,0 мг (точная навеска) СО азитромицина (EP CRS) или около 8,5 мг (точная навеска) СО азитромицина дигидрата (USP RS) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 60 мл смеси растворителей, обрабатывают ультразвуком в течение 15 мин, охлаждают раствор до комнатной температуры, доводят объем раствора смесью растворителей до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор для проверки чувствительности хроматографической системы. 5,0 мл раствора сравнения помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора растворителем до метки и перемешивают.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор для проверки пригодности системы. Содержимое флакона СО азитромицина для проверки пригодности системы (EP CRS), содержащего примеси F, J, H, растворяют в 1,0 мл смеси растворителей, обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин и охлаждают раствор до комнатной температуры.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор для идентификации пиков. 8,0 мг СО азитромицина для идентификации пиков (EP CRS, USP RS), содержащего примеси А, В, С, Е, F, G, I, J, L, М, N, О, Р растворяют в 1,0 мл смеси растворителей.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор «плацебо». 115,8 мг смеси вспомогательных веществ, входящих в состав содержимого капсулы в соответствующих пропорциях, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют около 20 мл смеси растворителей, обрабатывают ультразвуком в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры. Доводят объем раствора смесью растворителей до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

Раствор используют свежеприготовленным.

Условия хроматографирования:

«Колонка: хроматографическая колонка из нержавеющей стали размером $250 \times 4,6$ мм, заполненная октадецилсилильным силикагелем с размером частиц 5 мкм, например, XTerra MS C18. Допускается использование альтернативной колонки, удовлетворяющей требованиям проверки пригодности хроматографической системы»[28].

«Подвижная фаза А: буферный раствор рН 8,9;

Подвижная фаза Б: метанол для жидкостной хроматографии: ацетонитрил для хроматографии (25 : 75);

Скорость потока: 1,0 мл/мин;

Детектор: УФ, 210 нм;

Температура колонки: 60 °С;

Объем пробы: 50 мкл».

Таблица 22- Программа градиента

| Время, мин | Подвижная фаза А, % об. | Подвижная фаза Б, % об. |
|------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 50 | 50 |
| 25 | 45 | 55 |
| 30 | 40 | 60 |
| 80 | 25 | 75 |
| 81 | 50 | 50 |
| 93 | 50 | 50 |

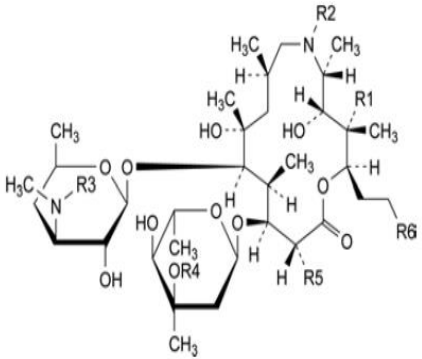
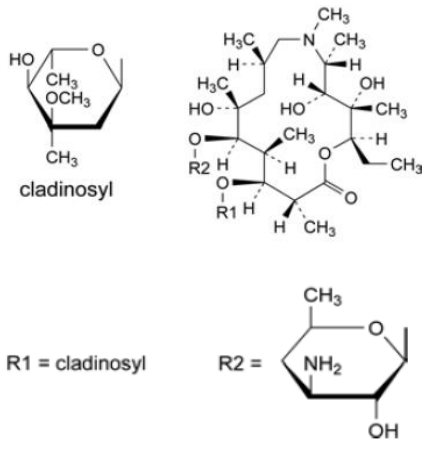
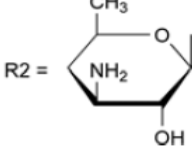
Хроматографические условия являются рекомендуемыми и при необходимости могут быть изменены для обеспечения пригодности хроматографической системы в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», раздел «Корректировка условий хроматографирования»[28].

По 50 мкл растворителя, раствора «плацебо», раствора для проверки чувствительности хроматографической системы, раствора сравнения (получая не менее трех хроматограмм), испытуемого раствора, раствора для проверки пригодности системы и раствора для идентификации пиков хроматографируют на жидкостном хроматографе высокого давления с УФ-спектрофотометрическим детектором.

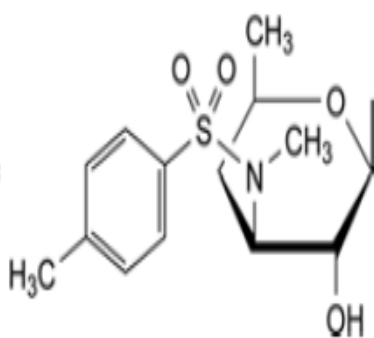
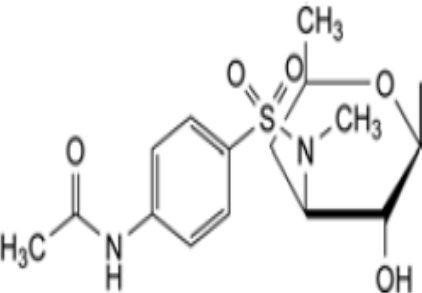
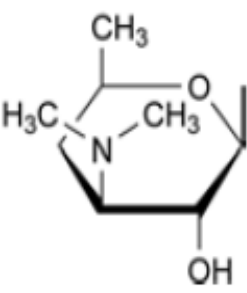
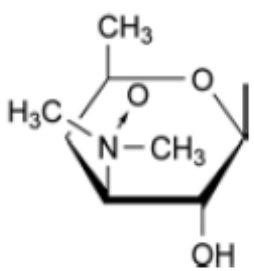
Время удерживания пика азитромицина около 45 мин (* - приводится в качестве справочной информации).

«Относительные времена удерживания пиков примесей (относительно пика азитромицина) представлены в таблице 23.

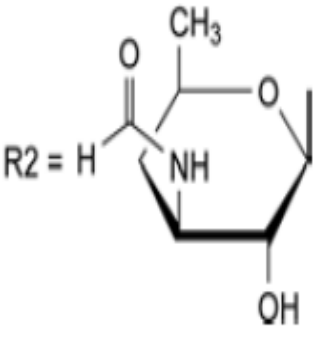
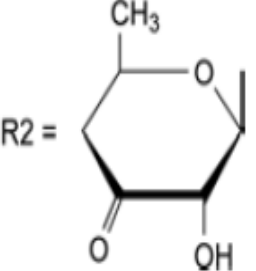
Таблица 23 - Относительные времена удерживания пиков примесей

| Наименование | RRT около |
|---|-----------|
| 1 | 2 |
| <p>Примеси А, В, С, D, F, I, О</p>  <p>А. R1–ОН, R2–R6–H, R3–R4–R5–CH₃: 6-деметилазитромицин, 0,83</p> <p>В. R1–R6–H, R2–R3–R4–R5–CH₃: 3-дезоксазитромицин (азитромицин В), 1,33</p> <p>С. R1–ОН, R2–R3–R5–CH₃, R4–R6–H: 3'-О-деметилазитромицин (азитромицин С), 0,73</p> <p>Д. R1–ОН, R2–R3–R4–CH₃, R5–CH₂OH, R6–H: 14-деметил-14-(гидроксиметил)азитромицин (азитромицин F), 0,52</p> <p>Ф. R1–ОН, R2–R4–R5–CH₃, R3–CHO, R6–H: 3'-N-деметил-3'-N-формилазитромицин, 0,49</p> <p>И. R1–ОН, R2–R4–R5–CH₃, R3–R6–H: 3'-N-деметилазитромицин, 0,58</p> <p>О. R1–ОН, R2–R3–R4–R5–R6–CH₃: 2-дезэтил-2-пропилазитромицин. 1,23</p> | |
| <p>Примесь Е</p>  <p>R1 = cladinosyl</p> <p>R2 = </p> <p>3'-(N,N-дидеметил)азитромицин (аминоазитромицин) 0,45</p> | |

Продолжение таблицы 23

| 1 | 2 |
|---|-------------|
| <p>Примесь G</p> <p>R1 = cladinosyl R2 = </p> <p>3'-N-деметил-3'-N-[(4-метилфенил)сульфонил] азитромицин</p> | <p>1,27</p> |
| <p>Примесь H</p> <p>R1 = cladinosyl R2 = </p> <p>3'-N-[[4-(ацетиламино)фенил]сульфонил]-3'-N-деметилазитромицин</p> | <p>0,79</p> |
| <p>Примесь J</p> <p>R1 = H R2 = </p> <p>13-О-декладиносилазитромицин</p> | <p>0,52</p> |
| <p>Примесь L</p> <p>R1 = cladinosyl R2 = </p> <p>азитромицин 3'-N-оксид</p> | <p>0,28</p> |

Продолжение таблицы 23

| 1 | 2 |
|--|-------------|
| <p>Примесь М</p> <p>R1 = cladinosyl R2 = H</p>  <p>3'-(N,N-дидеметил)-3'-N-формилазитромицин</p> | <p>0,41</p> |
| <p>Примесь N</p> <p>R1 = cladinosyl R2 =</p>  <p>3'-де(диметиламино)-3'-оксоазитромицин</p> | <p>0,76</p> |
| <p>Примесь Р</p> <p>неизвестная структура</p> | <p>0,92</p> |

Для идентификации пиков примесей А, В, С, Е, F, G, I, J, L, М, N, О, Р используют типовую хроматограмму, прилагаемую к СО азитромицина для идентификации пиков и хроматограмму раствора для идентификации пиков»[39].

Для идентификации пика примеси Н используют типовую хроматограмму, прилагаемую к СО азитромицина для проверки пригодности хроматографической системы и хроматограмму раствора для проверки пригодности системы.

Результаты испытания считаются достоверным, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы».

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если:

а) на хроматограммах раствора сравнения выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика азитромицина не более 2,0;
- относительное стандартное отклонение площади, рассчитанное

для пика азитромицина, не более 5,0 %.

б) на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы отношение сигнал/шум для пика азитромицина не менее 10,0.

в) на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы отношение высоты пика примеси J к высоте самой низкой точки кривой, соединяющей этот пик с пиком примеси F, не менее 1,4.

Для правильной оценки содержания примесей умножают площади пиков следующих примесей на соответствующий поправочный коэффициент (n): примесь F – 0,3; примесь G – 0,2; примесь H – 0,1; примесь L – 2,3; примесь M – 0,6; примесь N – 0,7. Для других примесей n = 1.

Содержание любой единичной примеси в препарате в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times n \times 25 \times G \times P \times 100}{S_0 \times 100 \times a \times L \times K} = \frac{S \times a_0 \times n \times G \times P \times 25}{S_0 \times a \times L \times K}, \quad (19)$$

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

S_0 – площадь пика азитромицина на хроматограмме раствора сравнения;

a – навеска порошка содержащего капсул, в миллиграммах;

a_0 – навеска СО азитромицина, в миллиграммах;

G – средняя масса содержащего капсул, в миллиграммах;

L – заявленное содержание азитромицина в капсуле, в миллиграммах;

n – поправочный коэффициент для площадей пиков примесей;

P – содержание основного вещества в СО азитромицина (для EP CRS выражается в процентах и для USP RS в микрограммах на миллиграмм);

K – коэффициент учета выражения содержания основного вещества в СО азитромицина ($K = 100$ для EP CRS; $K = 1000$ для USP RS).

Сумму примесей вычисляют сложением содержания всех примесей в процентах.

На хроматограмме испытуемого раствора не учитывают пики растворителя, пики «плацебо» и пики площадь которых равна или менее площади пика азитромицина на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы (0,05 % и менее 0,05 %), а также пики, которые элюируются до пика примеси L и после пика примеси V.

Примесь В – не более 2,0 %. Примесь G – не более 2,0 %. Примеси А, С, Е, F, H, I, L, M, N, O, P – не более 1,0 % каждая. Сумма примесей D и J – не более 2,0 %. Любая неидентифицированная примесь – не более 0,5 %. Сумма примесей – не более 5,0 %[29].

Специфичность

«В условиях валидируемой методики хроматографируют следующие растворы: растворитель, раствор плацебо, испытуемый раствор, раствор для идентификации пиков.

Для подтверждения специфичности методики, заключающейся в возможности точно и специфично провести исследование искомого вещества при отсутствии интерференции пиков растворителя и компонентов плацебо, анализируют хроматограммы раствора «плацебо», растворителя, отмечая наличие пиков с временами удерживания, совпадающими с временами удерживания пиков азитромицина и примесей А, В, С, Е, F, G, I, J, L, М, N, O, P на хроматограмме раствора для идентификации пиков.

Проводят измерение времени удерживания (t_R) пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора и раствора для идентификации пиков»[39].

«Критерии приемлемости

1. На хроматограммах раствора плацебо, растворителя должны отсутствовать пики с временами удерживания, совпадающими с временами удерживания пиков азитромицина и примесей А, В, С, Е, F, G, I, J, L, М, N, O, P на хроматограмме раствора для идентификации пиков;

2. Отклонение времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора от времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора для идентификации пиков не должно превышать 2 %.

Результаты занесены в таблицу 24.

Таблица 24 - Валидация специфичности аналитической методики определения родственных примесей

| |
|---|
| Специфичность времени удерживания (t_R) пика азитромицина |
| 1 |
| t_R пика на хроматограмме раствора для идентификации пиков, мин (А) |
| 46,668 |
| t_R пика на хроматограмме испытуемого раствора, мин (Б) |
| 47,489 |
| Отклонение t_R пика, % |
| 1,73 |

Продолжение таблицы 24

| 1 | |
|---|-------------|
| Наличие пиков с t_R , совпадающим с t_R азитромицина и примесей А, В, С, Е, F, G, I, J, L, М, N, О, Р на хроматограмме раствора для идентификации пиков | |
| На хроматограмме раствора «плацебо» | отсутствуют |
| На хроматограмме растворителя | отсутствуют |

Заключение

Методика определения родственных примесей методом ВЭЖХ является специфичной, т.к.:

- на хроматограммах раствора плацебо, растворителя отсутствуют пики с временами удерживания, совпадающими с временами удерживания пиков азитромицина и примесей А, В, С, Е, F, G, I, J, L, М, N, О, Р на хроматограмме раствора для идентификации пиков;

- отклонение времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора от времени удерживания пика азитромицина на хроматограмме раствора для идентификации пиков не превышает 2 %»[39].

Проверка пригодности хроматографической системы

Выполняют проверку пригодности согласно НД.

Критерии приемлемости

«Хроматографическая система считается пригодной, если:

а) на хроматограммах раствора сравнения выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика азитромицина не более 2,0;
- относительное стандартное отклонение площади, рассчитанное для пика азитромицина, не более 5,0 %.

б) на хроматограмме раствора для проверки чувствительности хроматографической системы отношение сигнал/шум для пика азитромицина не менее 10,0.

б) на хроматограмме раствора для проверки пригодности хроматографической системы отношение высоты пика примеси J к высоте самой низкой точки кривой, соединяющей этот пик с пиком примеси F, не менее 1,4. Результаты занесены в таблицу 25.

Таблица 25 - Проверка пригодности хроматографической системы

| На хроматограмме раствора сравнения | |
|---|------|
| Относительное стандартное отклонение площади пика азитромицина (RSD) | 0,6 |
| Фактор асимметрии пика азитромицина (A_s) | 0,87 |
| На хроматограмме раствора ППХС | |
| Отношение высоты пика примеси J к высоте самой низкой точки кривой, соединяющей этот пик с пиком примеси F. | 2,3 |
| На хроматограмме раствора ПЧХС | |
| Отношение сигнал/шум для пика азитромицина | 30,5 |

Заключение

Условия пригодности хроматографической системы выполнены»[39].

Предел количественного определения

Готовят растворы, содержащие азитромицин при номинальной концентрации, начиная с 0,01 % рабочей концентрации; растворы хроматографируют в условиях, описанных в разделе «Родственные примеси». Рассчитывают отношение сигнал/шум.

Для концентрации, при которой отношение сигнал/шум (S/N) ≥ 10 , готовят пять растворов, хроматографируют, рассчитывают относительное стандартное отклонение (RSD).

Критерий приемлемости

«При соотношении сигнал-шум (S/N) ≥ 10 , концентрация образца равна пределу количественного определения при значении $RSD \leq 5,0$ %.

Результаты занесены в таблицу 26.

Таблица 26 - Предел количественного определения

| № п/п | Концентрация модельного раствора, мкг/мл | Отношение сигнал/шум | Площадь пика азитромицина | RSD (%) | Концентрация, % относительно содержания основного вещества в испытуемом растворе (около) |
|-------|--|----------------------|---------------------------|---------|--|
| 1 | 4,0 | 31,2 | 11404 | 3,37 | 0,05 % |
| 2 | 4,0 | 30,5 | 11057 | | |
| 3 | 4,0 | 29,3 | 10731 | | |
| 4 | 4,0 | 29,8 | 10854 | | |
| 5 | 4,0 | 28,6 | 10422 | | |

Заклучение

Предел количественного определения азитромицина составил 4,0 (концентрация раствора мкг/мл) при среднем значении RSD = 3,37 %»[39].

Прецизионность

Прецизионность аналитического метода оценивают по результатам не менее шести определений для образцов с содержанием определяемого вещества, близким к номинальному.

Готовят шесть растворов сравнения согласно разделу «Родственные примеси». Проводят анализ в условиях валидируемой методики, вычисляют относительное стандартное отклонение (RSD).

Для оценки внутрिलाбораторной прецизионности анализ проводит другой аналитик в другой день на том же оборудовании.[31]

$$RSD(\%) = \frac{\sqrt{\frac{\sum_i^n S_i^2 - n\bar{S}^2}{n-1}}}{\bar{S}} \times 100 \quad (20)$$

где, n - объем выборки = 6 – для оценки повторяемости, 12 – для оценки внутрिलाбораторной прецизионности;

S - площадь пика азитромицина на хроматограмме раствора сравнения;

\bar{S} - средняя площадь пика азитромицина на хроматограмме раствора сравнения.

Критерии приемлемости

«Относительное стандартное отклонение (RSD)

Повторяемость - не более 5,0 %;

Внутрилабораторная прецизионность – не более 10,0 %

Результаты занесены в таблицу 27.

Таблица 27 - Валидация прецизионности методики определения родственных примесей

| № раствора | Площадь пика азитромицина | |
|---|---------------------------|---------------|
| | Исполнитель 1 | Исполнитель 2 |
| 1 | 225154 | 227549 |
| 2 | 224796 | 221364 |
| 3 | 227496 | 227159 |
| 4 | 226214 | 224551 |
| 5 | 224154 | 225614 |
| 6 | 223104 | 221317 |
| Среднее значение | 225153 | 224592 |
| RSD _{n=6} , % (повторяемость) | 0,69 | 1,22 |
| RSD _{n=12} , % (внутрилабораторная прецизионность) | | 0,95 |

Заключение

Прецизионность соответствует требованиям»[39].

Правильность, линейность и диапазон

Готовят 5 модельных растворов по следующей методике:

Исходные растворы.

Соответствующие навески азитромицина дигидрата, указанные в таблице 26, помещают в мерные колбы вместимостью 100 мл, прибавляют около 60 мл смеси растворителей, обрабатывают ультразвуком в течение 15 мин, охлаждают раствор до комнатной температуры, доводят объем раствора смесью растворителей до метки и перемешивают. Растворы используют свежеприготовленными.

Модельные растворы.

«В таблице 28 приведены использованные навески для приготовления модельных растворов.

Таблица 28 – Навески смеси плацебо

| № раствора | Азитромицина дигидрат, мг | Смесь плацебо, мг | Концентрация раствора (X) в % от теоретической по проекту НД |
|------------|---------------------------|-------------------|--|
| 1 | 10,6 | 115,8 | 0,05 (ПКО) |
| 2 | 42,5 | 115,8 | 0,2 |
| 3 | 106,3 | 115,8 | 0,5 |
| 4 | 170,0 | 115,8 | 0,8 |
| 5 | 212,5 | 115,8 | 1,0 |
| 6 | 255,0 | 115,8 | 1,2 |
| 7 | 318,8 | 115,8 | 1,5 |
| 8 | 425,0 | 115,8 | 2,0 |
| 9 | 510,0 | 115,8 | 2,4 |

Соответствующие навески смеси плацебо помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют около 20 мл смеси растворителей, обрабатывают ультразвуком в течение 30 мин, охлаждают до комнатной температуры, добавляют 1,0 мл исходного раствора. Доводят объем раствора смесью растворителей до метки, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. Раствор используют свежеприготовленным»[39].

Хроматографируют полученные модельные растворы и раствор сравнения в условиях, описанных в разделе «Родственные примеси»

Для оценки правильности определяют степень соответствия между известным истинным значением и значением, полученным по данной методике.

Правильность методики определяем величиной отношения «найденного» к «введенному».

$$\text{Правильность}(\%) = \frac{Y_i}{x_i} \times 100 \quad (21)$$

где Y_i – найдено в % к концентрации раствора сравнения;

X_i – введено в % от концентрации раствора сравнения;

$$Y_i = \frac{S_i \times a_0}{S_0 \times a_i} \times V \times 100 \quad (22)$$

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

S_0 – среднее значение площади азитромицина на хроматограмме раствора сравнения;

a_i – фактическая навеска субстанции азитромицина дигидрата для приготовления модельного раствора, мг;

a_0 – фактическая навеска СО азитромицина дигидрата для приготовления раствора сравнения, мг;

V – коэффициент, учитывающий концентрации и разведение растворов.

$$X_i = \frac{C_{\text{факт}}}{C_{\text{теор}}} \times 100\% \quad (23)$$

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

$C_{\text{теор}}$ – теоретическая концентрация раствора сравнения по НД, мг/мл.

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

$$r^2 = \left(\frac{n \sum_1^n (x_i \times y_i) - \sum_1^n x_i \times \sum_1^n y_i}{\sqrt{[n \times \sum_1^n x_i^2 - (\sum_1^n x_i)^2] \times [n \times \sum_1^n y_i^2 - (\sum_1^n y_i)^2]}} \right)^2 \quad (24)$$

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.

Результаты занесены в таблицу 29

Таблица 29 - Валидация правильности, линейности метода ВЭЖХ раздела «Родственные примеси»

| Р-р №1 | Р-р №2 | Р-р №3 | Р-р №4 | Р-р №5 | Р-р №6 | Р-р №7 | Р-р №8 | Р-р №9 |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Площадь пика азитромицина на хроматограмме раствора сравнения (S_0) | | | | | | | | |
| 225815 | | | | | | | | |
| Площадь пика азитромицина на хроматограмме модельного раствора (S) | | | | | | | | |
| 11275 | 44335 | 113684 | 182892 | 226337 | 266401 | 338829 | 449734 | 535742 |
| Навеска СО азитромицина дигидрата для приготовления раствора сравнения, мг (a) | | | | | | | | |
| Навеска субстанции азитромицина дигидрата для приготовления модельного раствора, мг (a_0) | | | | | | | | |
| 10,52 | 42,58 | 106,37 | 169,87 | 212,55 | 255,03 | 318,84 | 425,06 | 510,04 |
| Концентрация модельного раствора в % от теоретической по НД, % (X) | | | | | | | | |
| 0,05 (ПКО) | 0,2 | 0,5 | 0,8 | 1,0 | 1,2 | 1,5 | 2,0 | 2,4 |
| Коэффициент, учитывающий концентрации и разведение модельных растворов (V) | | | | | | | | |
| 1,25 | 5 | 12,5 | 20 | 25 | 30 | 37,5 | 50 | 60 |
| Введено, % (X) | | | | | | | | |
| 4,95 | 20,04 | 50,06 | 79,94 | 100,02 | 120,01 | 150,04 | 200,03 | 240,02 |
| Найдено, % (Y) | | | | | | | | |
| 5,08 | 19,76 | 50,70 | 81,72 | 101,03 | 118,93 | 151,24 | 200,77 | 239,18 |
| Правильность, % | | | | | | | | |
| 102,71 | 98,60 | 101,29 | 102,23 | 101,01 | 99,10 | 100,79 | 100,37 | 99,65 |
| Линейность и диапазон | | | | | | | | |
| Квадрат коэффициента линейной корреляции | | | | | | | | |
| 0,9998 | | | | | | | | |

Заключение

Правильность составила 98,60-102,71 %, что не выходит за пределы допустимого диапазона (97-103 %). Квадрат коэффициента линейной

корреляции составил 0,9998, линейность подтверждена в рассматриваемом диапазоне»[39].

Робастность

Готовят 3 раствора сравнения и 3 испытуемых раствора в соответствии с требованиями раздела НД «Родственные примеси».

Растворы проверяют после хранения при комнатной температуре в течение 8 ч (две точки измерения: сразу после приготовления ($S_{нач}$) и через 8 ч (S_i)).

Критерии приемлемости

«В случае выполнения указанных ниже соотношений растворы считаются стабильными:

$$\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100 \leq 2,0\% \quad (25)$$

где S_i – площадь пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора (раствора сравнения) в i -ый момент времени;

$S_{нач}$ – площадь пика азитромицина на хроматограмме испытуемого раствора (раствора сравнения) в начальный момент времени.

Результаты занесены в таблицу 30.

Таблица 30 - Стабильность растворов

| Стабильность растворов. | | | |
|--|--|-----------------------------|--|
| Наименование, № раствора Время | Сразу после приготовления, ($S_{нач}$) | Через 8 часов, (S_i) | Разница в содержании $\frac{S_i - S_{нач}}{S_{нач}} \times 100, \%$ |
| Раствор сравнения №1 | 225154 | 227121 | 0,87 % |
| Раствор сравнения №2 | 224796 | 226328 | 0,68 % |
| Раствор сравнения №3 | 227496 | 224054 | 1,51 % |
| Испытуемый раствор № 1 | 28770208 | 29084785 | 1,09 % |
| Испытуемый раствор № 2 | 29055142 | 28845793 | 0,72 % |
| Испытуемый раствор № 3 | 28832659 | 28469874 | 1,26 % |

Заключение

Растворы сравнения и испытуемые растворы выдерживают требования по стабильности в течение 8 часов»[39].

Выводы по 2 разделу

Проверена корректная работа предлагаемой методики высокоэффективной жидкостной хроматографии методом валидации аналитических методик по этапам: «Описание», «Подлинность», «Растворение», «Родственные примеси», «Вода», «Микробиологическая чистота», «Однородность дозирования», «Количественное определение», «Упаковка», «Маркировка», «Хранение», «Срок годности». Все этапы, выполнены в полном объеме. Отклонений не выявлено. Результаты валидации аналитических методик считаются удовлетворительными.

Аналитические методики с использованием ВЭЖХ валидированы и дают точные, достоверные результаты анализа.

3 Технологическая часть

3.1 Технология производства лекарственного препарата

«Азитромицин капсулы 250 мг» производителя ООО «ОЗОН».

3.1.1 Развешивание сырья

Процесс развешивания сырья осуществляют в помещении развешивания сырья участка твердых нестерильных лекарственных форм.[32]

В отдельные технологические емкости на весах последовательно отвешивают компоненты (кг):

Таблица 31 – Количество компонентов для приготовления смеси

| Компонент | Количество |
|--------------------------------------|------------------|
| Азитромицина дигидрат | 14,559х20 частей |
| Целлюлоза микрокристаллическая (МКЦ) | 5,746х20 частей |
| Крахмал кукурузный | 36,878 |
| Повидон | 0,329х20 частей |
| Магния стеарат | 8,759 |

При взвешивании контролируется внешний вид сырья на отсутствие механических включений согласно требованиям спецификации. Развешивание сырья осуществляется согласно нормативной документации предприятия.

3.1.2 Сушка крахмала

Сушку крахмала кукурузного осуществляют на установке СГ-30М (СГ).

Перед началом процесса подготавливают сушилку-гранулятор к работе, набирают требуемую программу согласно рецепта, указанного в маршрутной карте:

- частота встряхивания рукавных фильтров – 2 Гц;
- периодичность встряхивания рукавных фильтров при сушке – 120 сек;
- время встряхивания – 3 сек;
- температура входящего воздуха – 90 °С;
- время сушки – 53 мин.

После включения вентилятора продукт в камере (резервуаре) псевдоожижается. Интенсивность псевдоожижения устанавливают вручную путем изменения расхода воздуха заслонкой за счет поворота регулировочной рукоятки, которая находится на боковой поверхности сушилки. Картину «кипения» продукта наблюдают через смотровое окно. Расход воздуха устанавливают таким образом, чтобы «кипящий» слой продукта находился в пределах резервуара и унос частиц в фильтр должен быть минимальным. Псевдоожижение и сушка осуществляется потоком воздуха, создаваемым вентилятором. Воздух, поступающий в камеру псевдоожижения, предварительно очищается воздушным фильтром и нагревается до заданной температуры калорифером.

В процессе работы рукавный фильтр периодически по программе встряхивается, накопленный в нем продукт возвращается в резервуар.

Сушка крахмала кукурузного происходит до получения остаточной влажности 1,5 %.

Производится контроль внешнего вида крахмала кукурузного на отсутствие механических включений.

Выгруженный в подготовленную технологическую емкость крахмал кукурузный сушеный пропускают через гранулятор (Г), на котором устанавливают сетку с диаметром 1,0 мм и суммарную высоту шайб 16-17 мм. Скорость вращения шнека 4-5 ед.

Полученный после калибровки крахмал кукурузный развешивают на 20 частей по 1,537 кг, каждую емкость маркируют карточкой «Производство» и передают на стадию смешения [33].

3.1.3 Калибровка АФС

Заранее подготовленные на одну часть азитромицина дигидрата в количестве 14,559 кг, пропускают через гранулятор (Г), на котором устанавливают сетку с диаметром 1,0 мм и суммарную высоту шайб 16-17 мм. Скорость вращения шнека 4-5 ед.

Полученный после калибровки азитромицина дигидрата взвешивают, маркируют карточкой «Производство» и передают на смешения.

3.1.4 Смешение

Процесс смешения осуществляют в смесителе ЦП-600-01.

В смеситель (См) загружают калиброванный азитромицина дигидрата в количестве 14,559 кг, целлюлозу микрокристаллическую в количестве 5,746 кг, крахмал кукурузный сушеный в количестве 1,537 кг и повидон в количестве 0,329 кг. Закрывают камеру смесителя крышкой и прижимают откидными зажимами, включают электродвигатель. Компоненты перемешивают в смесителе, в течение 30 сек. По истечении времени перемешивания выключают смеситель. Не менее чем через 3 мин открывают и отводят пробку смесителя в сторону, закрепляют выгрузной патрубком. Под разгрузочное устройство подставляют приемную емкость, куда выгружают содержимое смесителя.

Гранулировщик контролирует внешний вид смеси на отсутствие механических включений.

Технологическую операцию смешения повторяют 20 раз. Смесь, полученную в результате прохождения этой операции, передают на стадию смешения и опудривание [34].

3.1.5 Смешение и опудривание

Операцию смешения и опудривание осуществляют в двухконусном смесителе DVC 1000.

К технологическим отверстиям на крышке подсоединяют шлангами вакуумный загрузчик и включают его. В смеситель загружают все двадцать

частей смеси для капсулирования, отсоединяют вакуумный загрузчик и закрывают отверстия заглушками. Включают двухконусный смеситель при помощи вводного выключателя на пульте управления, при этом загорается сигнальная лампочка «Сеть». Устанавливают время перемешивания 10,0 мин и скорость вращения смесителя 15 об/мин. По истечении времени перемешивания смеситель автоматически отключится. Затем через загрузочный люк, вручную стараясь избежать пыления, загружают магния стеарат в количестве 8,759 кг. Устанавливают время опудривания 5,0 мин при той же скорости вращения смесителя. По истечении времени опудривания смеситель автоматически отключится.

Готовую опудренную смесь для капсулирования выгружают в бочки с полиэтиленовым пакетом внутри (ОП-4). Гранулировщик проверяет внешний вид смеси на отсутствие механических включений. Отбирает пробу для проведения анализа согласно спецификации, в присутствии контролера ОКК и передает ее мастеру смены. Бочки закрывают и идентифицируют карточками «Производство». После получения положительных результатов из контрольной лаборатории бочки со смесью для капсулирования передают на стадию капсулирование и обеспыливание [35].

3.1.6 Капсулирование и обеспыливание

Для наполнения желатиновых капсул используется автоматическая машина для наполнения капсул.

После того как капсулы наполнены, они подаются на установку для обеспыливания. Там они подвергаются обработке вращающимися щетками, которые удаляют пыль и одновременно полируют поверхность.

Получают первые капсулы и проверяют их качество на соответствие спецификации.

Азитромицин капсулы 250 мг расфасовывают 3, 6 капсул в контурную ячейковую упаковку из пленки поливинилхлоридной и фольги алюминиевой печатной лакированной согласно ФСП.

Получают несколько блистеров с капсулами и проверяют на соответствие спецификации.

Все упаковки (блистера), вырезанные на станции вырубki, удерживаются вакуумной присоской. Вакуумная присоска удерживает блистеры и помещает на ленту конвейера. Бракованные упаковки во время процесса транспортировки сдуваются сжатым воздухом и падают в контейнер для бракованных блистеров [36].

3.1.7 Фасовка капсул в контурную ячейковую упаковку

Машинист РУМ 1 категории, мастер смены и контролер ОКК проверяет внешний вид капсул на соответствие продукта согласно маршрутной карте.

Капсулы фасуют в контурную ячейковую упаковку на блистеровочной машине НМ-400R.

Перед началом работы проверяют работу приточной и вытяжной вентиляции, внешним осмотром чистоту рабочего места, отсутствие посторонних предметов, капсул других наименований и наличие свободного доступа для обслуживания линии.

Проверяют внешним осмотром чистоту бункера термосклеивающих и формующих плит, вырубного штампа.

Проверяют внешним осмотром исправность контрольно-измерительных приборов.

Открывают вентили на линии сжатого воздуха.

Включают главный выключатель на задней стенке крышки.

При включении электропитания на сенсорном экране отображается экран пользователя. На данном экране настраивают скорость машины 179 пар блистеров в мин., температура формования 120-140 °С и склейки 100-200 °С, тип продукта.

Для заправки ПВХ в машину входят в режим «Изменения механического формата».

Вручную устанавливают бобину с пленкой ПВХ, закрепляют, протягивают через натяжные ролики и формовочную плиту до протяжного барабана формовки. Формуют ПВХ до протяжного барабана склейки.

Для заправки фольги в машину входят в меню блистера включают режим «Верхнего закрытия склейки».

Вручную устанавливают и закрепляют бобину с фольгой, протягивают через натяжные ролики и склеивающую плиту до протяжного барабана склейки. Склеивают фольгу с ПВХ и протягивают ленту до вырубного штампа через маркировочный узел и барабан протяжки вырубного штампа. На узле маркировки устанавливают серию фасуемого сырья.

Включают блистер упаковщик, получают несколько контурных ячейковых упаковок, проверяют их качество и выключают линию. Затем включают подачу продукта.

Азитромицин капсулы 250 мг расфасовывают 3, 6 капсул в контурную ячейковую упаковку из пленки поливинилхлоридной и фольги алюминиевой печатной лакированной согласно ФСП.

Получают несколько блистеров с капсулами и проверяют на соответствие спецификации.

Все упаковки (блистера), вырезанные на станции вырубки, удерживаются вакуумной присоской. Вакуумная присоска удерживает блистеры и помещает на ленту конвейера. Бракованные упаковки во время процесса транспортировки сдуваются сжатым воздухом и падают в контейнер для бракованных блистеров. В течение процесса фасовки в блистер машинист РУМ, мастер смены и контролер ОКК контролируют качество полученных блистеров на соответствие с периодичностью, прописанной в спецификации. Мастер смены проверяет средний вес блистера, который должен соответствовать нормам расхода сырья и упаковочных материалов.

3.1.8 Фасовка капсул в банки из полиэтилентерефталата

Азитромицин капсулы 250 мг могут быть расфасованы на электронном промышленном счетчике (МС). Перед началом работы проверяют работу приточной и вытяжной вентиляции, внешним осмотром чистоту рабочего места, отсутствие посторонних предметов, капсул других наименований и наличие свободного доступа для обслуживания линии.

Проверяют внешним осмотром чистоту бункера.

Проверяют исправность движущихся частей автомата.

Проверяют исправность контакта защитного заземления наружным осмотром.

Проверяют внешним осмотром наличие ограждений.

Удостовериться, что индикаторы вибратора и поворотного стола находятся на нуле.

Подключают электросчетчик и задают необходимое количество на индикаторах, нажимают кнопку включения.

Закрывают отверстие бункера, засыпают вручную в бункер капсулы, закрывают крышку, открывают отверстие бункера таким образом, чтобы обеспечить расстояние, соответствующее приблизительно 1,5 диаметра капсулы. Регулируют загрузочные направляющие.

Дефлектор для капсул должен быть настроен таким образом, чтобы обеспечивался проход капсул в один ряд.

Получают несколько банок с капсулами, проверяют правильность подсчета капсул вручную каждые 20 мин.

По 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54 или 60 капсул в банки из полиэтилентерефталата или банки полимерные для лекарственных средств.

Свободное пространство в банке заполняют ватой медицинской гигроскопической.

На банку наклеивают этикетку на основе самоклеящейся пленки или этикетку из бумаги этикеточной.

3.1.9 Упаковка в пачки и гофроящики

Упаковка в пачки контурных ячейковых упаковок, расфасованных на блистеровочной машине НМ-400R производится на картонажной машине HANA-300 (КМ).

Подача блистеров на картонажную машину осуществляется в автоматическом режиме. По конвейеру блистера поступают с сопряженной машины, попадают в магазин «STEKERa». Затем блистера подаются на конвейер транспортирования продукта. Наличие необходимого количества продукта на транспортере дает разрешение на подачу инструкции и картонной упаковки. Инструкция формируется ГУКом, при выходе из ГУКа проверяется фарм-код с обеих сторон инструкции. Картонная упаковка раскрывается механизмом забора пачек и укладывается на транспортер. После чего, толкатель вводит инструкцию с блистером в пачку. В случае отсутствия инструкции и/или пачки, продукты отбраковываются в отдельные емкости. После ввода блистера и инструкции, проверяется правильность фарм-кода упаковки, затем пачка маркируется и проходит через узел закрытия боковых клапанов. Если какой-либо из фарм-кодов не соответствует заданному, пачка отбраковывается в контейнер для брака, кондиционные пачки подаются на выгружающий транспортер и подаются на стол готовой продукции.

Помощник машиниста РУМ укладывает пачки в ящики из гофрокартона, наклеивает групповые этикетки в количестве, указанном в маршрутной карте.

Капсулы Азитромицин 250 мг, расфасованные в контурные ячейковые упаковки на машине для блистерных упаковок НМ-400R и в банки из полиэтилентерефталата на счетной машине, упаковывают также вручную или на полуавтоматическом картонере.

Перед началом работы машинист РУМ 2, 3 категории, укладчик продукции мед. назначения, мастер смены и контроллер ОКК выборочно

просматривают внешний вид контурных ячейковых упаковок и картонных пачек.

Одну банку или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 контурных ячейковых упаковок вместе с инструкцией по применению помещают картонную упаковку (пачку).

В соответствии с маршрутной картой укладчик продукции мед. назначения, мастер смены и контролер ОКК проверяют маркировку на пачке, которая должна соответствовать названию препарата, номеру серии и сроку годности.

Маркировка на пачку наносится с помощью маркировочного устройства или маркировочного принтера. Перед началом работы принтера проверяется рабочее место, которое должно быть освобождено от посторонних предметов и подготовлено к штампу соответствующего препарата и серии.

Ручку регулировки, расположенной в боковой части принтера, необходимо проворачивать до тех пор, пока не станет отчетливо виден штамп, выступающий из маркировочного ролика.

Затем необходимо ослабить соответствующие крепежные болты, поворачивая их по направлению против часовой стрелки, и установить маркировку в соответствии с маршрутной картой. Затянуть крепежные болты. Уложить пачки в магазин принтера. Нажать на кнопку «ПУСК» и установить необходимую скорость. Пачки с помощью толкателя попадают на ремни транспортера и перемещаются к маркировочному ролику. Методом теснения на соответствующем клапане пачки наносится маркировка.

После упаковки пачки в количестве, согласно маршрутной карте, укладывают в групповую тару, проклеивают этикеткой контроля первого вскрытия, фирменным скотчем. На внешней стороне групповой тары приклеиваются групповые этикетки. Количество и качество групповой тары, упаковку и маркировку проверяет мастер смены.[37]

Перед укладкой контурных ячейковых упаковок на полуавтоматический картонер машинист РУМ 3 кат. изначально укладывает картонные пачки, сложенные инструкции в накопитель и устанавливает штампы для маркировки согласно маршрутной карте. Верхняя сторона картонной пачки с открытым клапаном проходит через маркировочный узел. После этого в открытую картонную упаковку вкладывается инструкция, и машинист РУМ вручную укладывает нужное количество блистеров или банок. Затем закрытая картонная упаковка направляется на станцию выхода, где аппаратчик полукартонера складывает готовые пачки в гофроящики.

После упаковки готовую продукцию передают на склад промежуточного хранения.

Склад промежуточного хранения укладывает на поддон гофроящики согласно «схеме укладки», опоячивают их и сдает на центральный склад со статусом «КАРАНТИН».

Далее контролер ОКК складского комплекса проводит выходной контроль готовой продукции согласно требованиям спецификации. После получения положительного результата выходного контроля статус на готовую продукцию меняется на «ПРОПУЩЕНО», если результат выходного контроля отрицательный, то меняется на статус «БРАК»[38].

Потери на стадии упаковки составляют 1 %.

Общий выход Азитромицина капсул 250 мг составляет 96 %.

3.2. Влияние технологии производства на качество азитромицина

В ходе эксперимента были проанализированы различными методами 2 серии препарата, заложенные на стабильность в период срока хранения 1,5 года (1 серия) и 2,5 года (2 серия). В ходе исследований выявлен рост примеси «Р» в результате хранения

Проанализировав технологию производства, было выявлено, что влияние влаги и температуры на появление примеси может возникнуть на стадии «сушки крахмала». Для определения влияния температуры сушки крахмала на рост примесей в процессе хранения лекарственного препарата были проведены эксперименты с изменения температуры и времени сушки. Эксперименты были заложены на изучения стабильности примеси «Р». Условия эксперимента представлены в таблице 32.

Таблица 32 - Характеристики эксперимента

| Параметры | Эксперимент 1 | Эксперимент 2 | Эксперимент 3 |
|--|---------------|---------------|---------------|
| частота встряхивания рукавных фильтров | 2 Гц | 2 Гц | 2 Гц |
| периодичность встряхивания рукавных фильтров при сушке | 120 сек | 120 сек | 120 сек |
| время встряхивания | 3 сек | 3 сек | 3 сек |
| температура входящего воздуха | 90 °С | 80 °С | 70 °С |
| время сушки | 53 мин | 60 мин | 69 мин |

Время сушки определялось экспериментальным путем до получения остаточной влажности 1,5 %.

Все 3 эксперимента были заложены на изучения стабильности. Ускоренные исследования проводились при 30 °С в инкубаторе с естественной конвекцией BinderBD115.

Данные по стабильности примеси «Р» эксперимента представлены в таблице 33.

Таблица 33 - Данные по стабильности примеси «Р»

| Номер эксперимента | Исходные данные | Через 6 мес (в пересчете на естеств.) | Через 1 год (в пересчете на естеств.) |
|-----------------------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Эксперимент 1 (90 °С) | н/о | 0,086 | 0,138 |

Продолжение таблицы 33

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|--------------------------|-----|-------|-------|
| Эксперимент 2 (80 °С) | н/о | 0,029 | 0,064 |
| Эксперимент 3 (70 °С) | н/о | 0,03 | 0,061 |

Изучение стабильности примеси «Р» показало, что изменение температуры сушки крахмала влияет на рост ее содержания в процессе хранения. Наиболее заметный эффект наблюдался при температуре сушки крахмала 90°С.

Существенной разницы в появлении примеси между экспериментом 2 и экспериментом 3 – нет. Но время, затраченное на сушку при эксперименте 3 больше на 9 минут. Поэтому для промышленного производства препарат более экономически выгоден процесс производства с температурным режимом 80°С и временем сушки 60 минут.

Выводы по 3 разделу

Для выявления возможного влияния температуры и влажности на качество лекарственного препарата в процессе производства был проведен анализ технологического процесса. Установлено, что влияние влаги и температуры на появление примеси «Р» может возникнуть на стадии сушки крахмала.

Изучение стабильность примеси «Р» показало, что изменение температуры сушки крахмала влияет на рост ее содержания в процессе хранения. Наиболее заметный прирост наблюдался при температуре сушки крахмала 90°С.

При промышленном производстве препарата Азитромицин оптимальными параметрами процесса сушки являются:

- температурный режим 80°С;
- время сушки 60 минут.

Заключение

На примере препарата Азитромицин, который является полусинтетическим антибиотиком, рассмотрена возможность ужесточения контроля качества.

Показаны недостатки применяемых в настоящее время для количественного определения титриметрического метода и тонкослойной хроматографии для определения подлинности и родственных примесей.

Для замены этих методов контроля качества выбран метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Актуализация метода ВЭЖХ для препарата Азитромицин капсулы 250 мг проводилась по показателям: «количественное определение», «подлинность», «родственные примеси». Проведена валидация метода ВЭЖХ для контроля качества препарата Азитромицин. Аналитические методики валидированы и дают точные, достоверные результаты анализа.

Метод ВЭЖХ позволил идентифицировать 15 видов родственных примесей, определить любую неидентифицированную примесь, также сумму примесей, тогда как метод тонкослойной хроматографии позволяет определять только 4 показателя по содержанию неидентифицированных примесей.

Актуализация методов контроля качества лекарственного препарата Азитромицин капсулы 250 мг дает возможность более точно проконтролировать препарат на соответствие нормативным документам.

Проведен эксперимент по влиянию технологических показателей на качество лекарственного препарата. С помощью метода ВЭЖХ был выявлен рост примеси Р в результате хранения. Исходя из полученных результатов были внесены изменения в технологический процесс, которые помогли снизить рост примеси Р и сделать процесс производства препарата более экономичным.

Список используемой литературы и используемых источников

1. Антониу.Т. Фармацевтическая отрасль в меняющемся мире /Т. Антониу //Ремедиум. - 2000. - №12.
2. Приказ Министерства промышленности и торговли Российской Федерации от 23 октября 2009 г. №965.
3. Полухин А. Т., Киселев А. И. Формирование и развитие производства лекарственных средств в России // Молодой ученый. - 2015-№11. - С. 944-948.
4. Чубарев В.Н. Фармацевтическая информация. Под ред. академика РАМН, док. фарм. наук, проф. А.П. Арзамасцева. М.: Вилар-Н, 2000. - 442 с.
5. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 28 декабря 2012 г. № 2579-р «Об утверждении плана мероприятий («дорожной карты»), развитие конкуренции и совершенствование антимонопольной политики».
6. ГОСТ Р52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств».
7. Федеральный закон от 22.06.1998 N 86-ФЗ (ред. от 30.12.2008) О лекарственных средствах.
8. Общий технический документ для регистрации лекарственных средств для человека. - Гармонизированное трехстороннее руководство ИСН. - Брюссель, 6-7 февраля 2002.
9. Антибактериальные лекарственные средства. Методы А72 стандартизации препаратов. - М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2004.- 944 с
10. Стандартизация и контроль качества лекарственных средств: Учебное пособие / Н.А. Тюкавкина, А.С. Берлянд, Т.Е. Елизарова и др.; Под ред. Н.А. Тюкавкиной. - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. - 384 с

11. Azithromycin. Peters D.H., Friedel H.A., McTavish D. - Drugs, 1992, Nov; 44(5):750-99. - Springer.
12. Azithromycin clinical pharmacokinetics, Lalak N.J., Morris D.L. - Clinical pharmacokinetics, Nov;25(5):370-4.1993 –Springer
13. Синтетические лекарственные средства. Яхонтов Л.И., Глушков Р.Г. Под ред. А. Г. Натрадзе. М.: Медицина, 1983. - 272 с
14. ОФС 42-0003-04 «Растворение»
15. XII Государственная фармакопея РФ - 2 часть - М: - Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2010 год.
16. Буданов, С.В. Совершенствование методологии фармацевтической (фармакопейной) экспертизы - путь к повышению качества лекарственных средств / С.В. Буданов, Н.Д. Бунятыян, В.Л. Багирова // Вестник Росздравнадзора, 2009. - № 4. - С. 66 - 70.
17. ГОСТ Р 57129-2016 Лекарственные средства для медицинского применения. Часть 1. Изучение стабильности новых фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов. Общие положения.
18. Аладышева Ж.И., Береговых В.В., Мешковский А.П. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве. Москва, 2005 г.
19. ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»
20. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Под ред. Береговых В.В. Москва, 2008 - 132 с.
21. ICH Harmonized Tripartite Guidelines. ICH Q2B «Validation of Analytical Procedures: Methodology». - ICH, Geneva, 1997
22. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology (срmp/ich/381/95) ICH Q2(R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. European Medicines Agency. 1995. [URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf)

23. Dissolution Technologies Questions and Answers. Edited by M. Marques, W. Brown. Diss. Tech: Hockessin, DE, USA. - 2010.
24. R. Hanson, V. Gray. Handbook on Dissolution Testing. 3rd edition. Diss. Tech: Hockessin, DE, USA. - 2004.
25. И.Е. Шохин, Г.В. Раменская, К.С. Давыдова. Современные подходы к валидации методик испытания «Растворение» // Химико-фармацевтический журнал. - Москва, 2011.- т. 45- №3. - С. 92-95.
26. Quantitative thin-layer chromatographic method of analysis of azithromycin in pure and capsule forms .A. Khedr, M. Sheha - Journal of chromatographic science, 2003. URL: <https://academic.oup.com>
27. USP 33 - NF 28. Monograph 1092 “The Dissolution Procedure: Development and Validation
28. Стандартизованная процедура валидации методик контроля содержания примесей в готовых лекарственных средствах методом жидкостной хроматографии / А.И. Гризодуб, Д.А. Леонтьев, Т.Н. Доценко, В.А. Загорий // Фармаком. - 2005. - № 2/3. - С. 78-94.
29. Фармацевтическая химия: Учеб. пособие для вузов: Под ред. акад. РАМН, проф. А.П. Арзамасцева. - М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. - 635 с.
30. Синтетические химико-фармацевтические препараты. Рубцов М.В., Байчиков А.Г.Справочник. - М.: Медицина, 1971. - 328 с.
31. Химия синтетических лекарственных веществ. Дайсон Г., Мей П. Перевод с англ. яз. проф. М. Л. Беленького. -М.: Мир, 1964. - 298 с.
32. Технология химико-фармацевтических препаратов и антибиотиков. Пассет Б.В., Воробьева В.Я. М.: Медицина, 1977. - 430 с.
33. А. И. Тихонов, Т. Г. Ярных. Технология лекарств. / Под редакцией академика А. И. Тихонова. - Харьков: Издательство НФАУ, 2002. - 649 с.
34. Технология лекарственных форм: т. 1 под ред. Т.С. Кондратьевой: Медицина, 1991. - 248 с.

35. Технология лекарственных форм в 2-х томах: т. 2 под ред. Л.А. Ивановой. М.: Медицина, 1991. - 544 с.
36. Чуешов В.И., Зайцев А.И., Шебанова С.Т. Промышленная технология лекарств, 2002. - 385 с.
37. Каталог технологического оборудования химико-фармацевтической промышленности: Учебное пособие для студентов вузов/ Чуешов В.
38. Шилова С.В., Пузакова С.М., Никульшина Н.И., Назаров А.Д., Граковская Л.К. Организация производства лекарственных средств с учетом правил GMP. ВНИИСЭНТИ, серия "Хим.-фарм. производство", обзорная информация. Выпуск 2.М., 1990, С. 1-26.
39. Чухутина О.А. Разработка и валидация методики определения содержания родственных примесей в лекарственном препарате «Азитромицин»./ Евразийский Союз Ученых (ЕСУ)» выпуск №1 (70)/2020: 1 часть. С.75-88.