

### МЕТОДИКИ ОЦІНЮВАННЯ КРИТИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ЯКОСТІ У ФАРМАЦЕВТИЧНІЙ РОЗРОБЦІ СУБСТАНЦІЇ ЛІЗИНІЙ-3-МЕТИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛІЛ-5-ТІОАЦЕТАТУ ТА 2,5 % РОЗЧИНУ ЛІЗИНІЮ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЙ

**Ключові слова:** критичні показники якості, фармацевтична розробка, високоефективна рідина хроматографія, валідація, лізиній-3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат (лізиній)

Оригінальні вітчизняні лікарські субстанції на основі похідних 1,2,4-тріазолу, створені колективом авторів під керівництвом професора І.А.Мазура, знайшли широке застосування при лікуванні інфаркта міокарда, аритмій, серцевої недостатності [1, 2], як гепатопротекторні засоби [2], як в однокомпонентних, так і в комбінованих препаратах, що випускають у вигляді таблеток, мазей, супозиторіїв, очних крапель та розчинах для ін'єкцій [3–8].

Продовженням досліджень зі створення нових субстанцій – похідних 1,2,4-тріазолу стало створення D,L-лізинію-3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетату під умовною назвою лізиній, що виявляє широкий спектр біологічної активності та застосовується для лікування хвороб ЦНС, зокрема гострих порушень мозкового кровообігу [9, 10].

Якість лікарської речовини згідно з вимогами, викладеним у загальних статтях ДФУ, Настанові з якості [11–13], Настанові зі специфікацій і критеріїв прийнятності [12–14], включає вірогідність, чистоту, кількісний вміст, визначення спрямованої дії речовини та її лікарської форми. При цьому вибір лікарської форми та її склад мають відповідати призначенню препарату, а вибрані показники якості зумовлювати стратегію контролю якості згідно з критичними параметрами якості. Критичні показники якості визначають якість лікарського засобу, вихід за межі яких призводить до невідповідності якості продукції. Згідно з ДФУ монографія на субстанцію повинна мати профіль технологічних домішок та їх кількісний вміст.

Визначення критичних показників (кількісне визначення біологічно активної речовини; вміст технологічних домішок, включаючи продукти синтезу, залишкові кількості органічних розчинників) базується на дослідженнях із застосуванням фізико-хімічних методів для визначення стабільності сполуки у «стресових» умовах. Останні дають змогу отримати дані про стабільність молекули у широкому діапазоні дії температури, рН середовища, УФ-опромінення, викладені у Додатку 2 до Настанови ІСН Q8 [15, 16].

Вирішенню питання розробки методу, що дає можливість надати межі критичних характеристик субстанції лізинію, які визначають наявність технологічних домішок при синтезі, стабільність молекули у «стресових» умовах, а також створення ін'єкційної лікарської форми на основі лізинію присвячена дана стаття.

#### Експериментальна частина

##### Об'єкти дослідження:

лізиній-3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат – лізиній;

3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтова кислота;

3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіон;

2,5 % розчин лізинію для ін'єкцій.

**Прилад.** Agilent 1100 Series LC MSD SL з УФ-детектором diode-array detector ELSD (Evaporated Liquid Scattering Detector).

**Методика визначення домішок у субстанції лізинію методом ВЕРХ**

Приготування випробовуваного розчину. Близько 0,125 г препарату поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють у суміші ацетонітрил – вода (1:1), доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують. Розчин використовують свіжоприготованим.

Розчин порівняння 1. 0,1 мл випробовуваного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину сумішшю ацетонітрил–вода (1:1) до позначки та перемішують (еквівалент домішки 0,1 %).

Розчин порівняння 2. Близько 0,0625 г 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють у суміші ацетонітрил–вода (3:1), доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують. 1,0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину сумішшю ацетонітрил–вода (1:1) до позначки та перемішують (0,5 % домішки 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону).

Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи. Близько 0,01 г 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону та близько 0,10 г 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють за допомогою ультразвука у суміші ацетонітрил–вода (3:1), доводять об'єм розчину рухомою фазою до позначки та перемішують.

Приготування буферного розчину. У мірну колбу місткістю 1000 мл поміщають 0,01 г натрію октансульфонату, розчиняють у 800 мл води, доводять об'єм розчину водою до позначки та перемішують. Доводять рН одержаного розчину фосфорною кислотою концентрованою до 2,2 (потенціометрично, ДФУ 2.2.3).

По 10 мкл випробовуваного розчину, розчину порівняння 1, розчину порівняння 2, суміші ацетонітрил–вода (1:1) і розчину для перевірки придатності хроматографічної системи хроматографують на рідинному хроматографі за таких умов:

- колонка «Resolv C18», розміром 300 x 4,6 мм, заповнена сорбентом із розміром частинок 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються вимоги випробування «Перевірка придатності хроматографічної системи»;
- рухома фаза: ацетонітрил – буферний розчин (20:980), дегазована будь-яким зручним способом;
- швидкість рухомої фази; 1,0 мл/хв;
- температура колонки; 30 °С;
- детектування; за довжини хвилі 220 нм.

Час хроматографування у 4 рази має перевищувати час утримування основного піка лізинію.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо коефіцієнт ємності ( $k'$ ) 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону становить не менше ніж 1,2 і розрізнення ( $R_s$ ) між піками 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону та 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти становить не менше ніж 3.

На хроматограмі випробовуваного розчину площа піка 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону не має перевищувати площу піка 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону на хроматограмі розчину порівняння 2 (не більше ніж 0,5 %).

На хроматограмі випробовуваного розчину сума площ додаткових піків, крім піка 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону та піків, час утримування яких збігаються із часом утримування піків на хроматограмі суміші ацетонітрил–вода (1:1), не має перевищувати площу піка 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти на хроматограмі розчину порівняння 1 (не більше ніж 0,1 %).

Сумарний вміст домішок не має перевищувати 0,5 %.

## Валідація методики

Згідно з Настановою ІСН із валідації методик ВЕРХ [International Conference of Harmonization, Validation of Analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). [www.ich.org](http://www.ich.org)] при визначенні вмісту сторонніх домішок необхідно визначати такі валідаційні характеристики: специфічність, межа виявлення.

### СПЕЦИФІЧНІСТЬ

#### Критерії прийнятності

На хроматограмах розчину субстанції після кислотного гідролізу, після лужного гідролізу, нагрівання, обробки водню пероксидом і опромінювання жорстким УФ-випромінюванням піки речовин, що утворилися, мають добре розділятися із піком лізинію.

#### Результати досліджень

Специфічність випробування підтверджується тим, що на хроматограмах розчину субстанції після кислотного гідролізу, після лужного гідролізу та дії УФ-випромінювання, час утримування піків речовин, що утворилися, відмінні від часу утримування піка лізинію (рис. 5–10).

Специфічність методики визначали при хроматографуванні у нижченаведених умовах таких розчинів: 1) розчину субстанції із відомою концентрацією; 2) розчину субстанції, що заздалегідь піддавали кислотному і/або лужному гідролізу; 3) розчину субстанції, що заздалегідь піддавали розкладанню під дією УФ-світла; 4) розчину субстанції, що заздалегідь піддавали розкладанню під дією сильних окиснювачів; 5) розчину субстанції, що заздалегідь піддавали розкладанню під дією високих температур.

Кислотний гідроліз субстанції лізинію проводили у суміші (10 мл) ацетонітрил–вода (1:1), до якої було додано 1 мл хлористоводневої кислоти розведеної. Розчин витримували при температурі близько 70 °С протягом 3 год, переносили у мірну колбу місткістю 10 мл, доводили об'єм розчину сумішшю ацетонітрил–вода (1:1) до позначки, перемішували та хроматографували.

Лужний гідроліз субстанції лізинію проводили у суміші (10 мл) ацетонітрил–вода (1:1), до якої було додано 0,5 мл 10 % розчину натрію гідроксиду. Розчин витримували при температурі близько 70 °С протягом 3 год, переносили у мірну колбу місткістю 10 мл, доводили об'єм розчину сумішшю ацетонітрил–вода (1:1) до позначки, перемішували та хроматографували.

Окиснювальне розкладання субстанції лізинію проводили у суміші (10 мл) ацетонітрил–вода (1:1), до якої було додано 2 мл 30 % розчину водню пероксиду. Розчин витримували при температурі близько 70 °С протягом 3 год, переносили у мірну колбу місткістю 10 мл, доводили об'єм розчину сумішшю ацетонітрил–вода (1:1) до позначки, перемішували та хроматографували.

УФ-розкладання субстанції лізинію проводили у суміші (10 мл) ацетонітрил–вода (1:1) у кварцевій чашці при опромінюванні УФ-світлом ртутної лампи протягом 2 год. Після опромінювання розчин переносили у мірну колбу місткістю 10 мл, доводили об'єм розчину сумішшю ацетонітрил–вода (1:1) до позначки, перемішували та хроматографували.

Розкладання субстанції лізинію під дією високих температур проводили таким чином: 10 мл випробовуваного розчину субстанції у суміші ацетонітрил–вода (1:1) поміщали у пеніциліновий флакон, що потім герметично укупували. Флакон поміщали у сушильну шафу при температурі 100 °С і витримували за цієї температури протягом 3 год. Після охолодження розчин переносили у мірну колбу місткістю 10 мл, доводили об'єм розчину сумішшю ацетонітрил–вода (1:1) до позначки, перемішували та хроматографували.

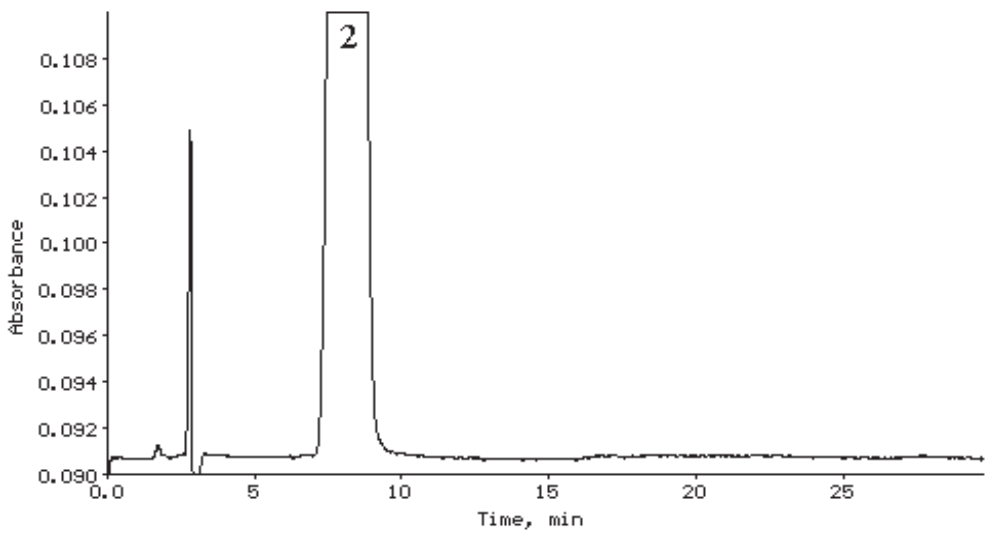


Рис. 1. Хроматограма випробовуваного розчину субстанції:  
**2** – 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтова кислота

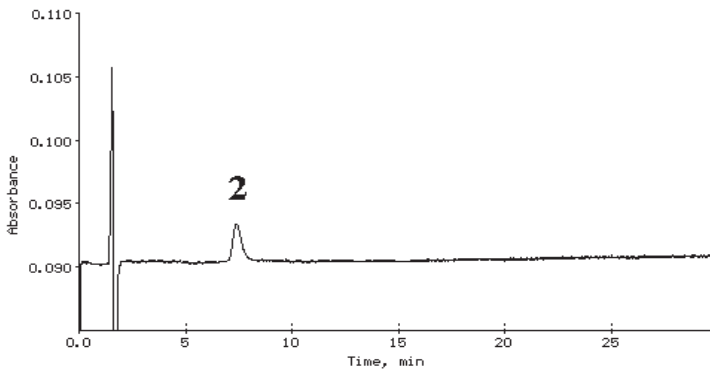


Рис. 2. Хроматограма розчину порівняння 1 (еквівалент 0,1 % невідомої домішки):  
**2** – 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтова кислота (час утримування – близько 7 хв,  $k' = 3,4$ )

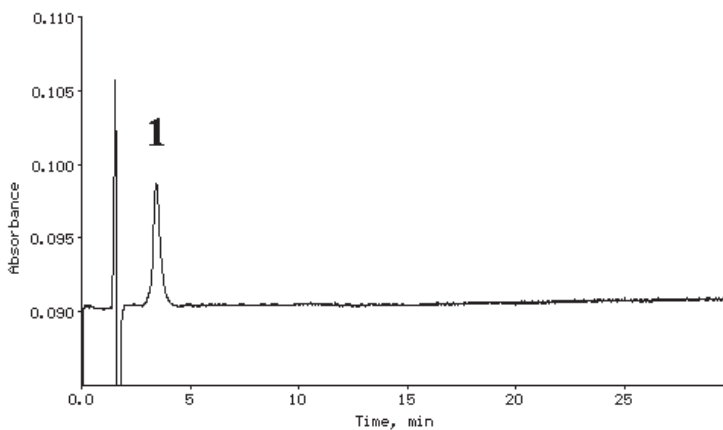


Рис. 3. Хроматограма розчину порівняння 2 (0,5 % домішки 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону): **1** – 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіон (час утримування – близько 3,8 хв,  $k' = 1,4$ )

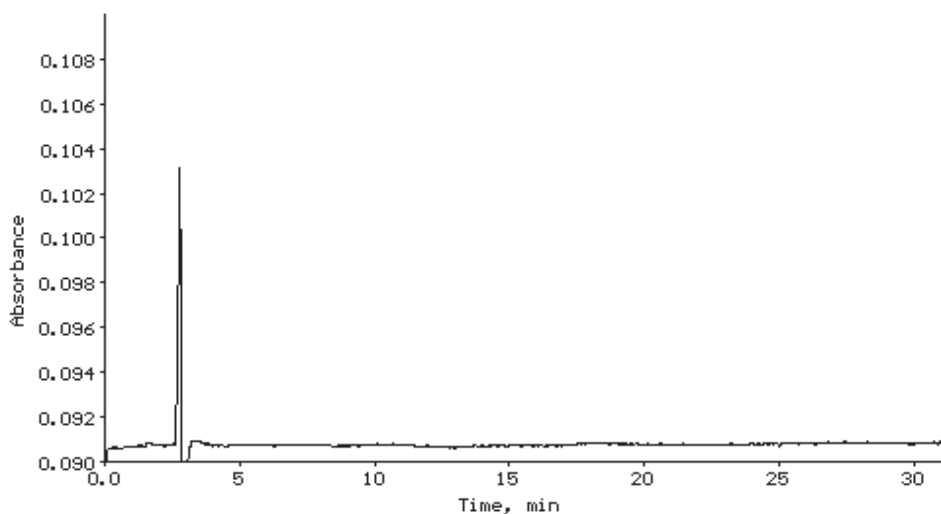


Рис. 4. Хроматограма суміші ацетонітрил – вода (1:1)

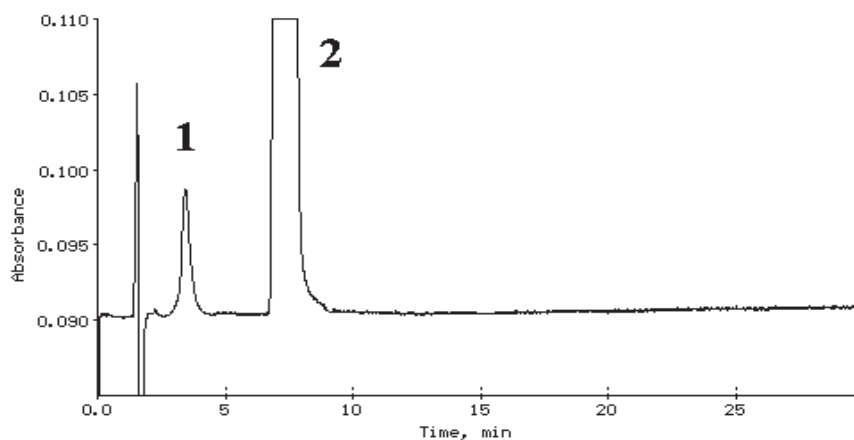


Рис. 5. Хроматограма розчину для перевірки придатності хроматографічної системи: 1 – 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіон; 2 – 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтова кислота ( $R_s=5$ )

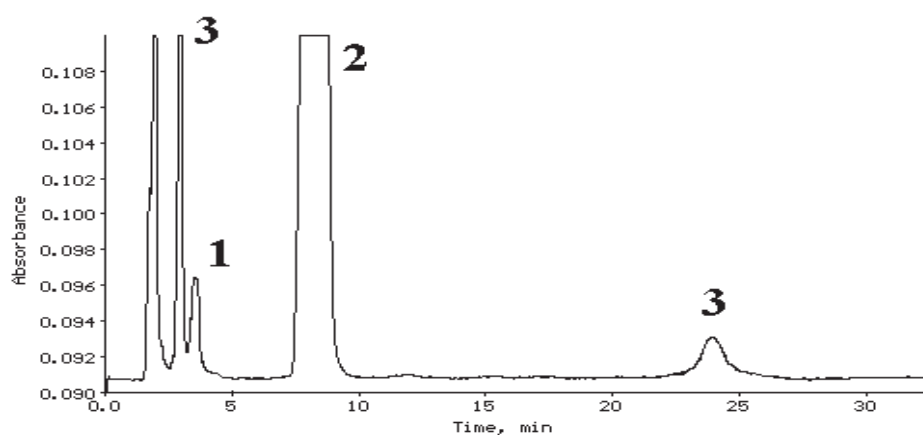


Рис. 6. Хроматограма випробовуваного розчину субстанції після опромінювання УФ-світлом: 1 – 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіон; 2 – 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтова кислота; 3 – продукти розкладання

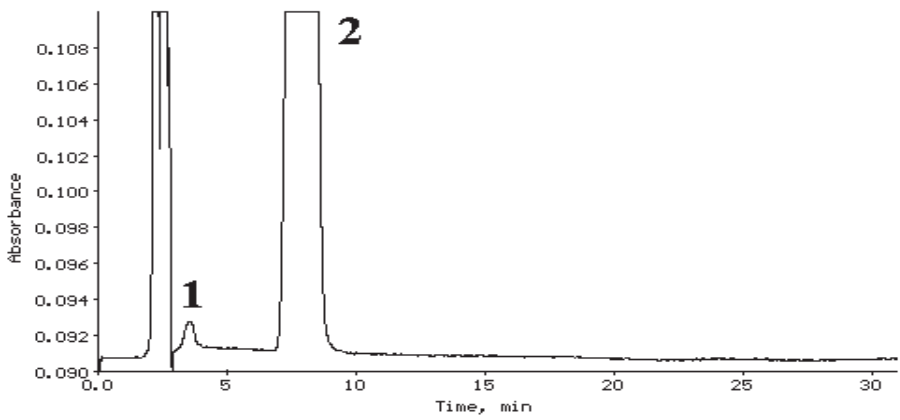


Рис. 7. Хромотаграма випробовуваного розчину субстанції після кислотного гідролізу: **1** – 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіон; **2**– 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтова кислота

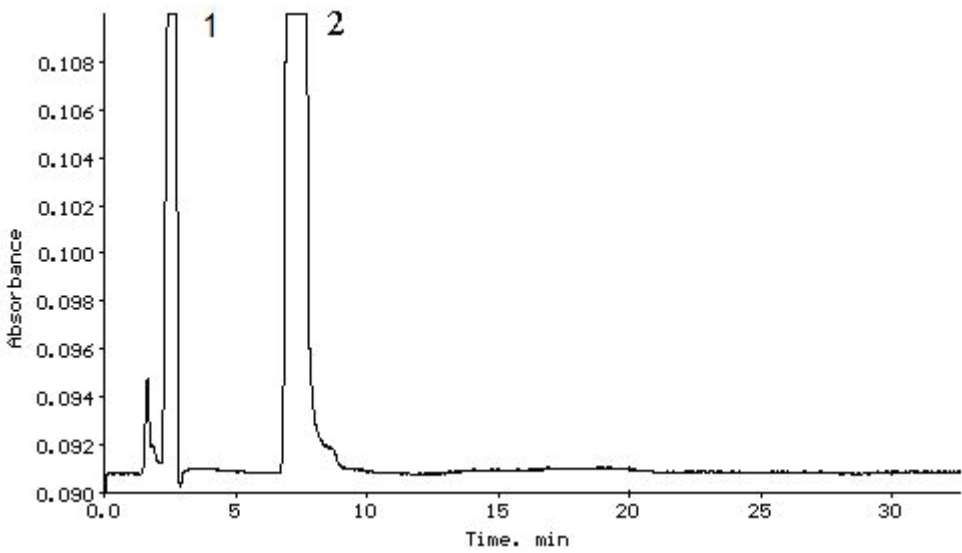


Рис. 8. Хромотаграма випробовуваного розчину субстанції після лужного гідролізу. **1** – 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіон; **2** – 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтова кислота

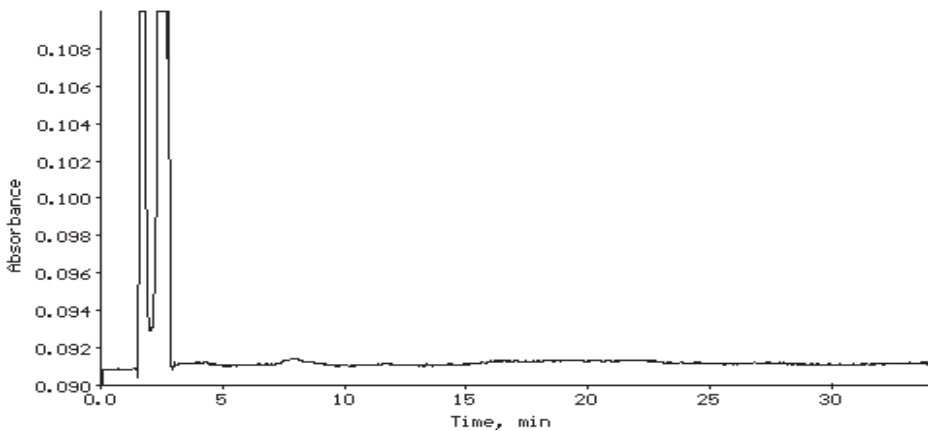


Рис. 9. Хромотаграма випробовуваного розчину субстанції після обробки водню пероксидом (препарат практично повністю розклався)

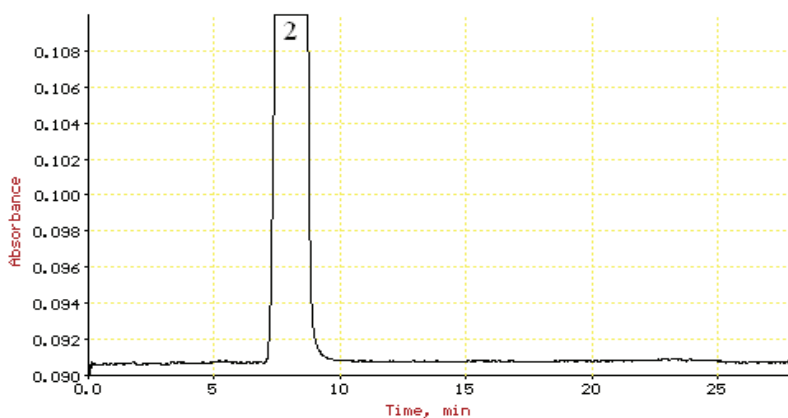


Рис. 10. Хроматограма випробовуваного розчину субстанції після термічної обробки

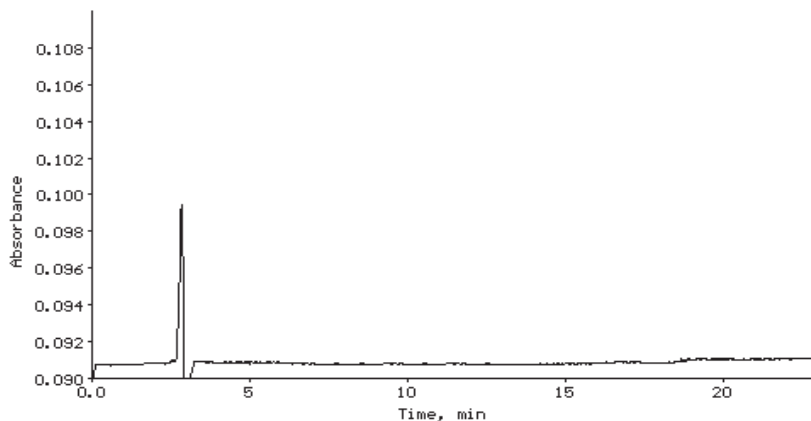


Рис. 11. Хроматограма розчину «плацебо» (для розчину для ін'єкцій)

Як випливає із одержаних хроматограм, лізиній достатньо сильно розкладається, особливо за окиснювальних способів розкладання (УФ-опромінювання та водню пероксид).

У нейтральних і слабокислих (до рН 4) водних розчинах субстанція стійка. У сильноокислих розчинах (рН 1 і менше) субстанція дещо розкладається з утворенням 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону (рис. 7).

#### Висновок

Методика визначення вмісту домішок у субстанції методом ВЕРХ є специфічною. Валідаційна характеристика «специфічність» відповідає встановленим критеріям прийнятності.

#### Межа виявлення

Оцінюється вміст домішок шляхом порівняння площ додаткових піків і площ піків лізинію 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтова кислота і 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіону на хроматограмах розчинів порівняння. Відповідно межа виявлення (МВ) розраховується для лізинію 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтова кислота, оскільки за лізинієм оцінюють неідентифіковані домішки.

Критерії прийнятності: вимоги до значення МВ визначаються рівнянням:

$$MB \leq \max MB = 0,32 \cdot ImL.$$

Мінімальна верхня межа вмісту будь-якої індивідуальної домішки (ImL) становить 0,1 %. Тобто, МВ має бути менше за  $0,32 \cdot 0,1 \% = 0,032 \%$ .

Для визначення МВ було використано підхід, заснований на співвідношенні сигнал/шум (S/N). При цьому за МВ може бути прийнята концентрація 3-метил-1,2,4-

тріазоліл-5-тіоцтової кислоти, відповідна амплітуді (висоті) піка, що у три рази перевищує амплітуду (висоту) шуму на хроматограмах:

$$MB = S \geq 3xN.$$

### Оцінка методики

На рис. 12 представлено хроматограму розчину порівняння лізинію у масштабі, що дає змогу оцінити рівень шуму.

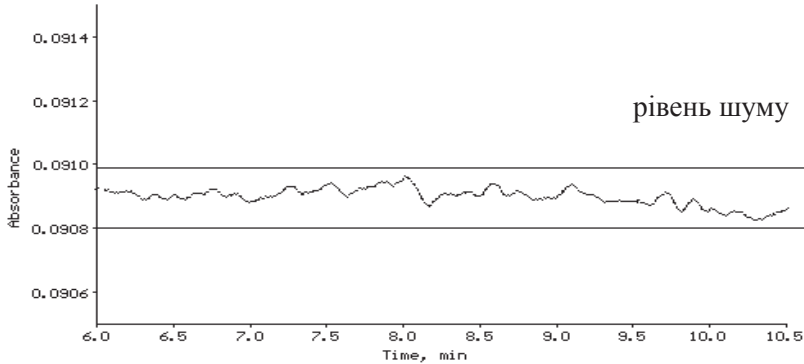


Рис. 12. Хроматограма розчину порівняння у масштабі, що показує рівень шуму

Величина аналітичного сигналу – висота піка на хроматограмі розчину порівняння 1 (рис. 2) – дорівнює 0,004 і відповідає 0,1 % домішки.

В умовах проведення випробування максимальна амплітуда шумових хвиль дорівнювала 0,0002 (рис. 12). Отримуємо:  $S = 0,0002 \cdot 3 = 0,0006$ , що відповідає близько 0,015 %.

Таким чином, МВ для домішок становить близько 0,015 % від номінального вмісту лізинію у субстанції. Виходячи з рівняння:

$$0,015 \% < \max MB = 0,32 \cdot ImL = 0,32 \cdot 0,1 \% = 0,032 \%,$$

можна зробити висновок про коректність методики ВЕРХ-визначення граничного вмісту домішок, оскільки така валідаційна характеристика як межа виявлення відповідає встановленому критерію прийнятності.

### В и с н о в о к

Методика визначення вмісту домішок у субстанції методом ВЕРХ є коректною, оскільки валідаційна характеристика «межа виявлення» відповідає встановленому критерію прийнятності.

Нижче наведено хроматограми субстанції (рис. 13) і двох серій розчину лізинію для ін'єкцій, одержані при дослідженні їх чистоти (рис. 14, 15).

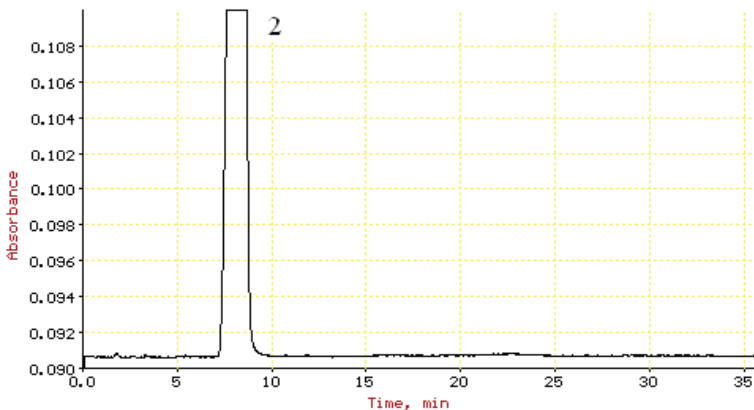


Рис. 13. Хроматограма субстанції:

2 – лізиній



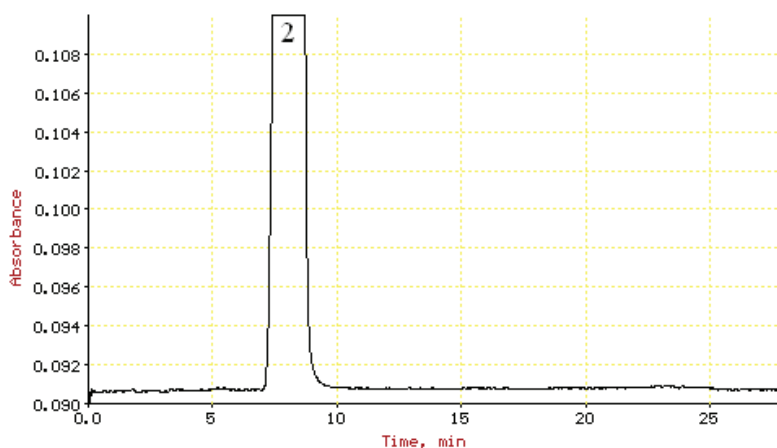


Рис. 14. Хроматограма 2,5 % розчину лізинію для ін'єкцій (стерилізація при температурі 120 °С протягом 15 хв)

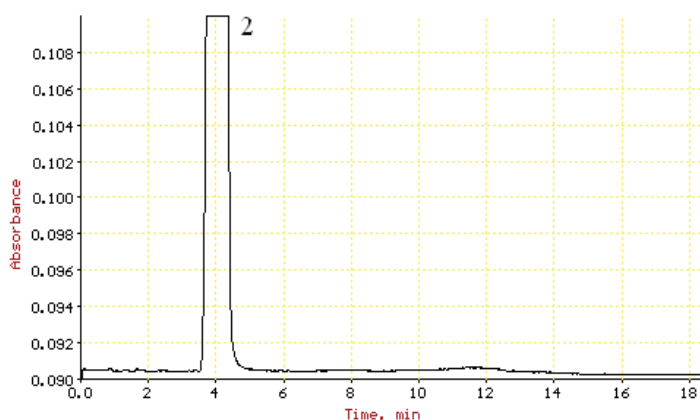


Рис. 15. Хроматограма 2,5 % розчину лізинію для ін'єкцій (стерильна фільтрація)

#### В и с н о в о к

Як впливає з представлених хроматограм, субстанція і 2,5 % розчини лізинію для ін'єкцій (стерильна фільтрація та стерилізація при температурі 120 °С протягом 15 хв) не містять додаткових домішок.

#### ***Методика кількісного визначення вмісту лізинію у 2,5% розчині для ін'єкцій***

Приготування випробовуваного розчину. 2.0 мл розчину препарату поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, доводять об'єм розчину рухомою фазою до позначки та перемішують.

Розчин СЗ 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти. Близько 0,250 г СЗ 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, додають 2 мл аміаку розчину розведеного, перемішують до розчинення, доводять об'єм розчину водою до позначки та знову перемішують. 5,0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, доводять об'єм розчину рухомою фазою до позначки та перемішують.

Приготування буферного розчину. У мірну колбу місткістю 1000 мл поміщають 0,01 г натрію октансульфонату, розчиняють у 800 мл води, доводять

об'єм розчину водою до позначки та перемішують. Доводять рН одержаного розчину фосфорною кислотою концентрованою до 2,2 (потенціометрично, ГФУ 2.2.3).

По 10 мкл випробовуваного розчину та розчину СЗ 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти хроматографують на рідинному хроматографі за таких умов:

– колонка «Resolv C18», розміром 300 x 4,6 мм, заповнена сорбентом із розміром частинок 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються вимоги випробування «Перевірка придатності хроматографічної системи»;

– рухома фаза: ацетонітрил – буферний розчин (20:980), дегазована будь-яким зручним способом;

– швидкість рухомої фази 1,0 мл/хв;

– температура колонки 30 °С;

– детектування за довжини хвилі 254 нм.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо:

1) ефективність хроматографічної системи, розрахована за піком 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти становить не менше ніж 2000 теоретичних тарілок (ГФУ 2.2.46);

2) відносне стандартне відхилення, розраховане для площ піків 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти, має бути: 0,51 % – для 2 паралельних визначень, 1,34 % – для 3 паралельних визначень, 1,92 % – для 4 паралельних визначень;

3) коефіцієнт симетрії піка 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти має становити не більше ніж 1,7.

Вміст лізинію у препараті (у міліграмах на мілілітр) обчислюють за формулою:

$$\frac{S \times m_o \times 5 \times 50 \times 319}{S_o \times 50 \times 50 \times 2 \times 173} = \frac{S \times m_o \times 0.09219}{S_o},$$

де: S – середнє значення площ піків 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти, обчислене із хроматограм випробовуваного розчину;

S<sub>o</sub> – середнє значення площ піків 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти, обчислене із хроматограм розчину СЗ 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти;

m<sub>o</sub> – маса наважки 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти, у грамах;

173 – молекулярна маса 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти;

319 – молекулярна маса лізинію.

Вміст лізинію в 1 мл препарату має бути від 0,0225 г до 0,0275 г (табл. 4).

### Валідація методики

Валідацію методики кількісного визначення лізинію у розчині для ін'єкцій проведено відповідно до вимог ІСН із валідації методик ВЕРХ [International Conference of Harmonization, Validation of Analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1). [www.ich.org](http://www.ich.org)] і ДФУ.

#### *Селективність (специфічність)*

Селективність методики, тобто її здатність відокремлювати домішки від визначуваної речовини, було наведено вище.

#### *Лінійність, межа кількісного визначення*

Для визначення лінійності методики, межі кількісного визначення та межі виявлення було приготовано та проаналізовано 5 розчинів 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-

тіооцтової кислоти. Із одержаних даних (табл. 1) було розраховано параметри рівняння лінійної регресії, коефіцієнт кореляції та межі кількісного визначення та виявлення.

Т а б л и ц я 1  
Залежність площі піка від концентрації лізинію

Концентрація 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти, мг/мл	Площа піка 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти
0,1004	754607
0,1004	759309
0,1004	758809
0,1004	765542
0,3011	2335117
0,3011	2325624
0,3011	2308950
0,3011	2316352
0,3011	2286942
0,5019	3773674
0,5019	3757022
0,5019	3756658
0,5019	3679538
0,5019	3710058
0,7026	5334733
0,7026	5325834
0,7026	5305216
0,7026	5277725
0,7026	5261872
1,0038	7483709
1,0038	7441802
1,0038	7425792
1,0038	7398538
1,0038	7365261

На рис. 16 наведено графік лінійної залежності площі піка від концентрації 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти, параметри рівняння лінійної залежності та коефіцієнт кореляції.

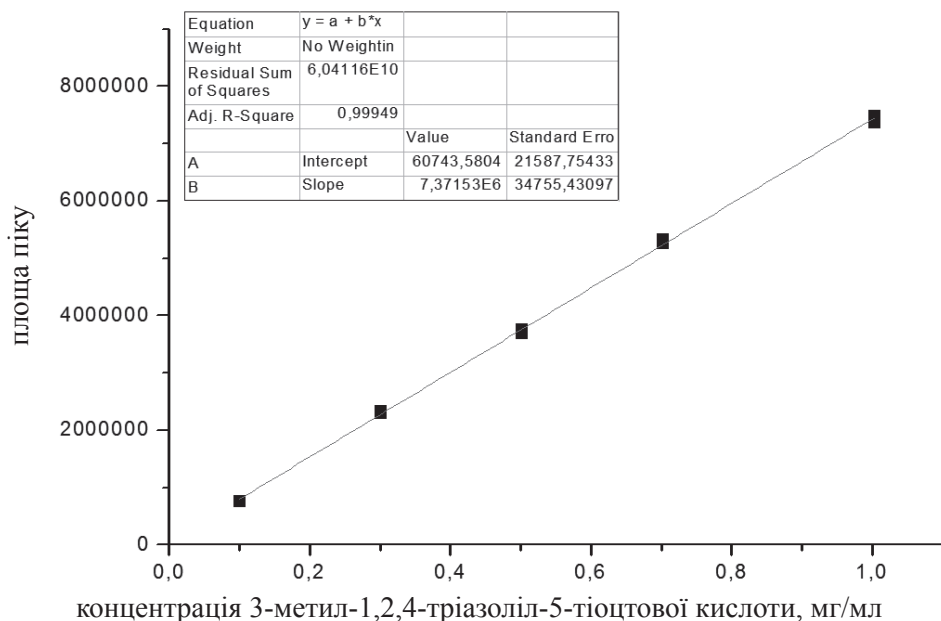


Рис. 16. Графік лінійної залежності площі піка від концентрації 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтової кислоти

Межа кількісного визначення становить 0,029 мг/мл.

Межа виявлення становить 0,0097 мг/мл.

#### Правильність

Правильність методики було перевірено методом «введено–знайдено». Для цього було приготовано 3 розчини стандартного зразка з різною концентрацією 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоцтової кислоти. Кожен розчин було проаналізовано 5 разів. Результати визначення (середні значення із п'яти паралельних визначень) наведено в табл. 2.

Т а б л и ц я 2

Результати визначення правильності методики методом «введено-знайдено»

Введено, мг/мл	Знайдено, мг/мл	%
0,1004	0,1002	99,8
	0,1004	100,0
	0,1003	99,9
	0,00996	99,2
	0,1002	99,8
Середнє, RSR %		99,7; 0,4%
0,5019	0,5034	100,3
	0,5024	100,1
	0,5033	100,3
	0,5023	100,1
	0,5024	100,1
Середнє, RSR %		100,2; 0,1%
1,0038	1,0038	100,0
	1,0078	100,4
	1,0068	100,3
	1,0018	99,8
	1,0028	99,9
Середнє, RSR %		100,1; 0,3%

### Точність і відтворюваність

Для визначення точності методу кількісного визначення хроматографували 5 разів розчин препарату. За одержаними даними розраховували кількість 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти.

Для визначення відтворюваності методики протягом трьох діб готували й аналізували розчини 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти, розраховуючи їх вміст від теоретичного. Результати наведено в табл. 3.

Т а б л и ц я 3

### Точність і відтворюваність методики

Теоретична концентрація, мг/мл	Точність (як збіжність) середнє % + RSD %	Точність (як відтворюваність)			
		відтворюваність % + RSD %			Середнє % + RSD %
		доба 1	доба 2	доба 3	
0,1004	99,89±0,09	99,9±0,4	99,6±0,3	99,9±0,3	99,8±0,2
0,5019	100,20±0,12	100,0±0,1	100,14±0,08	100,4±0,4	100,2±0,2
1,0038	100,1±0,3	99,9±0,4	100,1±0,3	100,5±0,2	100,2±0,2

На рис. 17, 18 наведено хроматограми розчину СЗ 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти та випробовуваного розчину препарату.

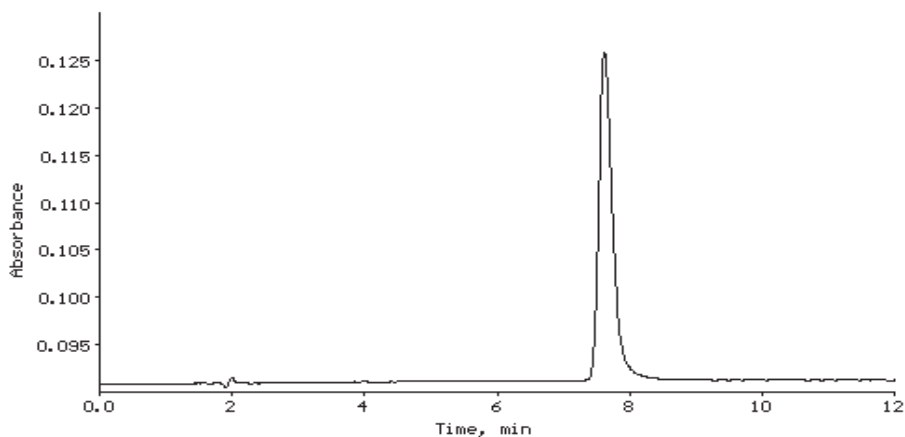


Рис. 17. Хроматограма розчину СЗ 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіооцтової кислоти

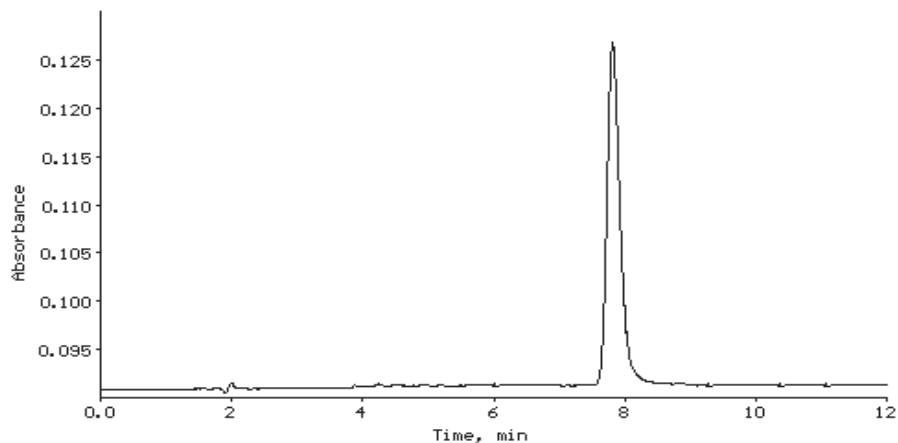


Рис. 18. Хроматограма випробовуваного розчину препарату

Т а б л и ц я 4

Результати кількісного визначення вмісту діючої речовини у 2,5 % розчині лізинію для ін'єкцій

Наважка кислоти	Площа піка		Площа піка	Кількість лізинію в 1 мл препарату (0,0225-0,0275) г
0,2520 г	3873208	Препарат. Стерильна фільтрація	4133998	0,0246
у 50 мл	3905917	2 мл в 50 мл	4227066	0,0251
5 мл у 50 мл	3913770		4155580	0,0247
Чистота 99,58 %	3896461		4113740	0,0245
	3869576		4194724	0,0249
	3891786			0,0248
		Препарат. Стерилізація при температурі 120 °С	4249370	0,0253
		2 мл в 50 мл	4291692	0,0255
			4230508	0,0251
			4138316	0,0246
			4190558	0,0249
				0,0251

#### В и с н о в к и

1. Розроблено та валідовано методику ВЕРХ для визначення критичних параметрів вмісту технологічних домішок у новій вітчизняній субстанції лізинію і проведено визначення її стабільності у “стресових” умовах.

2. Розроблено методику ВЕРХ кількісного визначення лізинію у 2,5% розчині лізинію для ін'єкцій та показано можливість одержання стабільного розчину із застосуванням стерилізації при температурі 120 °С та методом стерильної фільтрації.

3. Розроблені методики було використано для фармацевтичної розробки на препарат «Лізиній».

1. Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики / Зб. наукових статей, вип. VIII. – Вид-во ЗДМУ. – 255 с.

2. Мазур І.А., Волошин Н.А., Чекман І.С. і др. // Тиотриазолин. Фармакологические аспекты и клиническое применение // Львов: Наутилус, 2005. – 144 с.

3. Георгиевский Г.В. Физико-химические методики контроля качества тиотриазолина и стандартизация созданных на его основе лекарственных форм : дисс. на соиск. уч. степени канд. фармацевт. наук / Г.В.Георгиевский. – Харьков, 1995. – 135 с.

4. Георгиевский Г.В., Хованская Н.П., Гризодуб А.И. и др. Контроль качества лекарственных средств на основе тиотриазолина // Фармаком, 1995. – № 1, 2. – С. 28–41.

5. Георгиевский Г.В., Мазур І.А. Аналитическое обеспечение синтеза и создания готовых лекарственных форм производных 1,2,4-триазола //

8-ма українська конференція з аналітичної хімії з міжнародною участю / Тези конф. – Одеса. – 2008. – С. 178

6. Кучеренко Л.І., Георгієвський Г.В., Шаповалова Л.І. Розробка методів стандартизації нового лікарського препарату-кардіотрил.// Фармаком. – 2008. – С. 55–60.

7. Георгиевский Г.В. Разработка комплекса физико-химических методик,

обеспечивающих создание и контроль качества оригинальных отечественных препаратов – производных 1,2,4-триазола/ Запорізький медичний журнал. – 2011, № 1. – С. 58–70.

8. *Кучеренко Л.І.* Розробка технології і стандартизація таблетованих лікарських препаратів на основі похідних 1,2,4-триазолу: автореф. дис. на здобуття вченого ступеня д-ра фармац. наук / *Л.І.Кучеренко*. – Харків, 2010, 44 с.

9. *Егоров А.А., Беленичев И.Ф., Мазур И.А., Георгиевский Г.В. и др.* Состояние энергетического метаболизма при церебральной ишемии и его модуляция производными L-лизина/Український наук.-практ. молодіжний журнал. – 2011, Спец. випус. – С. 49–50.

10. Патент № 86668 України (2009) Лизиний 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат, що проявляє нейропротекторну, ноотропну, кардіопротекторну, ендотекторну. Протиішемичну, антиоксидантну, протизапальну, протигіпоксичну дії та є малотоксичним/ Мазур І.А., Беленічев І.Ф., Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Кучеренко Л.І., Волошин М.Ан., Чекман І.С., Мамчур В.І., Горчакова Н.А., Георгієвський Г.В., Грошовий Т.А./ Заявник і патентовласник ТОВ «НВО ФАРМАТРОН». Заявлено 25.02.2009. Опубл. 12.05.2009, Бюл. № 9.

11. ICH Topic Q 8 (R 2). – Part I. – Pharmaceutical Development

(EMA/CHMP/167068/2004 Note for Guidance on Pharmaceutical Development.

12. CPMP/ICH/367/96 (ICH Topic Q6A). – Note for Guidance Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances.

13. Настанова 42-3.2:2004. – Настанови з якості. Лікарські засоби. Специфікації: контрольні випробування та критерії прийнятності / *В.Георгієвський, М.Ляпунов, О.Безугла та ін.* – К., МОЗ України, 2004. – 38 с.

14. The Rules Governing Medicinal Products in the European Union. Volume 3A: Quality Guidelines. – Guideline 3AQ11a: Specifications and Control Tests on the Finished Product.

15. ICH Topic Q 8. – Part II. – Annex Pharmaceutical Development

(EMA/CHMP/167068/2004 Annex to Note for Guidance on Pharmaceutical Development.

16. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.2:2011. – Лікарські засоби. Управління ризиками для якості (ICH Q9) / *М.Ляпунов, О.Безугла, О.Соловійов та ін.* – К., МОЗ України, 2011. – 30 с.

Надійшла до редакції 17.01.2012.

*Г. В. Георгиевский*

МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ КРИТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКЕ СУБСТАНЦИИ ЛИЗИНИЙ-3-МЕТИЛ-1,2,4-ТРИАЗОЛИЛ-5-ТИОАЦЕТАТА И 2,5% РАСТВОРА ЛИЗИНИЯ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ

**Ключевые слова:** критические показатели качества, фармацевтическая разработка, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация, лизиний-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (лизиний)

Разработаны и валидированы методики определения критических показателей качества новой оригинальной субстанции лизиний-3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (лизиний) и его 2,5 % раствора для инъекций. Методика позволяет контролировать качество молекулы по допускам технологических примесей и изучать ста-

бильность субстанции по установлению критических параметров содержания продуктов распада в «стрессовых» условиях.

Предложена и провалидирована методика количественного определения 2,5 % раствора лизиния для инъекций и показана возможность изготовления ампул с применением стерилизации при температуре 120 °С и методом стерильной фильтрации.

Разработанные методики были использованы для Фармацевтической разработки на препарат лизиний.

*G. V. Georgievskiy*

#### ASSESSMENT PROCEDURES OF QUALITY CRITICAL PARAMETERS IN THE PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT OF THE SUBSTANCE DESIGNATED LYSINIY OR LYSINE-3-METHYL-1,2,4-TRIAZOLYL-5-THIOACETATE AND 2.5 % INJECTION THEREOF

**Key words:** quality critical parameters, pharmaceutical development, high performance liquid chromatography (HPLC), validation, lysine-3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate (hereinafter referred to as lysiniy)

The procedures for determination of quality critical parameters for the novel original substance of lysine-3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate (lysiniy) and its 2.5 % injection have been developed and validated. The procedure enables both to monitor quality of a molecule by allowable limits for process-related impurities and to study the stability of the substance by identifying critical parameters of decomposition products content under stress conditions.

A method of quantification of 2.5 % lysiniy injection was proposed and validated and capability to manufacture ampoules using sterilization by sterile filtration processes at 120 °C was shown.

The procedures proposed were used for the pharmaceutical development of “lysiniy” preparation.