

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

**5A510501- фармацевтическая химия и фармакогнозия
Кафедра фармацевтической химии**

**Валидация процесса очистки оборудования в производстве
цефалоспоринов**

Научный руководитель:

и/о доцент Хусаинова Р.А

Студентка магистратуры:

Махмудова Л.А.

Ташкент 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ:

| | |
|--|----|
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 4 |
| ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ | 5 |
| ГЛАВА I. ПРОБЛЕМА ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЧИСТОТЫ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА | 10 |
| 1.1. Современные требования к качеству лекарственных средств..... | 10 |
| 1.2. Перекрестное загрязнение лекарственных средств и чистота фармацевтического производства: подходы по стандартизации и унификации | 14 |
| 1.3. Аналитические методы определения лекарственных веществ при проведении фармацевтического контроля | 27 |
| ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 32 |
| 2.1. Оборудование и аппаратура. | 32 |
| 2.2. Материалы, реактивы и объекты анализа. | 33 |
| 2.3. Методы и техника эксперимента | 35 |
| ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ ЧИСТОТЫ ОБОРУДОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВА ЦЕФАЛОСПОРИНОВ | 38 |
| 3.1. Разработка способов пробоотбора и пробоподготовки анализируемых компонентов при контроле чистоты оборудования. | 39 |
| 3.2. Выбор условий разделения цефалоспоринов в обращенно-фазной ВЭЖХ..... | 47 |
| 3.3. Аналитические характеристики ВЭЖХ определения цефалоспоринов. | 53 |
| ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ВЭЖХ-МАСССПЕКТРОСКОПИЧЕСКИХ МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ ЧИСТОТЫ ОБОРУДОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВА ЦЕФАЛОСПОРИНОВ | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1. Разработка качественного обнаружения и количественного определения цефалорпаринов методом ВЭЖХ-масспектроскопии..... | 58 |
| 4.2. Контроль лекарственных веществ в смывах с оборудования методами ВЭЖХ-МС..... | 62 |
| ГЛАВА 5. ВАЛИДАЦИЯ ПРОЦЕССА ОЧИСТКИ ОБОРУДОВАНИЯ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА..... | 64 |
| 5.1. Разработка подходов по валидации процесса очистки оборудования..... | 64 |
| 5.2. Разработка программы валидации и оценка валидационных параметров. | 699 |
| ВЫВОДЫ..... | 78 |
| Литература | 80 |

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БАВ — биологически активные вещества
- ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГПХ — гель-проникающая хроматография
- ГФХ — гель-фильтрационная хроматография
- ЖХ — жидкостная хроматография
- ЖХ-МС — жидкостной хроматограф с масс — спектральным детектором
- ИПХ — ион-парная хроматография
- ЛС — лекарственное средство
- ЛВ — лекарственное вещество
- ЛФ — лекарственная форма
- МС — масс - спектральный детектор
- ВМС — высокомолекулярные соединения
- НФ — неподвижная фаза
- НД — нормативная документация
- НПВС — нестероидные противовоспалительные средства
- ОФ — обращенная фаза
- ПАВ — поверхностно-активные вещества
- ПФ — подвижная фаза
- ПрД — предел детектирования
- ПрО — предел обнаружения
- РСО — рабочий стандартный образец
- СКО — среднеквадратичное отклонение
- СОП — стандартная операционная процедура
- ТФЭ — твердофазная экстракция
- ФБ — фосфатный буфер

Министерство Здравоохранения Республики Узбекистан

Ташкентский Фармацевтический Институт

Факультет – Фармация

Резидент магистратуры – Махмудова Л,А.

Кафедра – фармацевтическая химия

Научный руководитель – доц.Хусаинова Р,А.

Учебный год – 2016-2018 г.

Специальность - 5А510501 фармацевтическая химия
и фармакогнозия

Аннотация по магистерской диссертации

Актуальность работы. Основные принципы обеспечения качества и контроля качества взаимосвязаны и имеют первостепенное значение в организации производства лекарственных средств (ЛС). Эта проблема является комплексной и ее решение требует реализации всех мер, направленных на достижение заданных требований к качеству ЛС.

В настоящее время в мировой практике одним из важнейших документов, определяющих требования к производству и контролю качества ЛС для человека и животных, являются «Правила производства ЛС» - «Good Manufacturing Practice for Medicinal Products (GMP)». Это означает, что условием обеспечения качества ЛС является их производство в соответствии с правилами GMP.

Цель работы состояла в создании комплекса высокочувствительных, избирательных и экспрессных способов химического контроля чистоты оборудования фармацевтического производства на примере цефалоспоринов при использовании хроматографических и оптических методов анализа, а также разработке подходов к валидации процесса очистки оборудования.

Научная новизна:

- найдены и обоснованы условия пробоотбора цефалоспоринов

методом мазков, смывов и их пробоподготовки при контроле чистоты оборудования;

- установлены условия ВЭЖХ и ЖХ-МС определения цефазолина, цефтриаксона и цефотаксима при использовании доступных подвижных фаз на сорбентах типа С18;

- разработана валидация аналитических методик, которые будут использоваться при внутрипроизводственном контроле и контроле готового продукта;

- разработана программа валидации процесса очистки оборудования и обосновано ее использование во внутрипроизводственном контроле химико-фармацевтического производства;

- найдены и обоснованы минимального терапевтического дозы ЛС и оптимальных методов процесса очистки оборудования.

Практическая значимость. Разработаны экспрессные и чувствительные методики хроматографического и хромато-масс спектрофотометрического определения и способы пробоотбора цефалоспоринов в смывах с оборудования химико-фармацевтического производства.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены на ООО «Jurabek Laboratories» (г. Ташкент) и в учебный процесс ВУЗ «Ташкентский Фармацевтический Институт» в дисциплине «Контроль качества лекарственных препаратов».

Научный руководитель:

доц. Хусаинова Р.А.

Резидент магистратуры:

Махмудова Л.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Основные принципы обеспечения качества и контроля качества взаимосвязаны и имеют первостепенное значение в организации производства лекарственных средств (ЛС). Эта проблема является комплексной и ее решение требует реализации всех мер, направленных на достижение заданных требований к качеству ЛС.

В настоящее время в мировой практике одним из важнейших документов, определяющих требования к производству и контролю качества ЛС для человека и животных, являются «Правила производства ЛС» - «Good Manufacturing Practice for Medicinal Products (GMP)». Это означает, что условием обеспечения качества ЛС является их производство в соответствии с правилами GMP.

В основных требованиях GMP, предъявляемых к производству ЛС, является предотвращение их перекрестного загрязнения. ЛС могут быть загрязнены другими препаратами или активными фармацевтическими субстанциями, моющими или дезинфицирующими средствами, микроорганизмами, частицами пыли, смазочными материалами, вспомогательными веществами, промежуточной продукцией и др. В то же время во многих случаях при производстве различных препаратов используется одно и то же оборудование. Поэтому для предотвращения контаминации каждого последующего препарата предыдущим или предыдущей серией того же наименования очень важным является проведение эффективной процедуры очистки оборудования, с обязательной оценкой степени его чистоты.

Все это обуславливает необходимость разработки более совершенных методов анализа лекарственных веществ (ЛВ) и вспомогательных компонентов технологических смесей для контроля перекрестного загрязнения готовой продукции, чистоты помещений и оборудования химико-фармацевтического производства. При этом сложный состав анализируемых матриц особенно при низких содержаниях ЛВ требует использования избирательных и чувствительных методов их определения. В то же время не менее значимым является требование

высокой производительности, надежности и возможности получения большого объема аналитической информации при проведении фармацевтического анализа в производственных условиях. Таким требованиям удовлетворяют хроматографические и оптические методы анализа, которые все более широко используются в аналитической практике контроля процессов химико-фармацевтического производства.

В связи с этим разработку новых высокочувствительных, экспрессных и достаточно экономичных методов химического контроля чистоты поверхности фармацевтического оборудования следует считать актуальной проблемой. Ее решение позволит в полной мере реализовать требования GMP к производству ЛС и отсюда усовершенствовать систему валидации процесса очистки оборудования. Оценка ее ключевыми валидационными параметрами является основой для установления критериев приемлемости результатов контроля внутрипроизводственных процессов химико-фармацевтического производства. Именно поэтому совершенствование путей стандартизации и контроля качества ЛС, обеспечивающих их эффективность и безопасность применения, требует соответствующей разработки, унификации и валидации методов анализа ЛС на этапах их создания, производства и потребления.

Цель работы состояла в создании комплекса высокочувствительных, избирательных и экспрессных способов химического контроля чистоты оборудования фармацевтического производства на примере цефалоспоринов при использовании хроматографических и оптических методов анализа, а также разработке подходов к валидации процесса очистки оборудования.

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:

- разработать способы и найти рабочие условия пробоотбора анализируемых компонентов при контроле чистоты оборудования, провести стандартизацию и унификацию самих процедур пробоотбора и подготовки образцов;

- обосновать условия ВЭЖХ разделения со спектрофотометрическим детектированием определяемых веществ и аналитические характеристики методик определения цефалоспоринов;

- изучить факторы, обеспечивающие чувствительность и избирательность определений ЛВ в смывах с технологического оборудования методами ВЭЖХ и хромато-масс спектрометрии, и обосновать выбор рабочих условий определения исследуемых веществ при проведении контроля чистоты химико-фармацевтических производств;

- оценить влияние компонентов анализируемой матрицы на регистрируемый аналитический сигнал и установить метрологические характеристики разработанных способов для подтверждения их соответствия требованиям, принятым для фармацевтического анализа;

- разработать подходы к валидации процесса очистки оборудования, программы валидации и провести оценку валидационных параметров.

Научная новизна:

- найдены и обоснованы условия пробоотбора цефалоспоринов методом мазков, смывов и их пробоподготовки при контроле чистоты оборудования;

- установлены условия ВЭЖХ и ЖХ-МС определения цефазолина, цефтриаксона и цефотаксима при использовании доступных подвижных фаз на сорбентах типа С18;

- разработана валидация аналитических методик, которые будут использоваться при внутрипроизводственном контроле и контроле готового продукта;

- разработана программа валидации процесса очистки оборудования и обосновано ее использование во внутрипроизводственном контроле химико-фармацевтического производства;

- найдены и обоснованы минимального терапевтического дозы ЛС и оптимальных методов процесса очистки оборудования.

Практическая значимость. Разработаны экспрессные и чувствительные методики хроматографического и хромато-масс спектрофотометрического определения и способы пробоотбора цефалоспоринов в смывах с оборудования химико-фармацевтического производства.

Предложенные способы аналитического контроля могут быть использованы в процедуре валидации процесса очистки технологического оборудования и рекомендованы для применения на химико-фармацевтических производствах. Разработанные подходы позволяют повысить эффективность обеспечения чистоты фармацевтического производства в соответствии со стандартами GMP.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены на ООО «JurabekLaboratories» (г. Ташкент) и в учебный процесс ВУЗ «Ташкентский Фармацевтический Институт» в дисциплине «Контроль качества лекарственных препаратов».

На защиту выносятся:

- способы пробоотбора цефалоспоринов методом мазков, смывов и их пробоподготовки при контроле чистоты оборудования;

- результаты исследований по хроматографическому разделению цефазолина, цефтриаксона и цефотаксима в условиях обращено-фазной ВЭЖХ и ЖХ-МС со спектрофотометрическим детектированием;

- применение предложенного алгоритма по валидации процесса очистки оборудования на основе разработанных методик и установление критериев приемлемости на примере оборудования при производстве цефалоспоринов;

- результаты исследования метрологических и валидационных характеристик разработанных способов определения, полученные путем обработки экспериментального материала, подтверждающие их соответствие требованиям, принятым для фармацевтических методов анализа.

Апробация работы. Результаты работы и основные положения диссертации были доложены и обсуждены на: IV Международной научно-практической конференции «Наука и общество в условиях глобализации» (Уфа, 2017 г.), 60 years anniversary

Acad. S.Yu.Yunusov institute of the chemistry of Plant Substances AS RUz/ 12Th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds.-Т.-2017, Научно-практической конференции «Интеграция образования, науки и производства» (Ташкент, 2017 г.) а также на кафедры фармацевтической химии, и предварительной защите Ташкентского фармацевтического института (2018 г).

Публикации: по материалам диссертации опубликовано 3 статей и 3 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, указателя литературы, включающего 173 источника. Работа изложена на 96 странице машинописного текста, иллюстрирована 18 рисунками, 21 таблицами.

ГЛАВА I. ПРОБЛЕМА ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЧИСТОТЫ ХИМИКО- ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

(обзор литературы)

1.1. Современные требования к качеству лекарственных средств

В большинстве стран лекарственный рынок регулируется государством. Всесторонняя оценка терапевтической или профилактической ценности ЛС, т.е. их эффективности и относительной безопасности (безвредности), проводится в отношении новых препаратов до начала их полномасштабного коммерческого производства [1]. Приемлемость же серийной продукции проверяется по показателям качества, т.е. по косвенным характеристикам, изложенным в фармакопейных или иных официальных стандартах. В отношении других потребительских товаров проверка приемлемости серийной продукции связана, хотя бы частично, с прямым определением потребительских свойств.

Приобретая лекарство, потребитель чаще всего не может защитить себя от потенциально опасного для здоровья и жизни товара, если таковой ему будет предложен. Он практически лишен возможности выбрать из имеющихся в продаже аналогичных товаров оптимальный для себя вариант по соотношению качество/цена. Во многих случаях он также не может и воздержаться от покупки, если не находит подходящий по этому показателю товар.

Поскольку основной вид контроля качества ЛС - разрушающий, крайне редко используется сортировка на основе 100% проверки сомнительных по качеству серий (партий) с удалением бракованных единиц продукции. По этой причине не только потребитель, но и производитель заинтересованы в том, чтобы исключить или хотя бы свести к минимуму вероятность изготовления некачественных ЛС [2].

Исходя из этих соображений во всех странах, имеющих дееспособные государственные органы здравоохранения, лекарственный рынок регулируется, прежде всего с целью обеспечить безопасность и эффективность обращающихся на нем препаратов, а также приемлемый уровень их качества.

В последние десятилетия содержание понятия "Качество фармацевтических продуктов" расширилось. Если раньше оно сводилось, в основном, к соответствию фармакопейным или иным официальным стандартам, то в настоящее время под качеством фармацевтических продуктов понимают их соответствие всем условиям регистрации по прописи, условиям изготовления (технология, производственная площадка, кадры) и свойствам. Лишь в этом случае можно рассчитывать на то, что каждое ЛС вызовет предсказуемый терапевтический или профилактический эффект [3,4].

Очевидно, следует также остановиться на различиях между понятиями "Обеспечение качества", которое лишь сравнительно недавно начало входить в обиход работников отечественного фармацевтического сектора, и более привычным "Контроль качества". "Обеспечение качества", полностью включая в себя понятие "Контроль качества" в виде одного, не самого главного компонента, нацелено на профилактику дефектов на основе комплексного подхода, и потому обращено в основном в будущее.

Высокое качество ЛС подразумевает: высокую химическую чистоту действующего вещества; точное соответствие содержания действующего вещества заявленному; высокое качество и безопасность дополнительных ингредиентов, служащих для правильного введения действующего вещества в организм; качество упаковки, соответствие реальной и заявленной даты производства, правильность транспортировки и хранения [5].

Согласно современным представлениям, необходимые потребительские свойства фармацевтических продуктов (качество, эффективность, безопасность) создаются в ходе их разработки и испытаний, поддерживаются в процессе серийного производства, а также государственного инспектирования. На каждом этапе создания, изготовления и распределения лекарства принимаются меры по недопущению ошибок и отклонений в работе, которые могут отрицательно повлиять на качество. Таким образом, можно говорить о цепочке обеспечения качества,

охватывающей весь жизненный цикл лекарственного продукта, сутью которой является непрерывность.

Неотъемлемый элемент разработки эффективной системы обеспечения качества любой продукции — четкое и всестороннее определение их общих и специфических характеристик. Можно предложить структуру понятия «качество ЛС», включающая в себя фундаментальную и прикладную составляющую (рис. 1.1) [1].



Рис. 1.1. Структура понятия «качество ЛС»

Гарантировать качество ЛС можно с помощью строгого регламентирования всех этапов так называемого «жизненного цикла» ЛС: доклинических исследований, клинических испытаний, производства и реализации. Современная международная концепция обеспечения качества ЛС заключается в разработке, утверждении и последующем регулярном контроле соблюдения правил, регламентирующих все этапы продвижения ЛС (рис. 2) [6].

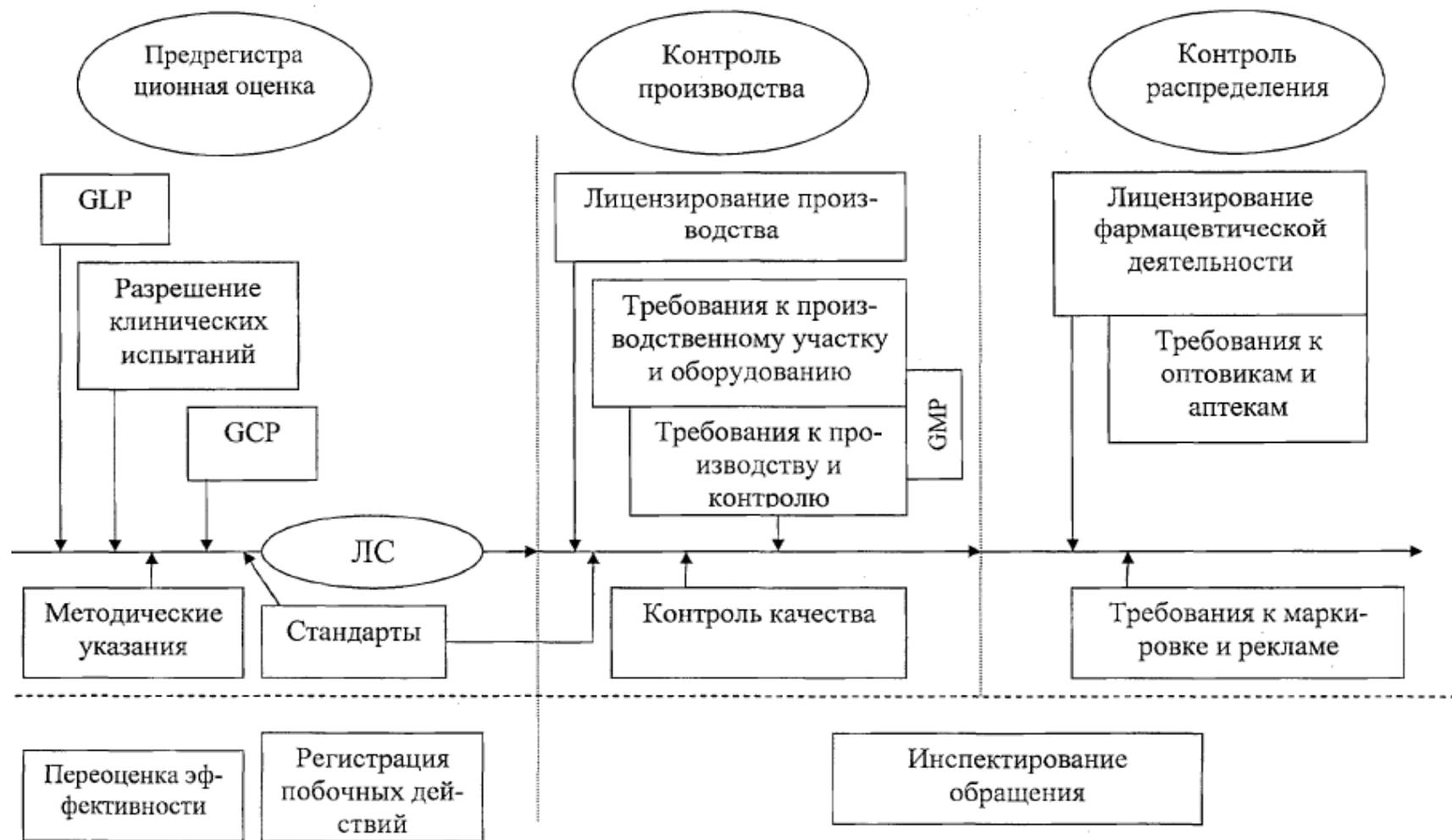


Рис. 1.2. Контрольно-разрешительная схема в фармацевтической области

Таким образом, особая значимость ЛС, связанная с непосредственным активным воздействием на организм человека, обуславливает настоятельную необходимость разработки и внедрения эффективной системы обеспечения качества ЛС. Решить проблему контроля качества ЛС возможно лишь при условии обеспечения качества на всех этапах их прохождения — начиная с производства и заканчивая прилавком аптеки.

1.2. Перекрестное загрязнение лекарственных средств и чистота фармацевтического производства: подходы по стандартизации и унификации

Сфера обращения ЛС остается зоной повышенного риска. В связи с этим большинство стран закрепляют на государственном уровне строгие меры контроля в соответствии с международными правовыми нормами. Эта позиция глобального межгосударственного взаимодействия, где присутствует единая идеология перенос акцента с контроля качества готовой продукции на обеспечение качества на всех этапах производства ЛС [6,7].

В настоящее время в мировой практике одним из важнейших документов, определяющих требования к производству и контролю качества ЛС, являются «Правила производства лекарственных средств» «GoodManufacturingPracticeforMedicinalProducts (GMP)» [4,8,9]. Необходимым условием обеспечения качества ЛС является их производство в соответствии с правилами GMP.

Правила GMP устанавливают требования к системе управления качеством, контролю качества, персоналу, помещениям и оборудованию, документации, производству продукции и проведению анализов, рекламациям, порядку отзыва продукции и организации самоинспекций [8,9].

В отличие от процедуры контроля качества путём исследования выборочных образцов ЛС, которая обеспечивает пригодность к использованию лишь самих этих образцов (и, возможно, партий, изготовленных в ближайшее к

данной партии время), стандарт GMP отражает целостный подход и регулирует и оценивает собственно параметры производства и лабораторной проверки [10,11].

GMP в комплексе со стандартами GLP (Надлежащая лабораторная практика) и GCP (Надлежащая клиническая практика) призван стандартизовать некоторые аспекты качества медицинского обслуживания населения [1,5] (см. рис. 1.2).

Российский стандарт гармонизирован с правилами GMP Европейского Союза. Соблюдение правил GMP в фармацевтическом производстве в Российской Федерации является обязательным [12,13]. Международный стандарт GMP включает в себя обширный ряд показателей, которым должны соответствовать предприятия, выпускающие ту или иную продукцию. GMP для фармацевтических предприятий определяет параметры каждого производственного этапа — от материалов и количества микроорганизмов до одежды сотрудников и маркировки, наносимой на упаковку продукции.

В настоящее время важнейшими элементами концепции GMP являются:

- соответствие всей технологической и контрольной документации на производстве содержанию регистрационного досье на соответствующий препарат;
- жесткий контроль за соблюдением правил, предполагающий не только декларированное, но и фактическое применение санкций к предприятиям-нарушителям.

На отраслевом уровне приоритетными направлениями программы перехода к работе по правилам GMP следует считать организованный пересмотр всей технологической и контрольной документации в сторону использования предприятиями только тех документов, которые соответствуют регистрационным материалам [14-17].

Для успешного развития фармацевтической отрасли и признания отечественных фармпроизводителей на международном уровне необходима

последовательная работа по обеспечению качества на всех этапах производственного цикла. В этой связи необходимо продолжать обязательный поэтапный переход на международный стандарт GMP, включив его в лицензионные требования и условия для вновь вводимых производственных площадок. Ассоциация Российских фармацевтических производителей (АРФП) поддерживает намерение Росздравнадзора по обязательному переходу на международные стандарты качества GMP начиная с 2010 года [18].

Внедрение стандарта GMP - очень дорогой, но при этом гарантирующий высокое качество лекарств проект. Практика показывает, что далеко не все компаниям по плечу этот переход. Не сумевшие модернизировать производство предприятия уходят на рынок БАДов, который, по оценкам экспертов, в России растет еще быстрее, чем рынок лекарственных препаратов [18,19].

Сегодня только около 10 % предприятий полностью работают по стандартам GMP. Это, как правило, предприятия со смешанным капиталом, а также предприятия, изначально построенные в соответствии с международными стандартами качества. Еще 40 % предприятий имеют действующую систему качества, отдельные производственные участки работают по GMP, существует план перехода на стандарты. Оставшиеся 50 % фармпредприятий не приступили к внедрению GMP, отсутствуют система обеспечения качества и программа модернизации. По данным аналитического агентства DSMGroup, из более чем 400 имеющих лицензии на производство фармкомпаний около 50 отечественных производителей занимают 80 % рынка отечественных лекарств в аптеках России. Очевидно, что потенциальное закрытие фармпредприятий, не способных обеспечить качество лекарственных средств на уровне мировых стандартов, не приведет к коллапсу российского фарм-производства [19].

Чистота помещений является одним из факторов, обеспечивающих выполнение принципиального исходного положения GMP [20]. Л С должно содержать только то, что обуславливает его терапевтическое действие.

Остальное относится к загрязнениям. В производстве ЛС решающее значение может иметь любой из трех загрязняющих факторов:

- химические загрязнения;
- биологические микроорганизмы,
- аэрозольные частицы [21].

Чистота окружающей среды и оборудования - одно из критических требований GMP. Для его выполнения служат чистые помещения. Правила GMP уделяют первостепенное внимание чистоте помещений, где производятся ЛС [22-25]. Правила GMP не устанавливают конкретных количественных требований к чистоте помещений для производства нестерильных продуктов. В то же время на них распространяется общее положение обеспечения "минимального риска загрязнения материалов и продукции". Это необходимо для обеспечения стабильности препарата, обеспечения его длительного срока годности, чтобы он не претерпевал изменения под воздействием микроорганизмов. Благодаря этому срок годности препарата может достигать 3-5 лет.

Планировочные решения рабочих зон внутри производства должны обеспечивать последовательное и логичное размещение оборудования и материалов, сводить к минимуму риск перепутывания различных ЛС или их компонентов, перекрестного загрязнения и ошибочного выполнения или пропуска любых операций по производству или контролю [26].

Одним из самых важных элементов, определяющих качество выпускаемой продукции, является оборудование для производства ЛС. Оборудование не должно представлять никакой опасности для продукции. Части оборудования, соприкасающиеся с продукцией, не должны выделять или абсорбировать вещества, которые могли бы повлиять на качество продукции. Оборудование не должно выделять загрязнений в окружающую среду в процессе работы и исключать возможность перекрестной контаминации.

Конструкция производственного оборудования должна обеспечивать удобство и возможность его очистки. Современные конструкции оборудования стремятся не только к безупречной функциональности, но и к максимальной защите продукта от загрязнений: отсутствие смазок в зоне контакта с продуктами, отсутствие "мертвых зон", недоступных для мойки и чистки и т.д. В частности, оборудование современных конструкций снабжено устройствами очистки на месте и/или стерилизации на месте. Это касается емкостного оборудования (мойка и стерилизация), дистилляторов (удаление накипи), систем водораспределения (стерилизация), таблетных прессов (очистка прессинструмента и зоны таблетирования) и др. [27-29].

К конструкции оборудования предъявляются следующие требования:

- поверхности оборудования, соприкасающиеся с исходным сырьем, полупродуктами или готовым продуктом, должны быть гладкими и изготовленными из нетоксичного, стойкого к коррозии материала, который не реагирует с используемым сырьем или материалами и выдерживает обработку дезинфицирующими средствами и/или стерилизацию;

- все детали оборудования, контактирующие с используемыми сырьем, материалами и полупродуктами, должны быть съемными для облегчения их мойки, обработки дезинфицирующими средствами или стерилизации;

- оборудование не должно загрязняться материалами, используемыми для его эксплуатации (например, смазочными веществами) во избежание ухудшения качества и загрязнения готовых продуктов;

- все передающие устройства (транспортеры, цепные передачи, приводы трансмиссии) должны быть закрыты или отгорожены;

- бункеры, емкости и аналогичное оборудование должны быть закрыты.

Следует исключить возможность загрязнения исходных материалов или продуктов другими материалами или продуктами. В процессе производства риск случайного перекрестного загрязнения возникает при неконтролируемом выделении пыли, газов, испарений, аэрозолей или микроорганизмов из

материалов (продукции) и от остаточных загрязнений на оборудовании и одежде людей. Степень риска зависит от типа загрязнения и продукта, подверженного загрязнению. Для предотвращения перекрестного загрязнения следует предусмотреть следующие технические и организационные меры [27-29]:

- производство в выделенных зонах (обязательное для антибиотиков, живых вакцин, бактериальных препаратов из живых микроорганизмов и некоторых других биологических препаратов) или разделение циклов производства во времени с соответствующей уборкой помещения и оборудования между циклами;

- организация воздушных шлюзов и вытяжных устройств;

- сведение к минимуму риска контаминации, вызываемого рециркуляцией или повторным поступлением необработанного или недостаточно обработанного воздуха;

- ношение защитной одежды внутри зон, хранение защитной (специальной) одежды в пределах зон производства продукции с высоким риском перекрестного загрязнения;

- применение методик очистки и деконтаминации с известной эффективностью, так как неэффективно очищенное оборудование является обычным источником перекрестной контаминации;

- использование «закрытых систем» производства;

- контроль наличия остатков предыдущего продукта или моющих средств и маркировка оборудования с указанием статуса чистоты.

При производстве одного наименования ЛС при переходе от серии к серии очистка оборудования после каждой серии, как правило, необязательна. Однако такие действия необходимо обосновать и установить интервалы времени между проведением очисток с указанием используемых методов [30,31].

Чистые помещения являются показателем высоких технологий производства и обеспечения качества [23,26]. Чистые технологии относятся к

наиболее современным и прогрессивным отраслям науки и техники, пользующихся в передовых странах серьезной государственной поддержкой [23]. В России наблюдаются положительные сдвиги в распространении понимания важности этой проблемы, создаются серьезные предпосылки формирования полноценной отрасли промышленности чистых помещений [11].

В среднем в чистом помещении 70-80% микрозагрязнений приходится на человека, 15-20% - на оборудование, 5-10% - на окружающую среду. Из этих данных видно, что проблема чистых помещений носит комплексный характер [23]. Недостаточно создать собственно чистое помещение, которое обеспечивает нужный класс чистоты при отсутствии технологического оборудования и персонала. Нужно одновременно применять оборудование, выделяющее минимум загрязнений или не выделяющее их вообще, одеть людей в "непылящую" одежду и т.д. [32-34]. Иначе значительные затраты на создание чистых помещений попросту бессмысленны.

При переходе к выпуску другого наименования ЛС проведение очистки оборудования обязательно, а применяемые процедуры должны быть валидированы.

Валидация - раздел правил GMP, касающийся надежности условий производства и их способности приводить к ожидаемым результатам по показателям качества продукции [35-39].

Валидация является неотъемлемой частью системы обеспечения качества. Она позволяет систематически и с предоставлением документально оформленных доказательств проводить изучение помещений, оборудования, процессов, методик и т.п.. Цель этого изучения - доказать, что они выполняют соответствующим образом и постоянно выполняет функции, которые были определены заранее. Прошедший валидацию процесс - это гарантия того, что все серии одного и того же продукта будут однородными и соответствовать требованиям соответствующего стандарта качества [40].

В отличие от многих требований GMP валидация сама по себе не усовершенствует процессы и не повышает качество промежуточной продукции и готового продукта. Она может лишь подтвердить, что процесс был надлежащим образом разработан, осуществлен и проконтролирован, а полученные результаты были зарегистрированы и их можно продемонстрировать. В идеале, любая разработка на заключительных стадиях должна быть валидирована.

Во всех редакциях правил GMP России содержится раздел «Валидация», включающий понятие, краткое описание основных видов и элементов валидации организацию валидационных работ [38,40]. Реально валидация представляет собой не более, чем организационный подход для доказательства соответствия производства требованиям правил GMP [37].

Необходимой предпосылкой и неотъемлемой частью процесса валидации является квалификация, под которой понимают установление характеристик оборудования, относящихся к выполнению конкретной функции или функций, и определение точных пределов или ограничений для этих характеристик. После проведения необходимых стадий квалификации проводится валидация процесса.

Валидация может быть выгодна производителю по многим причинам:

- она углубляет понимание процессов;
- способствует предотвращению возникновения ошибок вовремя процесса производства;
- обеспечивает выпуск доброкачественной продукции;
- снижает брак готовой продукции;
- позволяет в некоторых случаях проводить контроль качества готового продукта и/или процесса производства в меньшем объеме.

Недостатками валидации являются:

- увеличение времени предпроизводственной деятельности;
- повышение затрат на освоение нового процесса;

- дополнительные затраты на процесс ведения документации[37,38,40,43].

GMP требует валидации процессов очистки в первую очередь для предотвращения контаминации исходного сырья, полупродукта, готовой продукции и остальных материалов. Процедуры очистки проходят валидацию в основном по причине соответствия правилам. Необходимо, однако, напомнить, что информация, полученная в ходе валидации, дает возможность определить потенциальные проблемы, но в первую очередь — укрепить чувство уверенности в том, что производство выпускает безопасные, эффективные и качественные ЛС.

Чистота окружающей среды, оборудования, используемых материалов оказывает критическое воздействие на качество продукции. Поэтому предметом программы валидации должен быть и прогноз уверенности в том, что процесс очистки действительно предотвращает перекрестную контаминацию. Очевидно, что даже самая совершенная валидация не может дать «абсолютной уверенности», тем не менее, необходимо при валидации процедур очистки принять соответствующие критерии приемлемости и определить рутинные способы их достижения [41].

Исключение возможности перекрестной контаминации в процессе производства ЛС является одной из самых главных задач при проектировании фармацевтических предприятий. Достичь данной цели возможно при помощи следующих мероприятий:

- исключение перекрещивания потоков сырья и материалов;
- выполнение отдельных технологических операций в отдельных производственных помещениях;
- использование герметичной технологической тары и герметичного технологического оборудования;
- сведение к минимуму риска контаминации, возникающего вследствие рециркуляции или повторного использования недостаточно

подготовленного воздуха.

Наибольшая опасность перекрестной контаминации возникает в процессе производства твердых лекарственных форм [44]. Поэтому стоит задача спроектировать расположение производственных процессов и работу систем вентиляции таким образом, чтобы обеспечить возможность выпуска на производственном участке двух и более препаратов. Например, растаривание, взвешивание и подготовку сырьевых материалов можно организовать в отдельном блоке помещений с отдельным входом персонала. Данные производственные операции связаны с наибольшим выделением пыли, поэтому в производственных помещениях, где производится измельчение, просев, взвешивание сырьевых материалов, необходимо создавать минимальное избыточное давление по отношению к соседним помещениям и коридору, исключить систему рециркуляции воздуха и устанавливать на всех вытяжных решетках фильтры тонкой очистки воздуха [45-48]. Операции смешивания, увлажнения, влажной грануляции, сушки и сухой грануляции сырья целесообразно организовывать в одном производственном помещении, чтобы исключить дополнительную транспортировку открытых материалов по коридору. После мойки технологической тары, оснастки их нужно хранить в отдельном помещении с более высоким избыточным давлением воздуха по отношению к помещению мойки. Аналогично, хранение остатка сырья после взвешивания необходимо осуществлять в отдельной кладовой с более высоким давлением воздуха по отношению к помещению взвешивания [49]. Незнание вышеизложенного приводит к основным ошибкам в процессе проектирования.

Контаминация выражается количеством остатков в среде, на оборудовании или материале. Контаминация обычно выражается как концентрация (число, объем) остатков на определенной площади (плоскостная контаминация) или в определенном объеме (объемная контаминация) [18,50].

С такой точки зрения чистота понимается как отсутствие остатков в среде, на оборудовании или материале. На практике, однако, очень сложно доказать

«отсутствие» (за отдельными исключениями) поэтому определение чистоты звучит как низкая степень контаминации, которая ниже определенной предельной контаминации остатков (так называемый критерий приемлемости). Такое понятие «чистоты» имеет то преимущество, что ее можно практически достичь и оценить [51-53].

Остатки могут быть равномерно и неравномерно рассеяны по поверхности оборудования, помещений оснастки или внутри материала либо среды.

В рамках валидации процедур очистки необходимо кроме определения собственно контаминации, ее характер и способ рассеяния, а так же объяснить и способ, благодаря которому остатки попали на контролируемую поверхность или в определенный материал либо в среду. Как минимум нужно необходимо объяснить произошла ли контаминация до процедуры очистки или в ее ходе (либо по ее окончании). Иначе говоря должен быть доказан способ контаминации и способ ее очистки.

Метод оценки контаминации (поверхностной или объемной) тесно связан со способом подготовки отобранной пробы к анализу и с выбором метода анализа.

К установлению критериев приемлемости может быть применен любой из следующих подходов: проведение валидации очистки для каждого из выпускаемых препаратов, группирование препаратов и выбор препарата, представляющего «наихудший случай», группирование препаратов по группам риска (например, легкорастворимые препараты, препараты со сходной активностью, высокотоксичные препараты, а также препараты, которые трудно обнаружить) [41].

Согласно рекомендациям [41] допустимое количество остатков препарата должно соответствовать следующим критериям:

- в максимальной суточной дозе препарата может содержаться не более 0,1 % средней терапевтической дозы любого произведенного перед ним

препарата;

- в препарате не должно содержаться более 10 ppm (particlepermillion) любого другого препарата;

- после завершения процедур очистки на оборудовании не должно быть видимых следов, необходимо определить концентрацию, при которой становятся видимыми наиболее активные ингредиенты, посредством проведения исследований при известном загрязнении;

- предел содержания для определенных ингредиентов, являющихся аллергенами (пенициллины, цефалоспорины) или сильнодействующими веществами (некоторые стероиды и цитотоксины), должен быть ниже предела обнаружения, установленного с помощью самых современных аналитических методов. На практике это может означать, что для их производства следует использовать специально предназначенные помещения и оборудование [35].

Критерий чистоты можно вывести на основании предпосылок о действии веществ на пациента или из правил техники безопасности. Важную роль при установлении критерия чистоты играет так называемый «фактор безопасности». Его значение будет высшим для случаев очистки между сериями одного и того же продукта, и, наоборот, - низким при чередовании серий различных продуктов.

Процент минимальной терапевтической дозы. Данная методика использует для установления предела медицинскую характеристику терапевтической дозы вместе с согласованным фактором безопасности. Фактор безопасности находится, как правило, в диапазоне 0,01% - 10% минимальной терапевтической дозы.

Процент токсической дозы. Данный метод использует для установления предела как медицинскую характеристику токсичности, так и согласованный фактор безопасности. Данный тип предела используется для вспомогательных веществ, как, например, детергенты, дезинфицирующие средства, продукты

разложения и т.д. Для активных веществ такой предел используется как значение при проведении научно-исследовательских работ.

Процент минимальной декларированной дозы. Для установления предела на практике используется декларированное значение имеее с согласованным фактором безопасности.

Количество, не подлежащее обнаружению. Предел обнаружения связан со спецификой аналитических методов.

Объемная или поверхностная концентрация (мг/л, мг/см, мг/мазок, мг/доза, PPM, PPB). Все приведенные концентрации, кроме мг/доза (котораяполучается при пробоотборе плацебо или серии продукта) требуют обратного пересчета на терапевтический или токсический предел.

Логарифмическое снижение концентрации (скорость очистки). Расчет кратного падения концентрации вследствие процесса очистки. Данная методика требует пробоотбора и тестирования производственного оборудования как до очистки так и после нее.

Требования по безопасности концентрирования веществ включают пределы по защите окружающей среды санитарно-гигиенические и другие предельные величины.

Выбор критерия чистоты тесно связан с характером выпускаемой продукции (действие на пациента, безопасность и др.) и способом производства (число серий, чередование серий, оборудование и т.п.).

Очистка оборудования должна проводиться после окончания производственного цикла в течение времени, установленного в стандартной операционной процедуре (СОП). В СОП должны быть описаны:

- способ очистки с указанием каждого критического шага;
- перечень участков оборудования, требующих повышенного внимания;
- перечень съемных частей оборудования и описание проведения процедуры разборки, необходимой для эффективной очистки;
- перечень используемых моющих средств и/или растворителей и их

концентрация;

- список инвентаря, применяемого для очистки оборудования;
- проведение визуальной проверки чистоты оборудования;
- маркировка, используемая для обозначения статуса оборудования.

В связи с этими требованиями, помещения и оборудование следует располагать, проектировать, конструировать и эксплуатировать таким образом, чтобы они соответствовали проводимым операциям. Их расположение и конструкция должны сводить к минимуму риск ошибок и обеспечивать возможность эффективной очистки и обслуживания в целях исключения перекрестной контаминации, накопления загрязнений [50].

Надо отметить, что следует периодически проверять эффективность мер по предотвращению перекрестного загрязнения. Для этого определяются растворимые и нерастворимые остатки предыдущего препарата в отобранных пробах. При отборе проб следует использовать такие методы, как взятие мазков, смывов, или альтернативные методы (например, метод плацебо). Используемые методы отбора проб должны позволять проводить количественное определение остатков на поверхности оборудования после его очистки. Следует использовать аттестованные (валидированные) аналитические методы, обладающие достаточной чувствительностью для определения допустимого уровня остатков или загрязнений. Для каждого метода следует определить его воспроизводимость. Предельно допустимые количества остатков должны быть обоснованными и основываться на остатке наиболее опасного вещества.

1.3. Аналитические методы определения лекарственных веществ при проведении фармацевтического контроля

Одной из важнейших задач фармацевтической химии является создание методов аналитического контроля, позволяющих проводить чувствительные и избирательные определения лекарственных веществ. Особенность определений ЛВ при проведении внутрипроизводственного контроля связана с тем, что их

необходимо проводить в сложных по составу анализируемых матрицах при низких содержаниях определяемых веществ (например, до нескольких нанограммов на 1 мл) [54]. В связи с этим одной из проблем является возможность избирательного и чувствительного детектирования определяемых соединений.

Большинство ЛВ по своей структуре являются органическими соединениями различной химической природы [5]. Специфика значительной части ЛВ, связанная с высокой полярностью, слабо выраженными хромофорными, электрофорными или флуорофорными свойствами, зачастую накладывает ограничения на возможности избирательного детектирования при проведении анализа.

Применение высокоселективных вариантов детектирования в отдельных случаях позволяет проводить определения ЛВ без проведения реакций получения производных. Такие варианты реализованы при определениях ряда лекарственных веществ (цефтриаксон, цефазолин, цефтазидим, ампициллин, бензилпенициллин, оксациллин, цефотаксим) методом ВЭЖХ [55]. В большинстве случаев, однако, из-за низкой селективности детектора такие определения ЛВ возможны лишь в чистых растворах лекарственных препаратов.

В настоящее время основным методом анализа большинства ЛВ является ВЭЖХ [69-72]. В нормативной документации, регламентирующей анализ качества субстанций и готовых лекарственных средств в странах с развитой фармацевтической промышленностью (США, Англия, страны ЕС, Япония) ВЭЖХ постепенно замещает классические методы анализа [56-60]. ВЭЖХ широко используют для изучения свойств смесей БАВ при синтезе и поиске новых ЛС, а также при разработке контроля технологической схемы производства ЛС [69]. Этот метод по своим аналитическим характеристикам соответствует требованиям фармацевтического анализа для 80-90% существующих препаратов. Этому способствовали такие преимущества ВЭЖХ,

как возможность анализа сложных по составу смесей, экспрессность, точность, высокая чувствительность используемых систем детектирования [73].

ОФ ВЭЖХ имеет в своем арсенале различные методы и приемы анализа ЛВ. В контроле качества ЛВ важную роль играет возможность воспроизводимости и использования методики анализа в различных контрольно-аналитических лабораториях.

Природа активных функциональных групп на поверхности сорбента определяет селективность процесса разделения, а размер частиц, их фракционный состав и характер упаковки определяют эффективность процесса разделения. Большинство задач по анализу ЛС решается на сорбентах с обращенными фазами на основе объемно-пористого силикагеля, упакованного в виде сферических частиц [74]. В настоящее время разработано большое количество различных видов сорбентов, и большая часть из них используется для анализа ЛС.

Наибольшее распространение получил сорбент с фазой С18, на которой выполняют до 85 % всех анализов. Следующий по популярности сорбент С8, на долю которого приходится до 10% от общего количества анализов ЛС. Сорбенты с фазой С18 и С8 обеспечивают симметричные формы хроматографических пиков и используются для анализа кислых, основных и нейтральных органических ЛВ. В ОФ ВЭЖХ качественное разделение веществ возможно на колонках, где эффект специфической абсорбции веществ на силанольных групп носителя минимален [75-78].

Происходят попытки создания библиотек данных по хроматографическим и спектральным данным для различных ЛС [79,80]. В работе [81] предложен подход количественного определения ЛС с помощью внутреннего стандарта и литературных УФ-спектральных данных, полученных при нескольких фиксированных длинах волн.

Наличие для работы чистых стандартов является основной проблемой для ВЭЖХ. Существуют попытки использования баз данных по индексам

удерживания и отношениям оптических плотностей [82], однако широкое распространение такие базы данных пока не получили ввиду отсутствия единого координационного центра и стандартизированных условий определения.

Основная масса ЛВ - умеренно полярные, достаточно хорошо растворимые в воде соединения, имеющие хромоформные группы с явно выраженным поглощением в УФ области спектра [5]. При этом для анализа используется колонка с НФ С18, ПФ на основе водно-метанольного или водноацетонирильного элюента в с рН смещенным в кислую сторону для фиксации ионогенных свойств объектов (антибиотики, анальгетики, антигипертензивные препараты) [83]. В их составе присутствуют вещества с различными физико-химическими свойствами и различным содержанием основных компонентов. Кроме основных веществ, предполагают определение вспомогательных и нормируемых примесей [84].

В сложных случаях на каждый компонент создается индивидуальная хроматографическая методика, что в итоге приводит к длительным, трудоемким, затратным анализам. Современные системы для ЖХ позволяют при наличии хорошо поставленной методики выполнить анализ всех компонентов в одном цикле [85]. Примеры таких ВЭЖХ определений представлены в табл. 1.2.

Таблица 1.2.

Методики ВЭЖХ определения некоторых цефалоспоринов.

| Наименование ЛС, компоненты | Сорбент, размер колонки, мм | Подвижная фаза, режим разделения | нм | Литература |
|--|-----------------------------|--|-----|------------|
| «Ультрацеф» (цефтиаксон натрия соль) | С18150*4,0 | 0,1 М KH_2PO_4 / ацетонитрил/ 0,01% муравьиная кислота (85/10/5) | 254 | [86] |
| «Сульмовер» (цефоперазон и сульбактам) | С18150*4,6 | Ацетонитрил/ тетрабутиламмоний гидроксид (0,005 М) (35/65) | 220 | [87] |

| | | | | |
|--|------------|--|-----|------|
| «Цеффастр» (цефотаксим натриевая соль) | C18150*4,0 | 0,1 М КН ₂ РО ₄ / метанол/ 0,01% муравьиная кислота (75/20/5) | 235 | [88] |
| «Цефазолин-БХФЗ»(цефазолин натриевая соль) | C18150*4,6 | 0,05 М КН ₂ РО ₄ / метанол(85/15) | 270 | [89] |

Следует отметить, что в оценке степени чистоты химико-фармацевтического производства лекарственных средств методы анализа играют существенную роль. В международных стандартах [129-136] большое значение придается развитию высокопроизводительных и чувствительных аналитических методов для обеспечения контроля безопасности и эффективности лекарств не только в процессе их разработки и промышленного выпуска, но и в процессе распространения на фармацевтическом рынке [137]. Поэтому ВОЗ рекомендует продолжать разработку достаточно простых альтернативных методов тестирования лекарственных веществ с целью включения их в Международную фармакопею [135,136]. Необходимо отметить, что в ряде стран схема проведения испытаний лекарственных средств в значительной степени автоматизирована, в частности, с помощью систем ВЭЖХ.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

2.1. Оборудование и аппаратура.

В работе был использован высокоэффективный жидкостной хроматограф (ВЭЖХ) с тройным квадрупольным масс-спектрометром LC-MS Triple Quad QQQ Agilent Technologies "HPLC 1260 Infinity" (США), состоящего из четырех канального насоса для создания градиента низкого давления, термостата колонок (СТО-10А), автоматического пробоотборника "Auto Sampler", инжектора, вакуум-дегазатора, диодно-матричного детектора, ионизация проводилась с электрораспылением (ESI). Обработку данных и запись хроматограмм осуществлена на персональном компьютере с помощью программного обеспечения OpenLAB версии 2.2;

Для контроля кислотности использовали рН-метр Mettler Toledo модели "S 220".

Взятие навесок осуществлялось при помощи аналитических весов «Sartorius» CP-224S.

Для получения сверхчистой воды бидистиллированную воду дополнительно очищено на установке «Sartorius».

Для получения азота высокоочищенного для хромо-масс спектрометра был использован генератор азота "Peak" (чистота азота более 99,99%).

Для проведения микробиологических анализов (стерильность, микробиологическая чистота) были использованы автоклав (паровой стерилизатор), система мембранного фильтрация, термостаты, среды для посева, инструменты и стерильные посуды.

В качестве контрольно-измерительных приборов производственной системы использовано:

- Барометр-анероид М-67 (для измерения давлений комнаты);
- Гигрометр психрометрический ВИТ-2 (для измерения относительной влажности комнаты).

2.2. Материалы, реактивы и объекты анализа.

Хроматографические условия были подобраны следующим образом:

- Колонка: EclipsePlusC18, 150 мм x 4.0 мм, 5.0 мкм;
- Подвижная фаза: фосфатный буфер рН=7,0 – метанол – муравьиная кислота 0,01 % раствор (77:18:5, об. %);
- Скорость потока: 1,0 мл/мин;
- Температура колонки: комнатная.

Условия ионизация были подобраны следующим образом:

- Скорость потока газа осушителя (азот): 10 мл/мин;
- Температура: 300 °С;
- Давления газа на игле распылителя: 20 PSI;
- Объем вводимый проб: 10 мкл;
- Напряжение фрагментатора:

для цефтриаксона 200 В

для цефазолина 100 В

для цефотаксима 200 В

напряжение капилляра - 4000 В.

Анализы были проведены как в режиме одиночной ионный режим (SingleIonMode – SIM), так и в режиме полного сканирования (Fullscanmode) для разработки метода определения цефазолина, цефотаксима и цефтриаксона.

В качестве стандартных веществ были использованы фармацевтические субстанции ЛВ, содержание основного вещества в которых не ниже 99%, отвечающие всем требованиям нормативной документации (НД); стандартные образцы согласно EP, USP и BP; стандартные образцы фирм Fluka и SigmaAldrich.

Для приготовления элюентов и в подготовке проб использованы растворители: ацетонитрил и муравьиная кислота (0,01% раствор); ацетонитрил фирм SigmaAldrich; метанол SigmaAldrich; сверхчистая вода, полученная на установке Puris (Южная Корея) из бидистиллированной воды; реактивы: соляная

кислота, фосфорная кислота, калия дигидрофосфат, натрия гидрофосфат, натрия гидроксид не ниже "х.ч."

При выполнении работы были использованы следующие лекарственные препараты: цефазолина натриевая соль («Интралин» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 и 1,0 г.), цефтриаксона натриевая соль («Витаксон» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 и 1,0 г.) и цефотаксима натриевая соль («Цеффастр» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 и 1,0 г.).

Используемые органические растворители при необходимости подвергали дополнительной очистке по известным методикам [138,140].

Экспериментальные результаты статистически обрабатывались по известным методикам [141,142]. По полученным экспериментальным данным рассчитывали среднее арифметическое значение \bar{X} , стандартное отклонение S , относительное стандартное отклонение S_{r} и ошибку среднего квадратического отклонения S_s , используя следующие формулы:

2.3. Методы и техника эксперимента

Элюенты. В качестве кислых растворителей использовали 0,01 % раствора муравьиной кислоты в воде. Данные элюенты готовились из концентрированных кислот (х.ч.) путем разбавления. В качестве универсального элюента использовали буферные растворы на основе солей фосфатов: 0,025 М калия дигидрофосфат (KH_2PO_4) и 0,08 М натрия гидрофосфат (Na_2HPO_4).

Методика приготовления 0,025 М KH_2PO_4 и 0,08 М Na_2HPO_4 в смеси с H_3PO_4 pH 7,0. В химический стакан емкостью 1 л помещают 3,5 г калия дигидрофосфата и 11,6 г натрия гидрофосфата, добавляют 500 мл воды для хроматографии и перемешивают, добавляют 180 мл метанола, корректируют с 10% раствором ортофосфорной кислоты до pH=7,0 и доводят водой до 1000 мл. Для установления полного равновесия перемешивают еще 5 мин, фильтруют мобильную фазу через мембранный фильтр (размером 0,45 мкм) вакуумным водоструйным насосом в приемную колбу. Срок годности раствора 3 суток, при хранении в холодильнике при температуре 5 °С. Перед применением обязательно контролируют pH, отклонение от значения 7,0 должно быть в диапазоне $\pm 0,1$. В случае необходимости данная методика может быть использована для приготовления ПФ на основе фосфатного буфера с иным значением pH, например 8,0, в этом случае доводят pH фосфорной кислотой до соответствующего значения.

В качестве сильного растворителя подвижной фазы использовали ацетонитрил, метанол или смесь ацетонитрила и метанола в соотношении 50/50 по объему. Требуемое значение соотношения элюентов по объему достигали непосредственно в камере смешения насосов хроматографов.

Скорость потока элюента при всех режимах была 1,0 мл/мин. Иные значения указаны в тексте диссертации.

Длины волн детектирования для каждого из определяемых соединений определяли на основе спектров полученных на спектрофотометре, а также при использовании диодно-матричного детектора, и использовали литературные

данные. В качестве аналитической выбирали длину волны максимума спектра поглощения вещества. Использовали режим переключения длин волн. В качестве оптимальной выбиралась длина волны в диапазоне от 254 нм для повышения селективности обнаружения, устранения возможных мешающих влияний вспомогательных веществ, поглощающих в коротковолновой области, и уменьшения помех возникающих на базовой линии в случае использования градиентного режима элюирования. Выбирались и иные длины волн для решения следующих задач: общая длины волны для количественного анализа нескольких компонентов, для снижения интенсивности поглощения в случае превышения шкалы отклика детектора. Для повышения чувствительности отклика в случае веществ с низким коэффициентом экстинкции в максимуме поглощения и при малой концентрации удобнее использовать более интенсивное поглощение органических соединений в коротковолновой области спектра.

Температура колонки. Разделения выполнялись при комнатной температуре (20-25 °С).

Объем вводимой пробы. Прибор фирмы Agilent Technologies оснащен автосамплером (с точностью от 1 мкл до 100 мкл). Оптимальное введение пробы в хроматограф составляет с объемом 10 мкл.

Методика количественного определения ЛВ в смывах после промывки оборудования. Отбирают пробу ватным тампоном, смоченным спиртом этиловым 96 % (или другим растворителем — указано по тексту диссертации), с поверхности, соприкасающейся с препаратом (бункер дозатора, тefлоновая трубка, промежуточная мешалка, дозирующее колесо и т.д.), площадью 25 см (5x5 см). Ватный тампон с пробой помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл.

Определение проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), используя абсолютную калибровку.

В колбу с пробой прибавляют 10 мл среду для извлечения (указано по тексту диссертации) и извлекают 10 мин. Полученное извлечение переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл. Извлечение повторяют дважды по 5 мл.

Каждое извлечение присоединяют к предыдущим извлечениям. Объединенные извлечения доводят подвижной фазой до 25 мл, перемешивают и фильтруют через фильтр с диаметром пор не более 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата. Полученный раствор вводят в хроматограф. Условия хроматографирования в каждом конкретном случае приведены по тексту диссертации.

Возможна корректировка соотношения растворителей, чтобы соблюдался тест «Проверка пригодности хроматографической системы». Раствор испытуемого препарата вводят трижды. Регистрируют хроматограмму. Содержание ЛВ, в граммах, (X) вычисляют по формуле:

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ ЧИСТОТЫ ОБОРУДОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВА ЦЕФАЛОСПОРИНОВ

Обзор литературных данных по ВЭЖХ - анализу лекарственных соединений, рекомендованных при проведении фармацевтического контроля, показывает, что существуют общие подходы к определению ЛВ в фармацевтической продукции.

подавляющее число определений выполняется на обращенных фазах С18 различных торговых марок, обладающих некоторыми сходными характеристиками (форма и диаметр сорбента, размер пор, плотность прививки, энд-кеппинг), но существенно различающиеся селективностью. Различия в селективности используемых сорбентов зачастую обуславливают разнообразие используемых подвижных фаз (ПФ), хотя достаточно часто применяется смеси на основе водно-метанольного или водно-ацетонирильного элюента с добавлением различных модификаторов [69,71]. Концентрация органического компонента в ПФ варьируется в широких пределах, в зависимости от определяемого соединения, так как в фармакопейном анализе используется обычно изократический режим элюирования.

Детекторы, чаще всего используемые в анализе - УФ-спектрофотометры с перестраиваемой длиной волны. Применение детекторов с многоканальной регистрацией повышает достоверность идентификации пиков, позволяет оценивать их гомогенность, но высокая стоимость таких детекторов ограничивает их применение в рутинном анализе.

Подготовка пробы зависит от концентрации определяемого ЛВ, его физико-химических свойств. Традиционные методы подготовки пробы включают в себя экстракционные и сорбционные методы [56-60]. К современным методам можно отнести применение предколонок, заполненными сорбентами с "ограниченным доступом".

Обращает на себя внимание тот факт, что в фармакопейном анализе практически для каждого ЛВ существует своя методика определения, предполагающая определенный сорбент, определенные элюенты, детектор, методику подготовки пробы. Работ, где в одних условиях определяется несколько различных ЛВ [69,71], очень мало, хотя очевидно, что необходимость анализа различных ЛВ в рамках одной лаборатории при большом разнообразии методик ведет к увеличению продолжительности анализа, требует высокой квалификации персонала и, в конечном итоге, существенно повышает стоимость анализа.

Эту стоимость можно заметно снизить путем подбора унифицированных условий подготовки пробы и условий хроматографического разделения, и такой подход для анализа ЛВ должен использоваться при проведении контроля ЛВ на поверхности технологического оборудования, где он обусловлен самой аналитической задачей. Этот подход к определению ЛВ позволил бы широко внедрить этот метод в рутинную практику процессов внутрипроизводственного контроля химико-фармацевтических предприятий. Решение этой проблемы представляется нам актуальной задачей.

3.1. Разработка способов пробоотбора и пробоподготовки анализируемых компонентов при контроле чистоты оборудования.

Наличие остатков лекарственных субстанций и других компонентов лекарственных форм может неблагоприятно отразиться на качестве фармацевтической продукции. Процессы очистки могут предотвратить серьезные последствия перекрестной контаминации продукции, но их эффективность должна быть проверена с помощью высокоэффективных аналитических методов [143,144].

Для оценки способа очистки необходимо проводить отбор проб с поверхностей оборудования, которые контактировали с продукцией, и

определить уровень наличия остатков активных компонентов. Выбор способа пробоотбора и аналитических методов будет зависеть от характера остатка и конструкции производственного оборудования [145-147].

На наш взгляд, для выполнения правильного типа пробоотбора следует подготовить схему пробоотбора, на которой будут изображены актуальные точки технологического оборудования и операций, с которых нужно отбирать пробу. Такие точки должны включать наиболее труднодоступные места с точки зрения собственно конструкции оборудования. Для подготовки схем пробоотбора необходимо использовать самые разные подходы, как, например, технологические планы и карты, технические чертежи либо также и фотографии.

Сначала следует провести визуальную проверку оборудования на наличие видимых остатков.

Прямой отбор проб с поверхности (метод мазков) может быть использован для оценки качества очистки тех поверхностей оборудования, с которыми может соприкоснуться продукт. Этот метод рекомендуется использовать для оборудования, имеющего неровные поверхности или не дающего возможности получить образцы методом смыва (бункер дозатора, тефлоновая трубка, промежуточная мешалка, дозирующие колесо, корпус дозатора). Пробы следует отбирать не менее чем с пяти участков с помощью трафарета, имеющего стандартный размер, например, 25 см^2 или 100 см^2 , и тампона, пропитанного растворителем для рассматриваемых активных веществ. Шаблон должен быть изготовлен из инертного эластичного материала, который хорошо повторяет поверхность оборудования.

Затем содержимое тампона экстрагируют и определяют количественный уровень активного вещества в жидкости. При этом конечный уровень загрязнения должен удовлетворять критерию приемлемости, установленному в представленных ниже экспериментальных исследованиях.

Предварительно следует определить также пригодность материала тампона и среды, используемых для отбора проб. Выбор материала тампона

может повлиять на возможность точного отбора пробы. Поэтому в экспериментальных исследованиях следует установить, какое количество активного вещества переходит с тампона в среду для отбора проб и/или растворитель. Важно также убедиться, что среда для отбора проб и/или растворитель готовы к использованию (внешний вид, срок годности и т.д.).

Тампоны бывают изготовлены из различных материалов (пластик, ткани, целлюлоза и т.п.). Их материал должен удовлетворять следующим требованиям: быть пригодным для проведения смыва; захватывать и освобождать остатки ЛВ; не проявлять мешающего влияния на проведение аналитических определений; не портить поверхность оборудования.

Смывы с помощью тампонов можно брать, однако, только с доступных частей оборудования. Кроме того, для расчета концентрации остатков на поверхности оборудования нужно знать как общую площадь собственно оборудования, так и площадь, с которой брали пробу. Собственно смыв выполняется с помощью тампона (увлажненного или сухого), причем способ смыва должен быть предписанным, что обычно требует описание направления смыва, числа смывов, число повторений и способ смачивания тампона. После выполнения смыва тампон обрабатывают в выбранном растворителе.

Преимуществом этого способа является то, что имеется возможность растворять и физически удалять пробу; его можно использовать для широкой шкалы поверхностей; он экономичен и доступен; позволяет проводить отбор пробы с известной площади и его можно применять для остатков активных веществ и остатков детергентов. Однако ограничениями являются: возможность заноса в пробу волокон; результаты могут зависеть от технического исполнения; материал тампона и его исполнение могут снизить раскрываемость (извлечение) и специфичность метода; затруднен отбор пробы с крупногабаритных, сложных и трудно доступных частей оборудования (например, трещины, трубопроводы, вентили, большие емкости); может быть случайный выбор места пробоотбора. Тем не менее, документация Управления по контролю качества пищевых,

косметических и лекарственных средств США (FDA) отдает предпочтение прямому способу отбора проб с поверхности оборудования [148].

Метод смывов (анализ последних промывных вод - finalrinse) удобен для оценки эффективности очистки систем, к которым нет прямого доступа, или частей оборудования, которые нельзя снимать. Использование этого метода позволяет проводить отбор проб с большей площади поверхности, а также для очищаемых на месте систем. При использовании этого метода очищенное и высушенное оборудование промывают небольшим количеством воды очищенной или воды для инъекций. Можно использовать смешанные среды (органические растворители или растворы поверхностно-активных веществ) для увеличения растворения остатков активных веществ.

Пробы, полученные методом ополаскивания (с использованием воды, органического растворителя или моющего раствора), можно обрабатывать в заранее выбранных интервалах в ходе очистки и по окончании процесса очистки. При накоплении проб, полученных методом ополаскивания, необходимо принимать во внимание точку пробоотбора, время пробоотбора и объем жидкости ополаскивания.

В идеальном случае можно отбирать пробы моющих растворов и жидкости ополаскивания в ходе процесса очистки и регулярно выполнять их анализы „on-line" (измерительный прибор присоединен к очищаемому оборудованию) или „off- line" (пробы отправляются на анализ в лабораторию). Преимуществами этого способа: можно использовать мониторинг on-line; простота отбора проб; непроникающий метод; меньше зависит от техники исполнения, чем тампоны; можно использовать для активных веществ, детергентов и вспомогательных веществ; позволяет проводить отбор проб с больших площадей позволяет проводить отбор с поверхностей, которые на практике редко встречаются (например, пористых). Ограничениями являются: в некоторых случаях этот способ предоставляет только ограниченную информацию о фактической чистоте поверхности; может снизить

чувствительность аналитического метода; остатки не всегда равномерно распределяются по поверхности; отсутствует возможность обнаружения местонахождения остатков; для правильной интерпретации результатов критическим моментом является объем образца, получаемого методом ополаскивания; необходимо определить методологию отбора проб, так как методология отбора проб и точка пробоотбора может повлиять на результаты; может быть не простой задачей правильно определить и контролировать площади, с которых берется проба, поэтому, как правило, такой метод используется при ополаскивании производственного оборудования как целого.

Значительной трудностью при использовании данного способа является возможность получения большого разведения, поэтому количественное содержание активного вещества не всегда можно будет определить имеющимся аналитическим методом. Поэтому следует использовать ограниченный общий объем жидкости, используемой для смыва, или концентрировать пробу нагреванием или с помощью вакуумной сушки с учетом стабильности остатков. Затем нужно отобрать и оценить пробы жидкости на содержание остатков активных веществ (в мг/мл), а затем рассчитать общее количество содержащихся в смывах остатков и сравнить полученные результаты с критериями приемлемости.

Жидкость для отбора проб следует выбирать, исходя из растворимости активного вещества и ее пригодности для последующего анализа. Выбор растворителя основывался на физико-химических свойствах определяемых веществ. В основе лежали данные об их растворимости из литературных источников (табл. 3.1), а также подбор экспериментальным путем. Условные термины растворимости, рекомендуемые фармакопеей РФ, приведены в табл. 3.2. Преимущественно в качестве основного растворителя выбирали воду или этанол, рекомендуемые ГФ, а в некоторых случаях растворение проводили в смеси растворителей. При дальнейшем разведении при анализе методом ВЭЖХ использовали ПФ и в результате, образец обладал меньшей или равной

элюирующей силой по сравнению с ПФ. Широко использовали в качестве растворителя воду, которая пригодна для растворения для многих гидрофильных соединений. При этом учитывали устойчивость анализируемого образца в растворе.

Таблица 3.1.

Растворимость анализируемых лекарственных веществ

| Лекарственное вещество | Вода | Этанол | Хлороформ | Бензол | Диэтиловый эфир |
|-----------------------------|------|--------|-----------|--------|-----------------|
| Цефтриаксона натриевая соль | ЛР | МР | ПНР | ПНР | ПНР |
| Цефатоксима натриевая соль | ЛР | УМР | ОМР | ПНР | ОМР |
| Цефазолина натриевая соль | ЛР | ОМР | ОМР | ПНР | ОМР |

Однако часто использование каждого из названных выше методов по отдельности не обеспечивает требуемой надежности результатов. Для надежной оценки равномерности распределения остатков на поверхности оборудования нужно проанализировать пробы, полученные методом мазка с поверхности, в сочетании с пробами, полученными методом смывов. Для получения достоверных результатов эффективности очистки оборудования возможно провести анализ последнего конденсата пара, используемого для обработки оборудования, что обеспечивает достижение труднодоступных мест. Кроме того, возможно использование метода «плацебо», заключающееся в производстве серий плацебо на очищенном оборудовании в обычных производственных условиях с последующим исследованием их на наличие загрязнений.

Таблица 3.2.

Условные термины растворимости

| Условный термин | Количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1 г препарата |
|-----------------|---|
|-----------------|---|

| | |
|-------------------------------|------------------|
| Очень легко растворим (ОЛР) | не более 1 |
| Легкорастворим (ЛР) | от 1 до 10 |
| Растворим (Р) | от 10 до 30 |
| Умеренно растворим (УМР) | от 30 до 100 |
| Малорастворим (МР) | от 100 до 1000 |
| Очень малорастворим (ОМР) | от 1000 до 10000 |
| Практически нерастворим (ПНР) | более 10000 |

Независимо от выбранного метода отбора проб с поверхности оборудования необходимо проверить степень извлечения (его раскрываемость, recovery), которая зависит как от конкретного способа пробоотбора, так и от использованного аналитического метода. Для определения содержания ЛВ использовали метод ВЭЖХ (условия аналитических определений приведены в главе 2 и разд. 3.2, 3.3).

Для такой проверки применяли стандарты активных веществ, вспомогательных веществ или детергентов. Растворы перечисленных веществ известной концентрации наносили либо непосредственно на поверхность оборудования, либо на специальные пластины из того же материала, как очищаемое оборудование (нержавеющая сталь 304/08X18Н9). После высыхания раствора на данной поверхности проводится отбор проб по выбранному методу и с помощью ВЭЖХ определялась концентрация ЛВ. К пробе прибавляли растворитель и извлекали 10 мин. Извлечение повторяли дважды по 5 мл. Каждое извлечение присоединяли к предыдущим извлечениям. Объединенные извлечения анализировались. Для очистки образцов перед вводом в хроматографическую систему их обязательно фильтровали через целлюлозный и или фторопластовый фильтры с диаметром пор 0,2 - 0,45 мкм.

Степень извлечения комбинации отбора пробы рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Recovery} =$$

N_1 - установленное количество вещества;

N_2 - нанесенное количество вещества.

Для интенсификации процесса пробоподготовки применялись такие физические приемы как нагревание, перемешивание, и обработка образца с помощью ультразвука.

Для надежной оценки равномерности распределения остатков на поверхности оборудования анализировались пробы, полученные методом мазка с поверхности (ватные хлопчатобумажные тампоны), в сочетании с пробами, полученными методом смывов (табл. 3.3). Такое исследование повторялось для продукта не меньше 6-ти раз, а окончательное значение степени извлечения R было рассчитано как среднее арифметическое индивидуальных значений. Из полученных значений было рассчитано среднее арифметическое и доверительная граница при односторонней доверительной вероятности 95 %.

Как показывают экспериментальные результаты, степень извлечения по методу мазков превышает аналогичные значения, полученные по методу смывов. В целом значения степени извлечения при использовании метода мазков находятся в интервале 81-85%, а метода смывов - 66-71 %. Такое извлечение является достаточным при проведении анализа в целом. Таким образом, предлагаемые способы пробоотбора можно использовать для контроля чистоты поверхности оборудования при проведении технологического процесса на производстве ЛС.

Таблица 3.3.

Степень извлечения лекарственных веществ с поверхности оборудования
($n=6$, $P=0,95$; определение методом ВЭЖХ)

| Лекарственные вещества | Среда для пробоотбора | Степень извлечения R , % | |
|------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------|
| | | Метод мазков | Метод смывов |

| | | | |
|--------------------------------|------|-------|-------|
| Цефатоксима натриевая соль | Вода | 81 ±3 | 68 ±4 |
| Цефазолина натриевая соль | Вода | 84 ±4 | 66 ±4 |
| Цефтриаксона натриевая соль | Вода | 85 ±3 | 71 ±3 |

3.2. Выбор условий разделения цефалоспоринов в обращенно-фазной ВЭЖХ.

Здравоохранение и фармация - области человеческой деятельности, успехи которых прямо и косвенно зависят как от уровня развития аналитического контроля в общем, так и от степени внедрения наиболее передовых методов анализа в практику. ВЭЖХ как высокочувствительный и универсальный метод анализа, которому во многих случаях нет альтернативы, позволяет одновременно следить за изменением концентрации нескольких ЛВ, отличается достаточной точностью и воспроизводимостью.

Для анализа ЛВ на поверхности оборудования использовали метод ОФ ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. При работе с УФ-детектором длина волны определяется, исходя из УФ-спектра определяемого соединения. Чаще всего такой длиной волны является длина волны, соответствующая максимальному поглощению раствора вещества или близкая к ней. Большая часть изучаемых ЛВ поглощает только в области коротких длин волн. В качестве базовой для всех соединений выбрана длина волны, близкая к длине волны максимального поглощения, за исключением цефтриаксона натриевой соли. Для этого ЛВ в качестве базовой была выбрана длины волн $\lambda_{\text{max}}=254$ нм. Выбранные нами длины волн позволяют определять каждое из исследуемых соединений на длине волны максимального поглощения или близкой к ней.

В связи с этим изучено хроматографическое поведение анализируемых ЛВ при различных рН ПФ. Было установлено, что использование рН для контроля состояния ионизации ЛВ в ОФ ВЭЖХ является эффективным приемом для изменения селективности разделения. Ионизированные функциональные группы имеют большую полярность, что приводит к уменьшению удерживания, и обладают ионным взаимодействием с незащищенными и активными силанолами сорбента, что влияет на форму пика и его воспроизводимость. В диапазоне рН ПФ вблизи значений рК ЛВ присутствуют в растворе одновременно в нейтральной и ионизированной форме. Силанола сорбента в нейтральной среде ионизированы, что приводит к увеличению их взаимодействия с полярными функциональными группами, приводя к образованию сильного хвостового фактора и снижению эффективности колонки. При рН ниже их рК_а на 1-1,5 ед. они находятся в нейтральном состоянии, поэтому подкисление ПФ является общим подходом по установлению вторичных взаимодействий.

Низкие значения рН уменьшают степень взаимодействия ЛВ, содержащих основные группы, с остаточными силанольными группами поверхности сорбента, которые в кислой среде протонированы, что приводит к улучшению симметрии пика и увеличению эффективности разделения аналита. Однако, вещества с основными группами находятся в ионизированном состоянии при таких значениях рН среды, что может привести к уменьшению времени их удерживания.

Для анализа индивидуальных соединений в смывах использовали бинарную ПФ, состоящую из смеси метанола и буферного раствора. Этот бинарный элюент, предлагаемый в данной работе, позволяет хроматографировать все определяемые соединения в виде симметричных пиков на традиционном обращено-фазном сорбенте С18, что свидетельствует об отсутствии значимых взаимодействий ЛВ с остаточными силанолами силикагеля в данном элюенте. При этом использовалось изократическое элюирование,

которое является более экономичным и поэтому более предпочтительным при определении одного соединения.

Длина хроматографических колонок, используемых в фармацевтическом анализе, варьируется от 100 до 250 мм, а их внутренний диаметр составляет 4,0-4,6 мм. При этом в настоящее время около 50% разделений ЛВ выполняется на колонках длиной 100-150 мм. Применение коротких колонок - один из возможных путей снижения стоимости анализа за счет сокращения его длительности и уменьшения расхода ПФ [149-151]. Уменьшение диаметра колонки при сохранении нагрузки на сорбент приводит к повышению чувствительности анализа, что, в свою очередь, снижает требования к чистоте растворителей [151]. Очевидно, что одновременное уменьшение длины и диаметра колонки по сравнению со "стандартной" колонкой позволяет получить существенные преимущества [150]. Применение колонки размером 4,6 x 50 мм взамен традиционной (4,6 x 250 мм) в 10—20 раз снижает расход растворителей и во столько же раз повышает чувствительность определения.

ВЭЖХ на колонках 4,6 x 50 мм мы считаем оптимальным масштабом для целей внутрипроизводственного фармацевтического контроля. Дальнейшее уменьшение колонки до размеров капиллярной представляется нецелесообразным, так как ее нельзя использовать в сочетании со стандартным аналитическим хроматографическим оборудованием (инжекторы, насосы, ячейка детектора), оборудование, специально разработанное для капиллярной ВЭЖХ, слишком дорого и поэтому мало пригодно для рутинного анализа на производстве.

В качестве подвижной фазы была выбрана фосфатный буфер рН=7,0 – метанол – муравьиная кислота 0,01 % раствор (77:18:5, об. %) для количественных определений цефалоспоринов. В этом случае отсутствует поглощение компонентов ПФ в области коротких длин волн, что позволяет повысить чувствительность аналитических определений.

В этом случае удалось получить приемлемые условия разделения для цефтриаксона, цефазолина и цефотаксима. Условия разделения представлены в табл. 3.4. Хроматограммы исследуемых ЛВ приведены на рис. 3.1 - 3.3.

Пригодность аналитической системы оценивалась как данные тестов, доказывающих отсутствие систематических инструментальных погрешностей на результат определения и количественно подтверждающих пригодность аналитической системы - оборудования, системы ввода образца и условий проведения анализа - для получения достоверных и воспроизводимых результатов. К основным критериям пригодности хроматографической системы относят количество теоретических тарелок, фактор асимметрии пика, фактор удерживания, СКО значений времени удерживания, площади пика при многократном ($n > 6$) анализе одного и того же раствора [142].

При оценке пригодности хроматографических систем фактор симметрии пика не превышал 2,0, число теоретических тарелок превышало 2000, относительное среднее квадратичное отклонение времени выхода и площади пика не превышало 1,0 при $n > 6$. Оценка ключевых показателей валидационных параметров предложенных условий разделения выявила перспективу их использования для контроля остаточных количеств ЛВ в смывах с технологического оборудования фармацевтического производства. В качестве примера в табл. 3.5. приведены показатели пригодности хроматографической системы при анализе цефалоспоринов.

Таблица 3.4.

Условия разделения лекарственных веществ в ОФ ВЭЖХ

| Параметры | Цефтриаксон | Цефазолин | Цефотаксим |
|--------------------------------|---|-----------|------------|
| Длина волны детектирования, им | 254 | 270 | 235 |
| Время удерживания, мин. | 4,59 | 10,57 | 15,38 |
| Колонка | Eclipse Plus C18, 150 мм x 4,0мм, 5.0 мкм | | |

Условия
определения

Подвижная фаза: фосфатный буфер – метанол –
муравьиная кислота 0,01 % раствор (77:18:5, об.%)

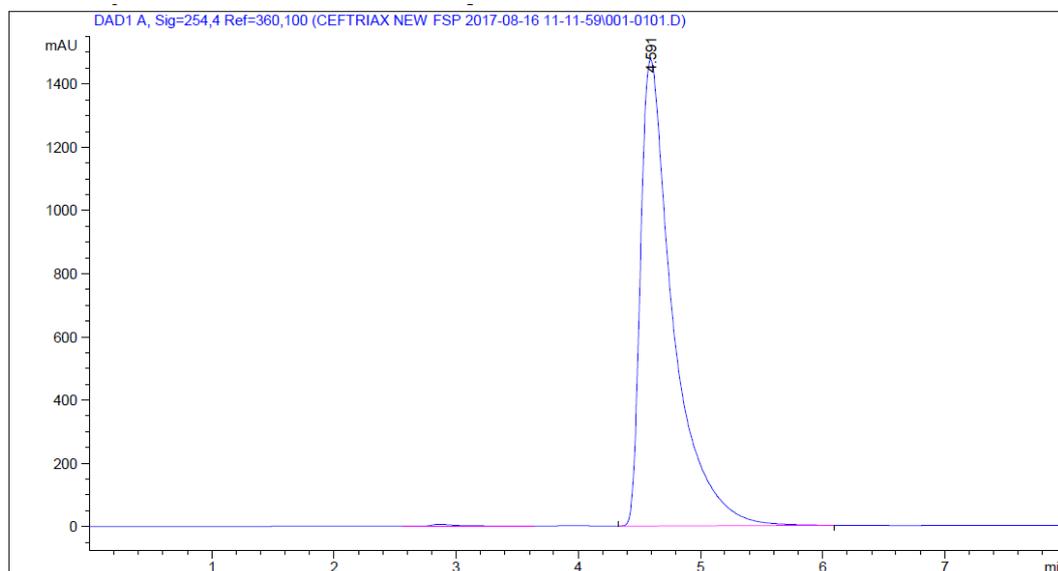


Рис. 3.1. Хроматограмма цефтриаксона (300 мкг/мл). Подвижная фаза: фосфатный буфер – метанол – муравьиная кислота 0,01 % раствор (77:18:5, об.%). Длина волны: 254 нм. Колонка: Eclipse Plus C18, 150 мм x 4,0 мм, 5.0 мкм.

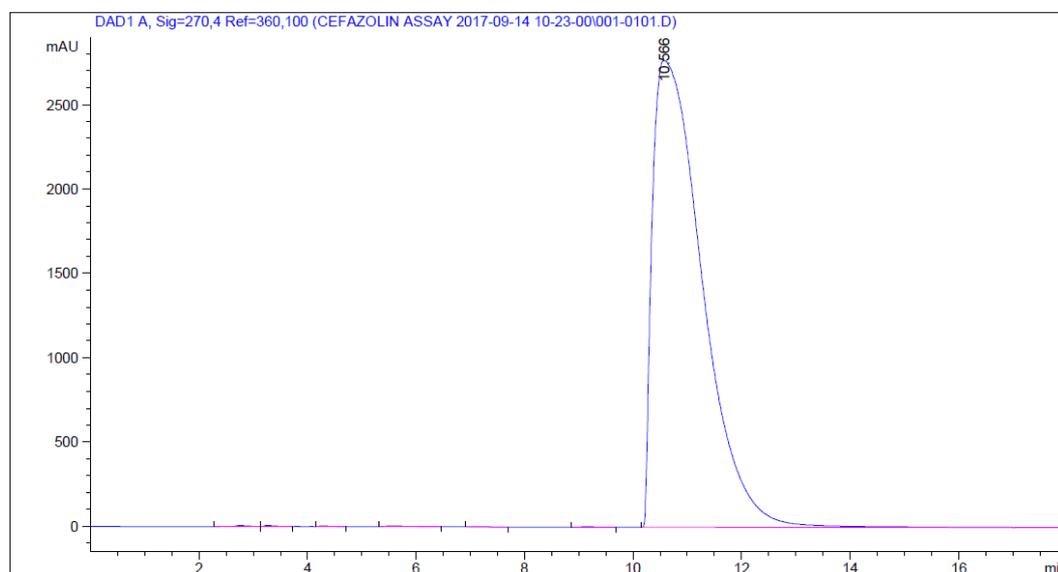


Рис. 3.2. Хроматограмма цефазолина (1000 мкг/мл). Подвижная фаза: фосфатный буфер – метанол – муравьиная кислота 0,01 % раствор (77:18:5, об.%). Длина волны: 270 нм. Колонка: Eclipse Plus C18, 150 мм x 4,0 мм, 5.0 мкм.

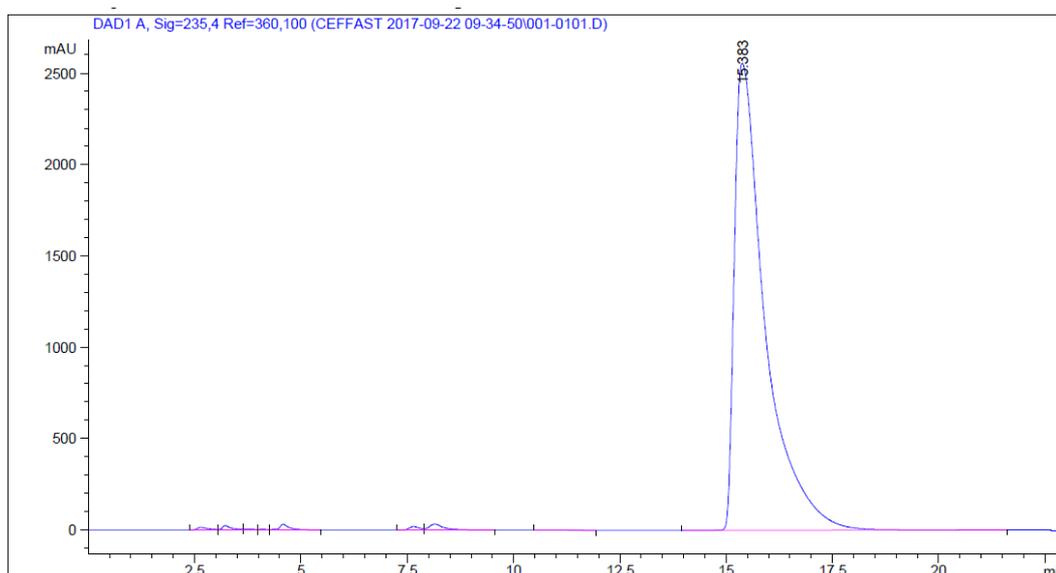


Рис. 3.3. Хроматограмма цефотаксима (800 мкг/мл). Подвижная фаза: фосфатный буфер – метанол – муравьиная кислота 0,01 % раствор (77:18:5, об.%). Длина волны: 235 нм. Колонка: Eclipse Plus C18, 150 мм x 4,0 мм, 5.0 мкм.

Таблица 3.5.

Оценка пригодности хроматографической системы (n=10)

| Определяемое соединение | Симметрия пика | Число теоретических тарелок | RSD% | RSD% S пика |
|-------------------------|----------------|-----------------------------|--------------|--------------|
| Цефтриаксон | 1,17 | 3195 | 0,69 | 0,91 |
| Цефазолин | 1,29 | 4954 | 0,56 | 0,70 |
| Цефотаксим | 1,32 | 7137 | 0,75 | 0,97 |
| Критерий приемлемости | 0,8-2,0 | Не менее 2000 | Не более 2,0 | Не более 2,0 |

Повышенные требования к качеству растворителей при использовании градиентного режима позволяют уменьшить число и величину мешающих системных пиков на хроматограммах. Кроме того, применение высокочистых растворителей значительно продляет срок службы дорогостоящих хроматографических колонок, особенно при серийном фармацевтическом анализе.

3.3. Аналитические характеристики ВЭЖХ определения цефалоспоринов.

Достоверность результатов аналитического определения подтверждается совокупностью параметров их валидации: определением пригодности хроматографической системы, а также установлением критериев специфичности, правильности, точности, линейности, диапазона количественного определения, предела детектирования и предела количественного определения [142]. Доказательство достоверности аналитического определения основано на следующей концепции: оборудование, анализируемые образцы, стадии аналитического определения, способы сбора данных и их обработки представляют собой интегрированную систему.

Линейность оценивали как способность методики обеспечивать отклик детектора, прямо пропорциональный концентрации вещества в пробе. Концентрационный диапазон линейности зависит от природы вещества и условий детектирования. Диапазон определяемых содержаний устанавливали как интервал между верхним и нижним уровнями концентраций ЛВ для которого установлено, что методика обеспечивает необходимые значения правильности, точности и линейности.

Предел детектирования (ПрД) определяли по 3σ критерию Кайзера как минимальное количество вещества в пробе, которое отчетливо детектируется на основании экспериментальных данных по уравнению линейной калибровки для соотношения сигнал/шум около 3/1. Предел количественного определения (ПрО) определяли как минимальное количество вещества в пробе, которое может быть определено количественно с необходимой точностью и правильностью на основании экспериментальных данных по уравнению линейной калибровки.

Аналитические характеристики ВЭЖХ определения анализируемых ЛВ приведены в табл. 3.6.

Таблица 3.6.

Аналитические характеристики ВЭЖХ
определения лекарственных веществ (n=10)

| Лекарственное вещество | Диапазон определяемых содержаний, мкг/мл | Наклон градуировочной зависимости | b | Коэффициент корреляции | ПрД, мкг/мл | ПрО, мкг/мл |
|----------------------------|--|-----------------------------------|-------|------------------------|-------------|-------------|
| Цефтриаксон натриевая соль | 5 - 500 | 1638 | 45 | 0,9999 | 0,07 | 0,15 |
| Цефазолин натриевая соль | 10 - 1000 | 1854 | -1133 | 0,9996 | 0,1 | 0,20 |
| Цефотаксим натриевая соль | 10 - 1000 | 1737 | -588 | 0,9995 | 0,1 | 0,18 |

В табл. 3.6 приведены значения предела детектирования и предела количественного определения для определяемых соединений. В УФ-ВЭЖХ обе этих величины зависят от параметров хроматографической системы. ПрО указаны с соблюдением условия, что относительное стандартное отклонение и отклонение от номинального значения не превышают 15%. При необходимости некоторое повышение чувствительности возможно при увеличении объема инжестируемой пробы. В табл. 3.6 приведена верхняя граница линейного диапазона для всех определяемых соединений при указанных выше длинах волн детектирования и объемах инжестируемых образцов.

Подтверждением линейной зависимости между концентрацией определяемого соединения в пробе и площадью пика этого соединения в хроматографируемом образце могут быть коэффициенты корреляции градуировочных зависимостей для всех определяемых соединений в выбранном диапазоне концентраций (n=10 для каждой концентрации), которые были не хуже 0,9990.

Специфичность оценивалась как способность методики однозначно определить конкретное вещество в присутствии всех других компонентов

матрицы. Специфичность методики доказывалась по отсутствию отклика примесей на хроматограмме раствора бланка в диапазоне времен удерживания анализируемых соединений и по точности определения анализируемых соединений в тестах на правильность и прецизионность метода (рис. 3.4).

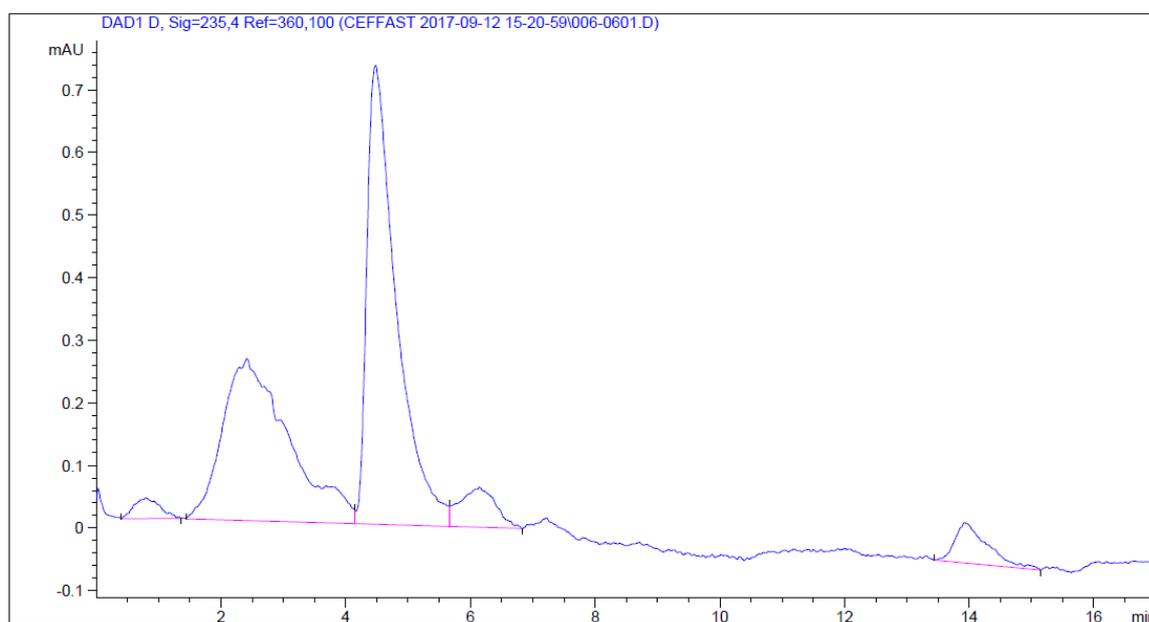


Рис. 3.4. Хроматограмма бланка (для количественного определения цефотаксима). Подвижная фаза: фосфатный буфер – метанол – муравьиная кислота 0,01 % раствор (77:18:5, об.%). Длина волны: 235 нм. Колонка: Eclipse Plus C18, 150 мм x 4,0 мм, 5.0 мкм.

Оценка диапазона и правильности методики проводилась на модельных смесях, содержащих различные концентрации действующих веществ (табл. 3.7). Правильность оценивалась как характеристика совпадения результатов количественного определения действующего вещества (веществ) и истинного (заданного) значения определяемой величины. Для оценки систематической составляющей погрешности разработанных методик был использован метод «введено-найдено». Результат контроля не превышает величин, допускаемых для фармацевтических методов при определении соединений, концентрация которых в исходной пробе выше предела количественного определения, что свидетельствует об отсутствии значимых систематических погрешностей в результатах анализа.

Устойчивость оценивалась как характеристика способности аналитического метода обеспечивать оговоренные в методике критерии достоверности и воспроизводимости результатов при незначительных, преднамеренных изменениях параметров методики. Стабильность может в определенной степени оцениваться критериями пригодности аналитической системы. Контроль этих критериев позволяет проверить влияние конкретных условий определения на пригодность системы в целом. Устойчивость методики оценивалась по стабильности пробы в период времени, необходимый для анализа и далее в течение рабочего дня.

Воспроизводимость результатов определения содержания ЛВ оценивали по данным анализа реальных проб. Для оценивания характеристики воспроизводимости образцы обрабатывали и проводили хроматографическое определение в соответствии с прописью методики в условиях воспроизводимости (разное время).

Таблица 3.7.

Результаты определения компонентов модельных лекарственных смесей

| Определяемое соединение(мкг /мл) | Ведено аналита (мкг/мл) | Найдено(мкг/мл) | Оценка открываемости аналита (в %) n=6 | СКО(%) |
|----------------------------------|-------------------------|-----------------|--|--------|
| Цефтриаксон | 300 | 302,7 | 100,90 | 0,45 |
| Цефазолин | 1000 | 995,9 | 99,59 | 0,39 |
| Цефотаксим | 800 | 803,1 | 100,39 | 0,51 |

Таким образом, все разработанные методики ВЭЖХ анализа удовлетворяют требованиям, предъявляемым к методам фармацевтического анализа и могут быть использованы для внутрипроизводственного контроля в рутинной практике.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ВЭЖХ- МАСССПЕКТРОСКОПИЧЕСКОГО МЕТОДА КОНТРОЛЯ И ЧИСТОТЫ ОБОРУДОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕ ЦЕФАЛОСПОРИНОВ

Успешное решение проблемы обеспечения внутрипроизводственного аналитического контроля технологических процессов получения ЛВ и лекарственных форм на их основе во многом обусловлено использованием высокопроизводительных, избирательных, чувствительных и экономичных методов определения ЛВ в ходе процедур контроля качества технологического процесса. Наиболее полно этим требованиям отвечают доступные для производственной лабораторной практики оптические методы анализа, для которых значительный объем аналитической информации, получаемой непосредственно в ходе технологического процесса, и доступность унифицируемой приборной базы, способствуют дальнейшему расширению областей их использования в практике фармацевтического анализа. Расширение возможностей ВЭЖХ- масспектроскопии в анализе многокомпонентных лекарственных смесей также обусловлено относительной простотой способов определения ЛВ, а также техники выполнения измерений и возможностями стандартизации этих аналитических процедур. Следует отметить, что во многих случаях им характерна малая специфичность, чувствительность, а также длительность, трудоемкость выполнения аналитических процедур при их использовании, зачастую необходимость использования методов разделения компонентов анализируемых смесей. Эти факторы ограничивают использование выше упомянутых аналитических подходов для анализа ЛВ в смывах с технологического оборудования при производстве их лекарственных форм и проблема разработки экспрессных методов определения этих ЛВ в различных фармацевтических объектах является весьма актуальной [161-164].

4.1. Разработка качественного обнаружения и количественного определения цефалорпаринов методом ВЭЖХ-масспектрологии.

Масс-спектрометрия - один из наиболее мощных и информативных методов исследования структуры органических соединений и химического анализа сложных веществ и их смесей. Это прямой метод, позволяющий непосредственно определять молекулярную массу, элементный состав молекул и их фрагментов, их связь между собой и взаимное расположение, изучать механизмы фрагментации. На основании этих данных находятся корреляционные зависимости между структурными характеристиками молекул и ионов, образующихся в результате распада молекул при ионизации. Помимо этого в масс-спектрометрическом эксперименте изучают процессы передачи энергии при взаимодействии молекул с электронами и ионами, перегруппировки атомов в образующихся ионах и влияние определенных функциональных и структурных групп на процессы ионизации и фрагментации.

Качественное обнаружение и количественное определение содержания цефалорпаринов проводили методом ВЭЖХ-МС.

В работе был использован высокоэффективный жидкостной хроматограф (ВЭЖХ) с тройным квадрупольным масс-спектрометром LC-MS Triple Quad QQQ Agilent Technologies (США). Хроматографические условия были подобраны следующим образом: Подвижная фаза: 5 мин. H₂O – 100% для изократического элюирования и ацетонитрил/вода в соотношении до 80% органического растворителя в градиентном элюировании. Температура колонки была установлена при 20°C.

Ионизация проводилась с электрораспылением (ESI), скорость потока газа осушителя (азот) 10 мл/мин при температуре 300 °С, давления газа на игле распылителя 20 psi, напряжение фрагментатора соответственно для цефазолина 200 В, напряжение капилляра - 4000 В.

Анализы были проведены как в режиме одиночной ионный режим (SingleIonMode – SIM), так и в режиме полного сканирования (Fullscanmode) для разработки метода определения цефазолина.

ВЭЖХ-МС скрининг

ВЭЖХ анализы проводились с образцами объемом 2 мкл, которые вводили с помощью автоматического пробоотборника. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил – вода, добавленный 0,01% муравьиной кислоты для положительного ионного контроля при скорости потока 0,2 мл/мин. Для SIM режимы были применены для качественного и количественного анализа с использованием целевых ионов

дигидрофосфата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл растворяют в воде для инъекций, доводят объём раствора тем же растворителем до метки и перемешивают.

Приготовление фосфатного буферного раствора рН 6,6: 250 мл 0,2М раствора калия дигидрофосфата помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляют туда же 89 мл 0,2М раствора натрия гидроксида, доводят объём раствора водой очищенной до метки и перемешивают.

При проведении анализа по 2 мкл испытуемого раствора А, раствора сравнение Б и раствора сравнение С попеременно хроматографировали на ВЭЖХ-МС, получая не менее 5 хроматограмм для каждого из растворов.

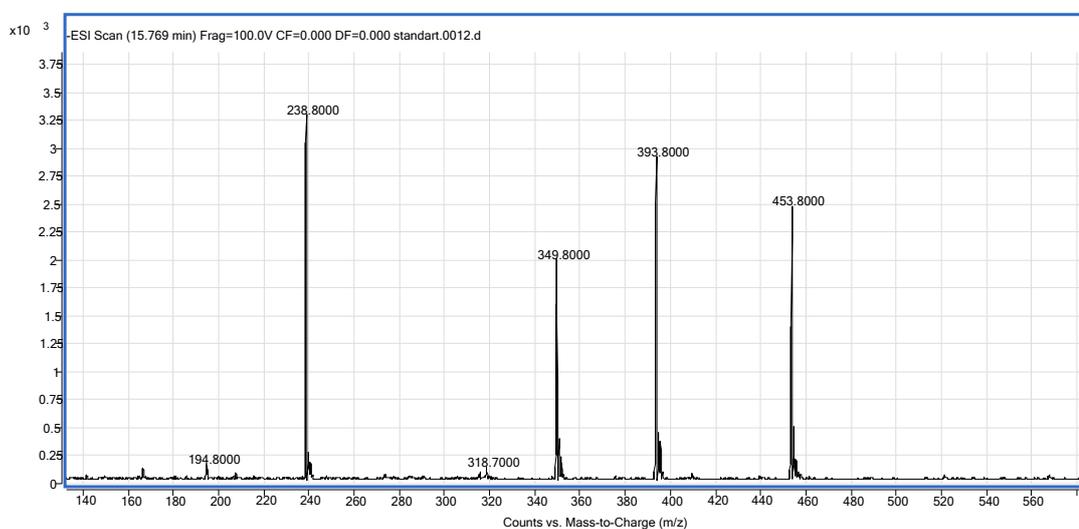


Рис-4.1. ВЭЖХ-масс спектр цефатоксима

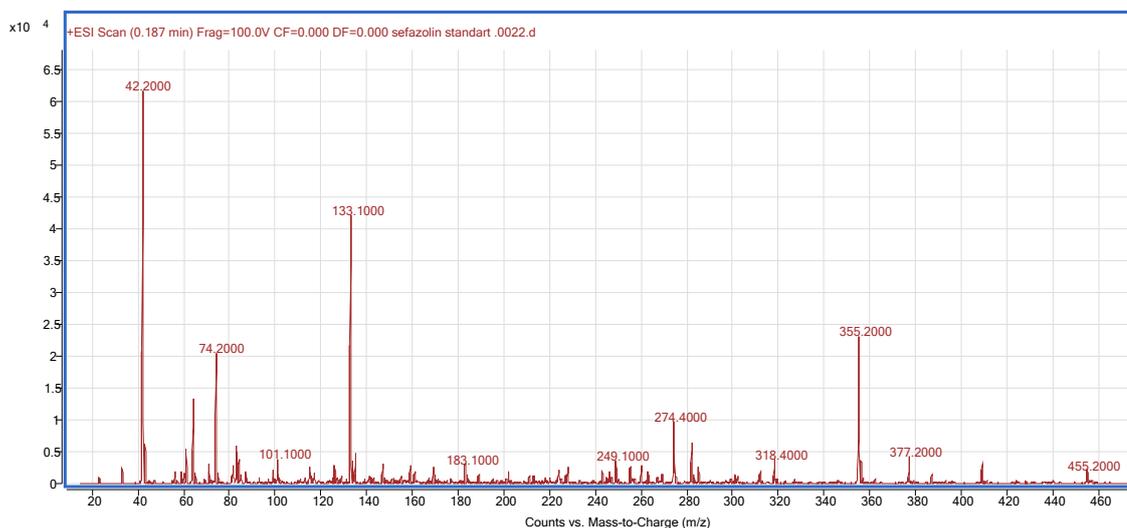


Рис-4.2. ВЭЖХ-масс спектр цефазолин

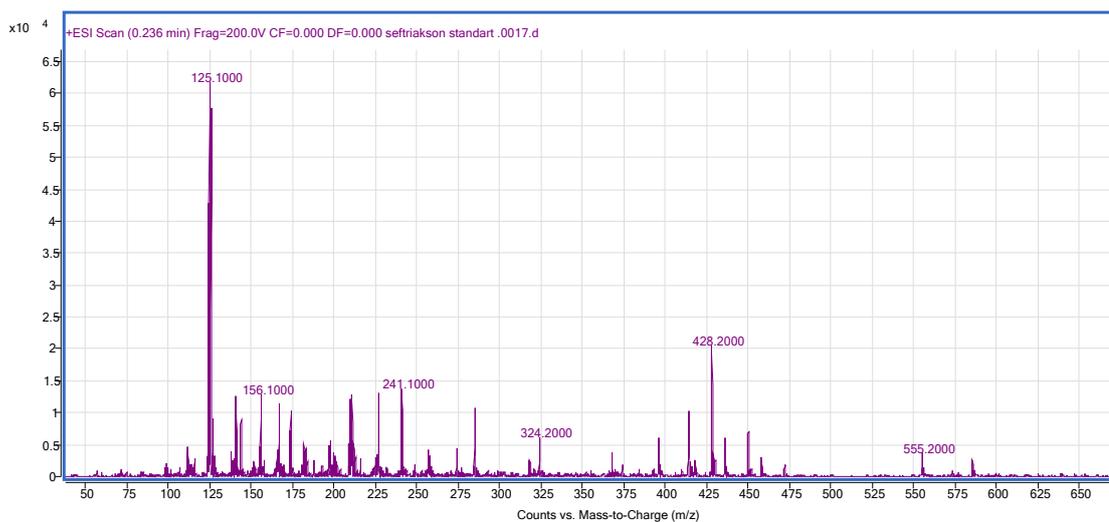


Рис-4.3 ВЭЖХ-масс спектр цефтриаксона

Как видно по хроматограмме, в препарате кроме цефазолина содержатся дополнительные сопутствующие вещества. Содержание цефазолина (X) в препарате, в мкг/мг, вычисляли по формуле:

–в максимальной суточной дозе препарата может содержаться не более 0,1 % средней терапевтической дозы любого произведенного передним препаратом;

–в препарате не должно содержаться более 10 ppm любого другого препарата.

Для определения остаточных количеств АФИ используют методы, обладающие селективностью по отношению к примесям–продуктам деградации, возникающим в процессе отмывки, а также высокой чувствительностью. К таким методам, как правило относятся высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и УФ-спектроскопия [161-163].

Хроматографическое определение ЛВ имеет ряд преимуществ для использования в качестве перспективного, доступного для производственной практики способа контроля чистоты оборудования при проведении технологического процесса. При этом метод ВЭЖХ с достаточной избирательностью и чувствительностью позволяет решить эти задачи при его применении во внутрипроизводственном контроле. Для этого может быть использован анализ смывов с рабочих поверхностей оборудования на присутствие основного вещества, входящего в лекарственный препарат, обрабатывавшийся последним.

ГЛАВА 5. ВАЛИДАЦИЯ ПРОЦЕССА ОЧИСТКИ ОБОРУДОВАНИЯ ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

5.1. Разработка подходов по валидации процесса очистки оборудования.

Лекарственные препараты и активные фармацевтические субстанции могут быть загрязнены другими препаратами или активными фармацевтическими субстанциями, моющими или дезинфицирующими средствами, вспомогательными веществами, промежуточной продукцией и др. Во многих случаях при производстве различных препаратов используется одно и то же оборудование. Поэтому для предотвращения контаминации каждого последующего препарата предыдущим или предыдущей серией того же наименования очень важным является проведение эффективной процедуры очистки оборудования.

В идеальном случае для очистки каждой единицы оборудования после любого произведенного продукта должен быть использован один процесс. Однако на практике может потребоваться проведение более чем одного процесса очистки, что связано с различной химической активностью действующего и вспомогательных веществ. Если требуется проводить более одного процесса очистки, то необходимо разработать несколько стандартных операционных процедур (СОП) и контролировать их выполнение для каждого продукта.

При производстве одного наименования лекарственного средства при переходе от серии к серии очистка после каждой серии, как правило, необязательна. Однако такие действия необходимо обосновать и установить интервалы времени между проведением очисток с указанием используемых методов. При переходе к выпуску другого наименования лекарственного средства проведение очистки оборудования обязательно, а применяемые процедуры должны быть валидированы.

Валидацию процесса очистки оборудования необходимо проводить для каждой единицы оборудования. Как правило, необходимо проводить валидацию только процесса очистки поверхностей оборудования, непосредственно контактирующих с продукцией. Валидацию считают удовлетворительной при последовательном получении трех положительных результатов [2,36,41].

Можно сгруппировать похожие препараты с учетом их физических характеристик, состава, дозировки (например, препараты, относящиеся к одной фармакотерапевтической группе или препараты одного наименования, но различной дозировки) или процессы и проводить валидацию только для одного представителя каждой группы. Такая практика, называемая «группированием», позволяет не проводить валидацию для каждого отдельного, но похожего препарата и процесса. Затем можно провести одно валидационное исследование в условиях наихудшего случая, в котором будут учтены все значимые критерии, такие как максимальная дозировка активного вещества, минимально допустимое количество остатков предыдущего продукта и др. [2,36,41].

Ревалидацию следует проводить в случаях изменения оборудования, состава продукта, технологических процессов, процедуры очистки, а также периодически через определенные интервалы времени.

Очистка оборудования должна проводиться после окончания производственного цикла в течение времени, установленного в стандартной операционной процедуре (СОП). В ней должны быть описаны:

- способ очистки с указанием каждого критического шага;
- перечень участков оборудования, требующих повышенного внимания;
- перечень съемных частей оборудования и описание проведения процедуры разборки, необходимой для эффективной очистки;
- перечень используемых моющих средств и/или растворителей и их концентрация;
- список инвентаря, применяемого для очистки оборудования;
- проведение визуальной проверки чистоты оборудования;

- маркировка, используемая для обозначения статуса оборудования.

Проведение валидации очистки оборудования должно включать в себя следующие этапы:

- проведение процесса очистки оборудования;
- визуальная проверка чистоты оборудования на отсутствие видимых загрязнений;
- отбор проб;
- передача проб в лабораторию отдела контроля качества;
- заполнение протокола валидации;
- анализ еще двух серий продукта;
- анализ полученных результатов и сравнение их с критериями приемлемости;
- составление отчета о валидации.

Перед проведением валидации необходимо разработать заполняемую форму - протокол валидации процесса очистки, включающий следующие данные:

- цель процесса валидации;
- полномочия и ответственность за проведение валидации и оценку ее результатов;
- наименование продукта, после окончания производства которого будет проводиться валидация;
- описание всего используемого оборудования, включая вспомогательные устройства, с указанием наиболее трудных для очистки мест (так называемые «критические зоны»);
- время, прошедшее между завершением технологического процесса и началом процесса очистки;
- описание процесса очистки оборудования или ссылка на соответствующую СОП;
- количество последовательно проведенных циклов очистки;

- любые требования к рутинному контролю;
- используемые методики отбора проб или ссылки на них;
- используемые аналитические методы с указанием предела количественного обнаружения, или ссылки на соответствующие методики или СОП;
- критерии приемлемости, включая обоснование их установления;
- перечень других продуктов, процессов и/или оборудования в случае применения концепции «группирования»;
- требования к проведению валидации и последующему мониторингу;
- обучение.

После окончания процесса валидации очистки и проведения всех необходимых анализов должен быть составлен отчет о валидации. Отчет должен включать:

- описание всех отклонений в процедурах очистки или отбора проб по сравнению с протоколом валидации,
- все результаты аналитических испытаний, включая все наблюдения, сделанные во время валидации,
- заключение по результатам испытаний со всеми необходимыми рекомендациями, сделанными на основании полученных результатов.

Важным вопросом является оценка эффективности процедур очистки в отношении удаления остатков моющих средств [41]. Моющие средства не входят в состав продукта. Они предназначены только для облегчения проведения очистки оборудования и не должны оставаться на оборудовании после последней промывки, поэтому требуется установить допустимые пределы содержания моющего средства после очистки, для чего необходимо знать их состав. Желательно получать данные от поставщиков о любых критических изменениях в составе моющего средства. В идеальном случае остатки моющих средств не должны быть обнаружены. Во время проведения валидации процесса очистки необходимо учитывать способность моющего средства к разложению.

Если полученные результаты не соответствуют критерию приемлемости, не следует вторично проводить валидацию очистки. Необходимо еще раз оценить эффективность процесса очистки, работу операторов, используемое оборудование для оптимизации процесса очистки. Перед проведением вторичной валидации необходимо откорректировать процесс очистки (моющие средства, температура жидкости для промывки, операции очистки), модифицировать оборудование и/или провести переподготовку операторов [2,36,41].

Важным моментом является установление пределов содержания остатков продуктов (критерии приемлемости). При этом необходимо принимать во внимание используемые вещества и их терапевтическую дозу. Их значения должны быть обоснованными, достижимыми и поддающимися проверке.

К установлению пределов может быть применен любой из следующих подходов:

- проведение валидации очистки для каждого из выпускаемых препаратов,
- группирование препаратов и выбор препарата, представляющего «наихудший случай»,
- группирование препаратов по группам риска (например, легкорастворимые препараты, препараты со сходной активностью, высокотоксичные препараты, а также препараты, которые трудно обнаружить).

Согласно рекомендациям PIC/S допустимое количество остатков препарата должно соответствовать следующим критериям [2,36,41]:

- в максимальной суточной дозе препарата может содержаться не более 0,1 % средней терапевтической дозы любого произведенного перед ним препарата,
- в препарате не должно содержаться более 10 ppm (particlepermillion) любого другого препарата,
- после завершения процедур очистки на оборудовании не должно быть видимых следов. Необходимо определить концентрацию, при которой

становятся видимыми наиболее активные ингредиенты, посредством проведения исследований при известном загрязнении,

- предел содержания для определенных ингредиентов, являющихся аллергенами (пенициллины, цефалоспорины) или сильнодействующими веществами (некоторые стероиды и цитотоксины), должен быть ниже предела обнаружения, установленного с помощью самых современных аналитических методов. На практике это может означать, что для их производства следует использовать специально предназначенные помещения и оборудование.

5.2. Разработка программы валидации и оценка валидационных параметров.

Разработка программы валидации и оценка валидационных параметров представлены ниже на примере оценки эффективности процедуры очистки машины фасовочного дозатора DM-20 (далее по тексту DM-20), применяемой в химико-фармацевтическом производстве. Для проведения процесса валидации очистки выбран именно бункер дозатора, так как это сложный по конструкции аппарат фармацевтического производства и в нем имеются труднодоступные элементы для эффективной очистки. DM-20 состоит из частей соприкасающихся с продуктом: бункера дозатора, тефлоновая трубка, промежуточная мешалка, дозирующее колесо и корпус дозатора.

Дозирование стерильных порошки для приготовления инъекционного раствора во флаконах является сложным и достаточно трудоемким технологическим процессом, включающим в себя большое количество операций: загрузку стерильных порошков в бункер, смешение, подачу порошки в дозировании, укупорку, обвальцовку защитных колпачков, а также транспортирование и выгрузку.

Суть процесса дозирования в аппарате DM-20 сводится в следующем: в стерильном помещении загрузится порошки в бункер, смешиваются и через тефлоновая трубка поддаются в дозирующее колесо, в результате чего порошки

поместится во флаконах, закрываются пробками и отправляются в фасовку и маркировку.

Валидацию процесса очистки DM-20 проводим в отношении эффективности удаления остатков содержания активного действующего вещества.

Валидацию процесса очистки DM-20 проводим методом группирования: группируем похожие препараты с учетом их характеристик и проводим валидацию только для одного представителя группы.

Для выборки наиболее представительных продуктов учитываются:

- сходство физических характеристик продукта (растворимость в воде активного ингредиента, наличие в составе продукта красящих веществ);
- отношение к списку сильнодействующих веществ.

Для целей валидации процесса очистки были выбраны:

- «Витаксон» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 и 1,0 г (активный ингредиент –цефтриаксон натриевая соль–легко растворим в воде);
- «Интралин» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 и 1,0 г (активный ингредиент –цефазолин натриевая соль–легко растворим в воде);
- «Цеффастр» порошок для приготовления инъекционного раствора по 0,5 и 1,0 г (активный ингредиент –цефотаксим натриевая соль–легко растворим в воде).

Валидационные мероприятия очистки DM-20 проводили в три этапа в соответствии с таблицей 5.1. Методы отбора проб остатков с поверхности оборудования представлены в табл. 5.2.

Таблица 5.1.

Этапы валидации процесса очистки DM-20.

| Этап валидации | Позиция оборудования | Наименование продукта, который последним производился на этом оборудовании |
|----------------|----------------------|--|
| I этап | DM-20 | «Витаксон» |
| II этап | | «Интралин» |
| III этап | | «Цеффаст» |

Таблица 5.2.

Методы отбора проб

| Части DM-20 соприкасающиеся с продуктом | Методы отбора проб действующего вещества | |
|---|--|---|
| | Прямой отбор пробы (метод мазков) | Анализ последних промывных вод (метод смывов) |
| Бункер дозатора | + | + |
| Тефлоновая трубка | | + |
| Промежуточная мешалка | + | + |
| Дозирующее колесо | + | + |
| Корпус дозатора | | + |

Данные для определения общего допустимого предела остатков препаратов по всей внутренней поверхности DM-20 перед началом изготовления последующего продукта, определяются после расчета общего допустимого предела остатков препаратов по поверхностям, контактирующих с продуктом, всех единиц оборудования, задействованных в производстве данных препаратов.

Расчет пределов остатков активных веществ устанавливается на основании лечебного или фармакологического действия остатка. Данные для определения остатков активных веществ в продукте представлены в табл. 5.3.

Общий допустимый предел остатков активных веществ на поверхности по всему производственному оборудованию перед началом изготовления следующего препарата вычислялся по формуле:

| | | | | |
|-------------|-------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | | препарат «Витаксон» | препарат «Интралин» | препарат «Цеффастан» |
| Цефтриаксон | 20000 | - | 20000 | 8333,3 |
| Цефазолин | 18750 | 18750 | - | 4166,7 |
| Цефотаксим | 10000 | 18750 | 10000 | - |

Максимальный предел остатков активных веществ на поверхности DM-20, представлен в табл. 5.5.

Критерий приемлемости по чистоте оборудования - концентрация остатка активных веществ в пробе ($C_{\text{остаток}}$ [мг/мл] или [ppm]) на поверхности оборудования размером 0,0025 м² методом прямого отбора проб, представлена в табл. 5.6. Общая площадь поверхности оборудования — 9,1 м².

Таблица 5.5.

Общий допустимый предел остатков активных веществ на поверхности DM-20

| Наименование активного действующего вещества | Minimum MAC, мг |
|--|-----------------|
| Цефтриаксон | 5495 |
| Цефазолин | 5151 |
| Цефотаксим | 2747 |

Таблица 5.6.

Критерий приемлемости содержания остатков активных веществ в пробе

| | | | |
|---|---|-----------|------------|
| Площадь поверхности оборудования, контактирующая с активным веществом | Критерий приемлемости | | |
| | Максимальное допустимое содержание остатков активных веществ в пробе, мг/мл | | |
| | Цефтриаксон | Цефазолин | Цефотаксим |

| | | | |
|---|-------|-------|-------|
| Бункер дозатора Промежуточная мешалка Дозирующее колесо | 0,002 | 0,002 | 0,001 |
|---|-------|-------|-------|

Так как предел количественной оценки использованного аналитического метода составляет 5 ppm, следовательно, результаты будут получены с достаточной точностью и правильностью. Критерий приемлемости по чистоте оборудования - концентрация остатка активных веществ в пробе ($C_{\text{остаток}}$ [г/мл] или [ppm]), определенная с помощью метода последнего ополаскивания, представлена в табл. 5.7. Объем пробы остатка выполняется в объеме 52 л ($V=52 \text{ дм}^3$), а проба не разбавлена.

Таблица 5.7.

Критерий приемлемости содержания остатков активных веществ в пробе

| Площадь поверхности оборудования, контактирующая с активным веществом | Критерий приемлемости | | |
|---|---|-----------|------------|
| | Максимальное допустимое содержание остатков активных веществ в пробе, мг/мл | | |
| | Цефтриаксон | Цефазолин | Цефотаксим |
| Бункер дозатора Тефлоновая трубка Промежуточная мешалка Дозирующее колесо Корпус дозатора | 0,002 | 0,002 | 0,001 |

Так как предел количественной оценки использованного аналитического метода составляет 5 ppm, следовательно, результаты будут получены с достаточной точностью и правильностью.

На каждом этапе программу валидации повторяли три раза (параллельно производству трех последовательных промышленных серий продукта).

Рассматриваемое оборудование нового поколения, сконструированное по правилам GMP и ГОСТ Р 52896-2007. В оборудование встроена автоматическая система очистки (сир-мойка). В качестве моющего средства используется вода для инъекций.

Части DM-20соприкасающиеся с продуктом обрабатывают следующим образом: внутреннюю поверхность DM-20(бункер дозатора, тефлоновая трубка,промежуточная мешалка, дозирующее колесо) промывают инъекционной водой при температуре не ниже 80 С в течение 20 мин, продувают линию подачи воды сжатым воздухом в течении 2 мин, выдерживают оборудование в течение 5 мин для самопроизвольного слива воды с внутренних стенок.

Определение количественного содержания активных веществ в смывах проводилось методами ВЭЖХ в соответствии с методиками количественного определения данных препаратов в смывах, представленных в главах 3 и 4. Полученные результаты удовлетворяют заявленному критерию приемлемости и свидетельствует о высокой степени очистки поверхностей оборудования, контактирующих с продуктами (табл. 5.8). Как видно, концентрация активного вещества в последней ополаскивающей жидкости на каждом этапе валидации процесса очистки поверхностей оборудования, соприкасающихся с продуктом, не превышает максимально-допустимое количество, заявленное в критерии приемлемости. Степень очистки оборудования удовлетворительная.

Таблица 5.8.

Результаты количественного определения содержания лекарственных веществ в пробах

| Лекарственные вещества | Содержание активных веществ, мкг/мл | |
|------------------------|-------------------------------------|--------------|
| | Метод мазков | Метод смывов |
| Цефтриаксон | 0,73 ± 0,03 | 0,81 ± 0,04 |
| Цефазолин | 0,64 ± 0,05 | 0,69 ± 0,04 |
| Цефотаксим | 0,78 ± 0,04 | 0,88 ± 0,03 |

Для производства «Цеффастр», общий допустимый предел остатков активных веществ на поверхности DM-202747 мг, $A_{total}=91000 \text{ см}^2$. Отбор проб остатка выполняется с помощью метода смыва с площади $A_{sample}=25 \text{ см}^2$, в объеме 25 мл ($V=0,025 \text{ дм}^3$), а проба не разбавлена ($F=1$). Подставляя перечисленные значения в отношении, рассчитаем необходимый предел количественной оценки по формуле:

оценить эффективность процесса очистки, работу операторов, используемое оборудование для оптимизации процесса очистки. Перед проведением вторичной валидации необходимо откорректировать процесс очистки (моющие средства, температура жидкости для промывки, операции очистки), модифицировать оборудование и/или провести переподготовку операторов.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны способы отбора и подготовки проб для контроля чистоты химико-фармацевтического оборудования цефалоспоринов путем использования метода мазков и ополаскивания. Предложено применять такие универсальные растворители, как вода, этанол и их смеси, что связано не только с растворимостью аналитов, но и общим составом образца, а также с их кислотно-основными свойствами. Степень извлечения действующих веществ при использовании метода мазков находится в интервале 81-85 %, а метода смывов - 68-71 %.

2. Разработана унифицированная ВЭЖХ-методика определения концентрации цефтриаксона, цефазолина, цефотаксима в смывах с оборудования при использовании доступных подвижных фаз на сорбентах типа С18 и спектрофотометрическом варианте детектирования. Установлены условия хроматографического разделения аналитов на колонках 150x4,0 мм взамен традиционных (100-250 мм), что в 10-20 раз снижает расход растворителей и во столько же раз повышает чувствительность определения и обеспечивает экономичность анализа при его длительности не более 10-15 минут.

3. Достигнутая эффективность колонок составила от 2500 до 8000 т.т. Определение характеризуется высокой селективностью (более 1,2) и симметрией пиков (менее 1,35). Пределы детектирования исследуемых веществ достигают 0,07 мкг/мл, пределы количественного определения - от 0,15 мкг/мл при диапазоне определяемых содержаний от 5 до 1000 мкг/мл. Это соответствует современным требованиям к параметрам пригодности хроматографической системы.

4. Найдены условия хромато-масс спектрофотометрического определения цефтриаксона натрия, цефазолина натрия и цефотаксима натрия. Разработаны методики количественного определения этих веществ в смывах с оборудования и показана возможность их использования для

перспективногвнутрипроизводственного контроля.

5. Разработана программа валидации процесса очистки оборудования и обосновано ее использование во внутрипроизводственном контроле химико-фармацевтического производства. Критерии приемлемости установлены на примере оборудования для смешения и дозирования порошки при производстве цефалоспоринов.

Литература

1. Гармонов, СЮ. Контроль качества и безопасность лекарственных препаратов / СЮ. Гармонов. — Казань: КГТУ, 2008. — 324 с.
2. Попов, А.Ю. Валидация критических процессов и зон / А.Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. - 2005. - № 2. — С. 11-13.
3. Шилова, СВ. Создание и развитие концепции организации производства готовых лекарственных средств в России / СВ. Шилов // Фарматека. - 1999. - № 2. - С 43-46.
4. Правила производства лекарственных средств Европейского сообщества(ОМР ЕС): комментарии (перевод с английского) / под ред. А.Е.Федотова. - М.: АСИНКОМ, 1998. - 523 с.
5. Глущенко, Н.Н. Фармацевтическая химия / Н.Н.Глущенко, Т.В. Плетенева, В.А. Попков. -М.: Академия, 2004. - 384 с.
6. Петров, Р.В. От фундаментальной разработки до лекарства / Р.В. Петров // Вестник РАН. - 2004. - Т.74. - №5. - С.407-414.
7. Попов, А.Ю. Система анализа риска как первый шаг в переходе к работе по правилам надлежащей производственной практики (GMP) / А.Ю. Попов, А.П. Мешковский // Фарматека. - 2002. - № 4. - С. 62-64.
8. Мешковский, А.П. О концепции внедрения правил GMP в России / А.П. Мешковский // Фарматека. - 2003. - № 5. - С. 32-37.
9. Мешковский, А.П. Надлежащая практика производства и контроля качества лекарственных средств ГОСТ 52249-2004: сравнение с международными стандартами GMP / А.П. Мешковский // Фарматека. -2004. - №5.-С 39-41.
10. Попов, А.Ю. Как наиболее эффективно соответствовать требованиям GMP? / А.Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. -2005. - № 1. - С 9-Ю.
11. Попов, А.Ю. Повышение эффективности перехода российских

предприятий к работе в соответствии с правилами GMP / А.Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. -2003. - № 1. - С. 5-6.

12. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. - Введ. 2009-06-08. - М.: Изд-во стандартов, 2009. -132 с.

13. ГОСТ Р 52249-2004. Правила производства и контроля качества лекарственных средств.

14. Стефанов, А.В. К стратегии внедрения правил GMP в странах СНГ. Иллюзии и реалии / А.В. Стефанов // Ремедиум. - 2004. -№ 1-2. — С. 16-21.

15. Попов, А.Ю. Внедрение GMP в России: взгляд на проблему / А.Ю. Попов // Фарматека. -2002. -№ 2-3. - С.76-77.

16. Флисюк, Е.В. Об организации производства нестерильных лекарственных средств с учетом требований GMP / Е.В. Флисюк // Чистые помещения и технологические среды. -2004. -№ 7. - С. 33-40.

17. Мешковский, А.П. Правила GMP для вспомогательных веществ / А.П. Мешковский // Фарматека. -1998. -№6. - С. 37-41.

18. Михайленко, В. А. Особенности проектирования фармпредприятий на соответствие правилам GMP, часть 2 / В. А. Михайленко // Промышленное обозрение. - 2009. - № 6. - С. 13-15.

19. История возникновения GMP [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://sanpin.ru/about/quality/gmp>

20. Попов, А.Ю. Как соответствовать требованиям GMP? / А.Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. - 2004. -№ 4. - С. 17.

21. Калечиц, В.Н. Чистое помещение — чистое лекарство / В.Н. Калечиц // Технология чистоты. - 2002. -№ 4. — С. 11-14.

22. Чистые помещения / под ред. А.Е.Федотова. - М.: АСИНКОМ, 1999. - 319 с.

23. Хаякава, И. Чистые помещения (перевод с японского) / под ред. А.Е.Федотова. - М.: Мир, 1990. - 454 с.

24. Техника чистых помещений и правила GMP // Сб. докл. VII конф. 27-

29 мая 1997 г. - М.: АСИНКОМ, 1987. - С. 96-99.

25. Закотей, М. Технология чистых помещений в фармацевтическом производстве / М. Закотей // Фарматека. - 2001. -№ 5. - С. 25-28.

26. Литовченко, В.Г. Аттестация чистых помещений / В.Г. Литовченко // Чистые помещения и технологические среды. - 2004. -№ 3. -С. 38-40.

27. Калечиц, В.Н. Технология чистоты помещений / В.Н. Калечиц // Технология чистоты. - 1996. - № 11. - С. 27-29.

28. Ягудина, Р.И. К истории развития государственного контроля качества лекарственных средств в СССР и России / Р.И. Ягудина // Фарматека. - 1998. -№ 4. - С. 15-16.

29. ГОСТ Р 52249-2004. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. Приложение 9 Помещения и оборудование.

30. Попов, А.Ю. Система анализа рисков. Опыт практического применения / А.Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. -2004. -№ 2. -С. 30-31.

31. Попов, А.Ю. Дезинфекция чистых помещений. Современные требования / А.Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. -2003.- №4. -С. 38-40.

32. Гудзовский, А. В. Экспертиза качества воздушной среды в чистых помещениях / А.В. Гудзовский // Технология чистоты. -1997. -№ 2. - С. 21-23.

33. Власенко, В.И. Особенности процесса очистки одежды чистых помещений / В.И. Власенко // Докл. на конф. АСИНКОМ, 11. 2000.

34. Чубарова, З.С. Методики оценки качества специальной одежды / З.С. Чубарова. - М.: АСИНКОМ, 1998. - 161 с.

35. Шилова, С. В. Процесс очистки производственного оборудования и его валидация [Электронный ресурс] / СВ. Шилова. - режим доступа: <http://www.gmp-club.com/ru/intersite/validation/valO106.html>

36. Производство лекарственных средств. Валидация. Основные положения: методические указания / сост. ГУП "ГипроНИИмедпром", ФГУП ГНЦА; Минпромнаука России. - М, 2003. - 10 с.

37. Шилова, СВ. Введение в валидацию / СВ. Шилова // Основные аспекты валидации: материалы научно-практического семинара / ГНЦА, Учебно-производственный центр GMP. — М., 2002. — С. 18-21.

38. Шилова, СВ. Валидация на фармацевтических предприятиях России / СВ. Шилова // Основные аспекты валидации: материалы научно-практического семинара / ГНЦА, Учебно-производственный центр GMP. — М., 2002.-С. 23-25.

39. Шилова, СВ. Организация проведения валидации на фармацевтическом предприятии / СВ. Шилова // Основные аспекты валидации: материалы научно-практического семинара / ГНЦА, Учебно-производственный центр GMP. - М., 2002. - С. 25-27.

40. Аладышева, Ж.И. Основные принципы проведения валидации на фармацевтическом производстве / Ж. И Аладышева, А. П. Мешковский, Л. М. Левин; под редакцией В.В. Береговых — М., 2005. — 186 с.

41. Зденек, П. Валидация очистки / П. Зденек // Валидация: материал научно-практического семинара / Центр фармацевтического обучения. - М., 2008.-С 8-34.

42. Попов, А.Ю. Валидация - что, где, когда? / А.Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. -2003. - № 3. - С.34-37.

43. Шилова, СВ. Проведение валидации очистки оборудования / СВ. Шилова // Технология чистоты. - 2002. - № 6. - С.23.

44. Новиков, Е. Д. Автоматы для изготовления лекарственных форм и фасовки / Е.Д. Новиков, О.Л. Тютенков, Н.А. Филиппин. - М.: Медицина, 1980. - 296 с.

45. ИСО 14644-1 - Чистые помещения и связанные с ними контролируемые пространства. Часть 1: Классификация чистоты чистых помещений и чистых зон по аэрозольным загрязнениям.

46. ГОСТ 50766-95. Помещения чистые. Классификация. Методы аттестации. Основные требования.
47. ИСО 13408-1 - Асептическое производство продукции здравоохранения.
48. Айдам, Г. Гибкие чистые помещения для микробиологии / Г. Айдам // Технология чистоты. - 1998. - №2. - С.13-17.
49. Гудзовский, А. В. Численное моделирование аэротермодинамики и переноса загрязнений в чистых производственных помещениях / А.В. Гудзовский, А.А. Аксенов // Технология чистоты. — 1998. - № 1. - С.31-35.
50. Попов, А.Ю. Современные принципы проектирования чистых помещений / А.Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. -2003.-№5.-С.15-16.
51. Попов, А.Ю. Микробиологический мониторинг воздушной среды изоляторов / А.Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. -2003. - № 3. - С.24-28.
52. Попов, А.Ю. Система анализа рисков. Биологический опасный фактор / А.Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. - 2004. -№4.-С.17-19.
53. Попов, А.Ю. Контроль биозагрязнений в чистых помещениях основывается на анализе рисков / А.Ю. Попов // Чистые помещения и технологические среды. -2004. - № 2. - С.32.
54. Luque de Castro, M.D. Flow-injection analysis of pharmaceuticals / M.D. Luque de Castro, M. Valcarcel // J. Pharm. and Biomed. Anal. - 1989. - V.7. - № 12.- P. 1291-1300.
55. El-Gendy, A.E. Flow-injection analysis of pharmaceutical compounds. Determination of some central nervous system acting drugs by UV-spectrophotometric detection / A.E. El-Gendy, M.G. El-Bardicy, H.M. Lontfy, M.F. El-Tarra// Spectrosc. Lett. - 1993. - V.26. -№ 9. - P. 1649-1660.
56. The United States Pharmacopeia (USP27-NF22). 2004.

57. British Pharmacopoeia .2007.
58. Государственная фармакопея СССР, выпуск 2, 11-е издание, МЗСССР, Медицина, Москва (1989). 400 с.
59. Japanese Pharmacopoeia. Fourteenth Edition. 2001.
60. European Pharmacopoeia. Fifth edition.
61. Дягтерев, Е.В. Анализ лекарственных средств в исследованиях,производстве и контроле качества / Е.В. Дягтерев // Российский ХимическийЖурнал. 2002. - Т. 46, - № 4. - С. 43-51.
62. Lawrence, J.E. Chemical Derivatization in Liquid Chromatography/ J.E. Lawrence, R.W. Fre. - Amsterdam: Elsevier, 1976. — 213 p.
63. Yeung, E.S. Detectors for liquid chromatography / E.S.Yeung. - New York Wiley, 1986.-366 p.
64. Scot, R.P.W. Chromatography Detectors / R.P.W. Scot. - New York: M Dekker Inc.,1997. - 536 p.
65. Gorog, S. The changing face of chemical derivatization in pharmaceutical and biomedical analysis / S. Gorog // Fresenius J. Anal. Chem. - 1998. - V.362. - P. 4-11.
66. Koupparis, M.A. Spectrophotometric determination of sulfonamides / M.A. Koupparis, P.I. Anagnostopoulou // Anal. Chim. Acta. - 1988. - V. 204.- P. 271-279.
67. Wilson, I.D. Handbook of analytical separations. Bioanalytical separations / I.D. Wilson, R.G Smith. - Amsterdam: Elsevier science, 2003. - 433 p.
68. Jain, A. Determination of ascorbic acid in soft drinks, preserved fluid juices and pharmaceuticals: matrix absorbance correction by treatment with sodium hydroxide / A. Jain, A. Chaurasia, K.K. Verma // Talanta, - 1995. - V. 42. - № 6. -P. 779-787.
69. Kazakevich, Y. HPLC for pharmaceutical scientists / Y. Kazakevich, R. Lobrutto. -New Jersey: John Wiley, 2007. — 1135 p.
70. Wellings, A.D. A practical hahdbook of preparative HPLC / A.D. Wellings. - Amsterdam: Elsevier science, 2006. - 193 p.

71. Ahuja, S. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. / S. Ahuja, M.W. Dong. - Amsterdam: Elsevier science, 2005. - 679 p.

72. Lunn, G. HPLC methods for recently approved pharmaceuticals / G. Lunn. - New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2005. - 717 p.

73. Lough, W.J. High Performance liquid chromatography. Fundamental principles and practice / W.J. Lough, J.W. Wainer. - London: Blackie academic and professional, 1996. - 282 p.

74. Сакодынский, К.И. Аналитическая хроматография / К.И.Сакодынский, В.В. Бражников, С.А. Волков, В.Ю. Зельвенский, Э.С. Ганкина, В.Д. Шатц. - М.: Химия, 1993.-464 с.

75. Рудаков, О.Б. Физико-химические системы сорбат-сорбент-элюент в жидкостной хроматографии / О.Б. Рудаков, В.Ф. Селеменов. - Воронеж, 2003. - 240 с.

76. Ahuja, S. Chromatographic solutions to pharmaceutical analytical problems. / S. Ahuja // Chromatographia. - 1992. - V. 34. - № 5(8). - P.411-416.

77. Рудаков, О.Б. Растворитель как средство управления процессом в жидкостной хроматографии. / О.Б. Рудаков. - Воронеж, 2003- 300 с.

78. Шатц, В.Л. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии / В.Л.Шатц, О.В. Сахартова. - Рига: Зинатне, 1988.-390 с.

79. Барам, Г.И., База Данных "ВЭЖХ/УФ - Фармакопея" / Г.И.Барам // Тезисы докл. Всероссийского симпозиума «Современные проблемы хроматографии». - М., 2002. — С. 19

80. Барам, Г.И. Перспективы применения баз данных для определения веществ методом ВЭЖХ./ Г.И.Барам, И.Н. Базарова.// Тезисы докл. VII конференции «Аналитика Сибири и дальнего востока - 2004». - Новосибирск, 2004.-С. 8.

81. Зенкевич, И.Г. Возможности количественного анализа в высокоэффективной жидкостной хроматографии без образцов сравнения определяемых соединений при использовании справочных УФ-

спектральных данных для расчета градуировочных коэффициентов / И.Г. Зенкевич, В.М. Косман // Журн. аналит. химии. - 2001. — Т.56. — № 3. - С. 298.

82. Зенкевич, И.Г. О роли информационного обеспечения в обращено - фазовой ВЭЖХ (на примере идентификации примесей в дигидрокверцетине). / И.Г. Зенкевич, В.М. Косман // Журн. аналит. химии. -2005. - Т.60. - №8. -С.837-841.

83. Siley, C. M. Pharmaceutical and Biomedical Applications of Liquid Chromatography / СМ. Siley, W.J. Lough, I.M. Wainer // Oxford: Pergamon Division of Elsevier, 1994. - 379 p.

84. Deyl, Z. Quality Control in Pharmaceutical Analysis - Separation Methods/ Z. Deyl // Amsterdam. Elsevier. -1997. - 241 p.

85. Ahuja, S. Trace and Ultratrace Analysis of HPLC / S. Ahuja. - New York: Wiley-Interscience, 1992. - 419 p.

86. Голубицкий, Г.Б. Количественный анализ таблеток «Пенталгин ICN» методами градиентной и изократической высокоэффективной жидкостной хроматографии / Г.Б. Голубицкий, Е.В. Будко, В.М. Иванов // Журн. аналит. химии. -2005. -Т.60. -№ 10. -С. 1080-1086.

87. Ларионова, С.Г. Оптимизация условий анализа таблеток сложного состава анальгезирующего и спазмолитического действия / С.Г.Ларионова, Н.Н. Дементьева, Е.Б. Нечаева, П.В. Назаренко, Г.А. Нестерова // Фармация. -2002. -Т.51. -С. 16.

88. Голубицкий, Г.Б. Количественный анализ таблеток «Пенталгин N» методами градиентной и изократической высокоэффективной жидкостной хроматографии / Г.Б. Голубицкий, Е.В. Будко, В.М. Иванов // Журн. аналит. химии. -2006. - Т.61. - № 1. - С. 74-79.

89. Голубицкий, Г.Б. Количественный анализ таблеток «Пенталгин» методами градиентной и изократической высокоэффективной жидкостной хроматографии / Г.Б. Голубицкий Е.В. Будко, В.М. Иванов Е.М. Басова // Журн. аналит. химии. - 2006. - Т. 61. - № 4. - С. 383-387.

90. Голубицкий, Г.Б. Удерживание анальгина и анестезина на сорбентах разной полярности. Анализ таблеток «Беллалгин» методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Г.Б. Голубицкий Е.В. Будко, В.М. Иванов Е.М. Костарной, Е.М. Басова // Журн. аналит. химии. - 2007. - Т. 62. - № 2. - С. 170-174.

91. Голубицкий, Г.Б. Хроматографическое разделение парацетамола, кофеина, аспирина на сорбенте с привитыми нитрильными группами и анализ таблеток «Аскофен П» / Г.Б. Голубицкий Е.В. Будко, В.М. Иванов Е.М. Костарной, Е.М. Басова // Журн. аналит. химии. - 2007. — Т. 62. — № 6. - С. 636-640.

92. Голубицкий, Г.Б. Анализ многокомпонентного препарата от простуды «Максиколд» методом ВЭЖХ с градиентом рН подвижной фазы / Г.Б. Голубицкий, Е.В. Будко, В.М. Иванов, Е.М. Басова // Журн. аналит. химии. - 2007. - Т. 62. - № 9. - С. 969-972.

93. Ларионова, С.Г. Оптимизация условий анализа таблеток сложного состава анальгезирующего и спазмолитического действия / С.Г. Ларионова, Н.Н. Дементьева, Е.Б. Нечаева, П.В. Назаренко, Г.А. Нестерова / Фармация. - 2002. - № 1. - С. 16-19.

94. Вергейчик, Т.Х. Высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе препаратов, содержащих пропифеназон / Т.Х. Вергейчик, Н.С. Онегова // Фармация. - 2002. - № 6. - С. 13-16.

95. Голубицкий, Г.Б. Анализ многокомпонентных лекарственных препаратов при помощи микроколоночных хроматографов серии "Милихром" / Г.Б. Голубицкий, В.М. Иванов // Вест. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. - 2008. - Т. 49. - № 4. - С. 246-250.

96. Лайпанов, А.Х. Хроматографическое разделение алкалоидов группы тролана / А.Х. Лайпанов, В.Э. Сланский // Хим. фарм. журнал. - 1991. - № 25. - С. 75.

97. Metwally, M. E—S. Chromatographic separation and analysis of chlorpheniramine maleate, methscopolamine nitrate and phenylephrine

hydrochloride in sustained release capsules/ M. E-S. Metwally / *Chromatographia*. - 1999.-V.50.-NO.1/2.-P. 113-117.

98. Беккер, Ю. Спектроскопия / Ю. Беккер. - М.: Техносфера, 2009. -528 с.

99. Esteve Romero, J.S. Spectrophotometric determination of arylamines and sulfonamides by diazotization and coupling in a micellar medium /J.S. Esteve Romero, G. Ramis Ramos, R. Coll Forteza, Martin Cerda / *Anal. Chim. Acta*. -1991.-V.242.-№1.-P. 143-146.

100. Martin, M.I.G. Batch and flow spectrophotometric determination of aztreonam / M.I.G. Martin, C.G. Perez, M.A.B Lopez // *Analyst*. - 1992. -V.117. - №11.-P. 1789-1792.

101. Кельнер, Р. Аналитическая химия. Проблемы и подходы / Р. Кельнер, Ж.М. Мерме, М. Отто, М. Видмер. - М.: Мир, 2004. - Т. 1, - 608 с.

102. Harvey, D. *Modern Analytical chemistry*/ D. Harvey // Boston: The McGraw-Hill Companies, Inc, 2000. - 816 p.

103. Khokhar, M.Y. Flow-injection studies of cyclodextrin-enhanced fluorescence in the aminoacid-thiol-o-phthalaldehyde reaction / M.Y. Khokhar, J.N. Miller // *Anal. Proc.* - 1993. - V. 30. - № 2. - P. 93-94.

104. Bermudes, B. Individual and simultaneous fluorimetric determination of glycine and cystein by flow injection analysis / B. Bermudes, F. Lazaro, L.C.M. Doboies [et al] // *Microchem. J.* - 1987. - V. 35. - № 3. - P. 315-323.

105. Izquierdo, A. Simultaneous fluorimetric methods for the determination of ammonia and urea by use of flow injection configurations with dual injection valves / A. Izquierdo, P. Linares, M.D. Luque de Castro [et al] // *Fresenius Z. Anal. Chem.* - 1990. - V. 336. - № 6. - P. 490-497.

106. Whiteside, I.R.C. Flow-injection determination of secondary amines in non-aqueous solution with fluorescence detection / I.R.C. Whiteside, P.J. Worsfold, E.H. Me Kerrell // *Anal. Chim. Acta*. - 1988. - V. 204. - P. 343-348.

107. Romero, A.M. On-line photochemical derivatization and flow-injection spectrophotometric determination of ergonovine maleate / A.M. Romero, G.G. Benito, J.M. Catalaynd // *Anal. Chim. Acta*. - 1993. - V. 282. - № 1. - P. 95-100.

108. Gomez Beninto, C. Spectrophluorimetric determination of emetine by flow

injection using barium peroxide and UV derivatization / C Gomez Beninto, S.T. Garcia, J. Martinez Calataynd // *Anal. Chim. Acta.* - 1993. - V. 279. - № 2. - P. 293-298.

109. Yoshimura, F. Марганец (3+)-тетраakis-(4-сульфонатофенил)-порфирина, иммобилизованный на анионообменной смоле в качестве индикаторной фазы для хемилюминесцентного детектирования адреналина /

F. Yoshimura, T. Suzuki, M. Yamada, T. Hobo // *Bunseki Kagaku.* - 1992. - V. 41. - №4.-P. 191-196.

110. Alwarthan, A.A. Determination of promethazine by its inhibition of the chemiluminescence of the luminol-hydrogen peroxide-chromium(III) system / A. A. Alwarthan, S.A. Al-Tamrah, A.A. Akel // *Anal. Chim. Acta.* - 1993. - V. 282. - №1.-P. 169-174.

111. Jiachu, Huang Flow injection chemiluminescence determination of isoniazid with electrogenerated hypochlorite / Huang Jiachu, Zhang Chengxiao, Zhang Zhujun // *Fresenius Z. Anal. Chem.* - 1999. - V. 363. - № 1. - P. 126-128.

112. Nagels, L. J. Rapid-scan hydrodynamic voltammetry and cyclic voltammetry of pharmaceuticals in flow-injection analysis conditions / L. J. Nagels, G. Mush, D. L. Massart // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* - 1989. - V. 7. - № 12. - P. 1479-1483.

113. Apostolak's, J.C. Use of ion-selective electrodes in kinetic flow- injection determination of phenolic and hydrazino drugs with 1-fluoro-2,4- dinitrobenzene using a fluoride-selective electrodes / J.C. Apostolak's, C A. Georgiou, M.A. Koupparis // *Analyst.* - 1991. - V. 116. - № 3. - P. 233-237.

114. Будников. Г.К. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине / Г.К. Будников, Г.А.Евтюгин, В.Н. Майстренко. - М.: БИНОМ Лаборатория знаний, 2009. - 416 с.

115. Гурьев, И.А. Проточно-инжекционное определение некоторых азотсодержащих лекарственных препаратов / И.А. Гурьев, Л.Ф. Зюзина, А.А.Шабарин // *Журн. аналит. химии.* - 1998. - Т. 53. - № 10. - С. 1098-1102.

116. Lima Jose, L.F. Solid-state PVC flow-through benzoate electrode / L.F.

Lima Jose, M. Conceicao, B.S. Montenegro, J. Alonso, J. Bartroli, J.G. Raurich // J. Pharm. and Biomed. Anal. - 1989. - V. 7. - № 12. - P. 1490-1505.

117. Palsson Bernhard, O. Simultaneous determination of ammonia nitrogen and L-glutamine in bioreactor media using flow injection analysis / O. Palsson Bernhard, Q. Shen Bing, Mark E. Meyerhoff, Trojano wicz Marek // Analyst. -1993.-V. 118.-№ п.-р.1361-1365.

118. Cios, J.F. Enhanced stability of electrochemical detection with surfactant containing mobile phases in liquid chromatography / J.F. Cios, J.G. Dorsey // Anal. Lett. - 1990. - V. 23. - № 12. - P. 2327-2331.

119. Дакашев, А. Определение анальгина при помощи проточно-инжекционного метода с кулонометрическим детектированием / А. Дакашев, Л. Илчева, П. Джамбазова // Изв. хим. Болг. АН. - 1991. - Т. 24. - № 1. - С. 118-123.

120. Sacai, T. Analysis of cationic disinfectants in pharmaceutical using ion associates formed between sulphonophthalein dyes and quinidine / T. Sacai, N. Ohta, H. Sasaki // Fresenius J.Anal.Chem. - 1994. - V. 349. - № 6. - P. 475-476.

121. Liu, Gaoyuan Quantification and enantiomeric purity of pharmaceuticals in dosage form / Gaoyuan Liu, David M. Goodall, John S. Loran // Anal. Proc. - 1992. - V. 29. - № 6. - P. 255-257.

122. Burns, D. Thorburn Extraction spectrophotometric determination of salbutamol by oxidative coupling with 4-amino-N,N-dimethylaniline / D. Thorburn Burns, N. Chimpalu, K. Leiwongcharoen // Anal. chim. Acta. - 1992. - V. 260. - № 1.- P. 65-68.

123. Burns, D. Thorburn Extraction spectrophotometric determination of bismuth as tetraiodobismuthate (III) with the tetramethylenbis (triphenylphosphonium) cation / D. Thorburn Burns, N. Chimpalee, M. Harriot // Anal. chim. Acta. - 1989. - V. 225. - № 2. - P. 449-453.

124. Sacai, J. Analysis for selective spectrophotometric determination of cetylpyridinium chloride in pharmaceuticals utilizing thermochromism of ion associates / J. Sacai, N. Ohno // Anal. Sci. - 1991. - V. 7. - № 6. - P. 297-300.

125. Karlberg, B. Determination of codeine with extraction procedure / B.

Karlberg, S. Thelander // Anal. chim. Acta. - 1978. - V. 98. - № 1. - P. 1-8.

126. Sahlestrom, Y. Determination of codeine of pharmaceutical preparations with liquid extraction / Y. Sahlestrom, B. Karlberg // Anal. chim. Acta. - 1986. - V. 179. -№ 1-2. -P. 315-321.

127. Gallego, M. Analysis codeine in pharmaceutical samples / M. Gallego, M. Silva, M. Valcarcel // Fresenius Z. Anal. chem. - 1986. - V. 323. - № 1. - P. 50-56.

128. Cooper J.C. Enhanced selectivity in flow injection analysis for L-amino acids using electro dialysis with amino acids oxidation / J.C. Cooper, J. Danzer, H.-L. Schmidt // Anal. chim. Acta. - 1993. - V. 282. - № 2. - P. 369-374.

129. Good Laboratory Practices in Governmental Drug Control Laboratories. WHO Technical Report Series 748, Geneva, 1987.

130. Guide 25. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. Third edition. ISO/IEC, 1990

131. Guide to Inspections of Pharmaceutical Quality Control Laboratories. US FDA, 1993.

132. Good Laboratory Practice and Current Good Manufacturing Practice. A Primer. Ludwig Huber. Hewlett Packard, 1994.

133. Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products (GMP), WHO Technical Report Series, №823, 1992, Geneva, Annex 1. P. 77-79.

134. Internationally Harmonised Guide for Active Pharmaceutical Ingredients, Good Manufacturing Practice (API Guide). Draft, September 1997, Pharmaceutical Inspection Convention and Co-operation Scheme (PIC-PIC/S).

135. European Department for the Quality of Medicines. Quality assurance manual. Version 2.1. May 1998.

136. Guide to Drug Directorate Laboratory Activities Quality Assurance Program. Canada, 1991.

137. Гармонов, СЮ. Проблемы перекрестного загрязнения в химико-фармацевтическом производстве: стандартизация и унификация требований / СЮ. Гармонов, Г.Р. Нурисламова, Р.Р. Фатхуллин, СМ. Горюнова // Вестник Казанского технологического университета. - 2006. - №6. - С. 294-305.

138. Патент 2032678 РФ, Бюл. изобрет., № 10 (1995).

139. Гордон, А. Спутник химика / А. Гордон, Р. Форд. -М.: Мир, 1976,-544 с.
140. Вайсбергер, А.В. Органические растворители / А.В. Вайсбергер, Э. Проскауэр, Дж. Риддик, Э. Тупс. -М.: ИЛ, 1958. - 519 с.
141. Дерффель, К. Статистика в аналитической химии / К Дерффель. - М.:Мир, 1994.-268 с.
142. ICH Topic Q2(R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. / London. European Medicines Agency. - 1995. — 15 p.
143. Гармонов, СЮ. Аналитические методы в биофармацевтических исследованиях и контроле перекрестного загрязнения химико-фармацевтических производств / СЮ. Гармонов, Г.Р. Нурисламова, А.В. Яковлева, И.А. Салахов, Н.С Шитова // Тезисы докл. XVIII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. - М., 2007. - Т.4. - С. 115.
144. Будников. Г.К. Проблемы обеспечения экологической чистоты химико-фармацевтического производства / Будников. Г.К. // Сборник научных статей «Регионы России: власть и общество в условиях социальных рисков. Проблемы безопасности». - Казань: КГТУ, 2008. - Ч. 1. -С. 406-410.
145. Салахов, И.А.Обеспечение безопасности лекарственных средств путем предотвращения их перекрестного загрязнения / Салахов, И.А., СЮ. Гармонов // Тезисы докладов XV Рос. нац. конгресса "Человек и лекарство", - М., 2008. - С 532-533.
146. Салахов, И.А. Аналитические методы в контроле перекрестного загрязнения лекарственных средств / Салахов, И.А., СЮ. Гармонов // Тезисы докл. Всероссийской конференции «Химический анализ». -М.,2008. -С. 120-121.
147. Будников. Г.К. Методы аналитического контроля перекрестного загрязнения лекарственных препаратов / Будников. Г.К.// Материалы II Международного форума «Аналитика и аналитики». - Воронеж, 2008. - Т. 2. - С. 527.
148. Безопасность производства лекарственных препаратов[Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.fda.gov>.
149. Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную

хроматографию. // под ред. Д. Исии. - М.: Мир, 1991. - 240 с.

150. Baram, G.I. Portable liquid chromatograph for mobile laboratories. I. Aims. / G.I. Baram // J. Chromatogr. A. - 1996. - V. 728. - P. 387-399.

151. Vissers J.P.C Recent developments in microcolumn liquid chromatography. / J.P.C Vissers // J. Chromatogr. A. - 1999. - V. 856. - P. 117—143.

152. Гармонов, СЮ. Фармацевтический анализ противовоспалительных и анальгезирующих лекарственных средств методом ВЭЖХ / С. Ю.Гармонов, И.А.Салахов, Г.Р.Нурисламова, Р.Н.Исмаилова, Э.А.Иртуганова // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия «Естественные науки». - Казань: Изд-во Каз. гос. ун-та, 2010. - Т. 152. Кн. 3. С. 106-113.

153. Гармонов, СЮ. Фармацевтический анализ лекарственных средств, влияющих на обменные процессы при использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии / СЮ. Гармонов, И. А. Салахов, Г.Р. Нурисламова, Р.Н. Исмаилова, Э.А. Иртуганова, В.Ф. Сопин // Вестник Казанского технологического университета. - 2010. - № 10. — С. 30-36.

154. Гармонов, СЮ. Фармацевтический анализ 4-аминофенола в парацетамоле при использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии / СЮ. Гармонов, И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова, Р.Н.Исмаилова, В.Ф. Сопин // Вестник Казанского технологического университета. - 2010. - № 10. - С 46-51.

155. Гармонов, СЮ. Определение примеси 4-аминофенола в лекарственных средствах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / СЮ. Гармонов, И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова, Р.Н. Исмаилова, В.Ф. Сопин // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». - 2010. - № 4. - С. 131-134.

156. Салахов, И.А. Контроль качества лекарственных средств: расширение возможностей при использовании градиентной ВЭЖХ / И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова, СЮ. Гармонов // Тезисы докл. Всероссийской конференции «Теория и практика хроматографии. Хроматография и нанотехнологии». — Самара, 2009. - С. 190.

157. Гармонов, СЮ. Оптимизация контроля лекарственных средств и

химико-фармацевтического производства при использовании ВЭЖХ / СЮ. Гармонов, И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова // Тезисы докл. 1 Всероссийской конференции "Современные методы химико-аналитического контроля фармацевтической продукции". - Москва, 2009. - С. 54-55.

158. Гармонов, СЮ. Возможности фармацевтического анализа при использовании градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии / СЮ. Гармонов, И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова, Л.М. Юсупова // Тез. докл III Всероссийской конференции с межд. участием "Аналитика России" -Краснодар, 2009. - С 62

159. Гармонов, СЮ. Определение витаминов в лекарственных средствах и биологически активных добавках методом ВЭЖХ / СЮ.Гармонов, И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова // Тезисы докл. 65-ой Всероссийской конференции по фармации и фармакологии. - Пятигорск, 2010.-С. 78.

160. Салахов, И.А. Унифицированные подходы к контролю качества лекарственных средств методом ВЭЖХ / И.А. Салахов, Г.Р. Нурисламова, Нгуен Зунг Чунг, И.Ф. Мингазетдинов, Э.А. Иртуганова, СЮ. Гармонов //Материалы Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» - Краснодар, 2010. - С. 159.

161. Максютин, Н.П. Методы анализа лекарств / Н.П. Максютин, Ф.Е.Каган, Л.А. Кириченко. - К.: Здоровье, 1984. -224 с.

162. Руководство к лабораторным занятиям по фармацевтической химии / под ред. А.П. Арзамасцева. - М.: Медицина, 1995. — 320 с.

163. Коренман, И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений / И.М. Коренман. - М.: Химия, 1970. - 343 с.

164. Полюдек-Фабини, Р. Органический анализ / Р. Полюдек-Фабини, Т.Бейрих. - Л.: Химия, 1981.-624 с.

165. Хмельницкий, Л.И. Химия фуроксанов (строение синтез)./ Л.И.Хмельницкий, СС. Новиков, Т.И. Годовикова. - М.: Наука, 1981. -328 с.

166. Watanabe, J. Liquid chromatographic determination of amino and imino acids and thiols by postcolumn derivatization with 4-fluoro-7-nitrobenzodiazole / J. Watanabe, K. Imai // Anal. chem. - 1983. - V.55, - N. 11. - P. 1789-1791.

167. Евгенийев, М.И. Определения аминсоединений: реакции дериватизации хлординитрозамещенными бензофуразапа и их N-оксидами: дис. соис. уч. степени докт. хим. наук / М.И. Евгенийев. - М.: МГУ, 1997. - 247с.

168. Гармонов СЮ. Применение хлординитрозамещенных бенз-2,1,3-оксадиазола в проточном анализе аминсоединений: дисс. на соиск. уч. степени кан. хим. наук / СЮ. Гармонов. - Казань: КГУ, 1995.- 162 с.

168. Евгенийев, М.И. Селективное спектрофотометрическое определение аминов различной степени замещения в смесях / М.И. Евгенийев, И.И. Евгенийева, Н.А. Москва, Н.Г. Николаева, И.А. Желтухин, Г.К. Будников // Ж.аналит.химии.- 1993.-Т.48, - № 7. - С. 1226-1234.

170. Евгенийев, М.И. Проточно-инжекционное определение лекарственных веществ, содержащих первичные аминные функциональные группы / М.И. Евгенийев, СЮ. Гармонов, Л.Ш. Шакирова, Е.В. Дегтерев // Хим.-фарм. журн. - 2002. - Т. 36. - № 10. - С. 34-39.

171. Машковский, М.Д. Лекарственные средства. Ч.1, Ч.П./ М.Д. Машковский. - М.: Медицина, 1993. - 686 с.

172. Мельникова Н.Б. Контроль качества лекарственных средств, изготовляемых в аптеках. Рефрактометрия в анализе лекарственных средств аптечного изготовления. Нижний Новгород: НГМА, 2008. — 19 с.

173. Иоффе, Б. В. Рефрактометрические методы химии, 2 изд./ Б. В. Иоффе.-Л., 1974.-400 с.