

## Валідація методики визначення супровідних домішок в активній речовині противірусного засобу енісаміуму йодиду

О. В. Бурмака, С. М. Гуреєва, В. М. Маргітич

ПАТ «Фармак», м. Київ, Україна

**Ключові слова:** енісаміуму йодид, субстанція, супровідні домішки, ВЕРХ, валідація.

**Запорізький медичний журнал.** – 2018. – Т. 20, № 5(110). – С. 708–716

**DOI:**  
10.14739/2310-1210.2018.5.141718

**E-mail:**  
o.burmaka@farmak.ua

**Мета роботи** – валідація методики високоефективної рідинної хроматографії з визначення бензиламіну, ізонікотинової кислоти, бензиламіду ізонікотинової кислоти та неідентифікованих домішок у субстанції енісаміуму йодиду.

**Матеріали та методи.** Використали рідинний хроматограф Agilent 1200, що обладнаний дегазатором, чотириканальним насосом, автоматичним вводом проби, термостатом хроматографічної колонки та діодноматричним детектором, а також хроматографічну колонку Zorbax Eclipse XDB-C18 розміром 150,0 × 4,6 мм, заповнену октадецилсильним сорбентом, з розміром часток 5 мкм. Рухома фаза є сумішшю буферного розчину рН 2,5, що містить натрію октан-1-сульфонат у кількості 0,1 % : вода : ацетонітрил (30 : 44 : 26 об./об./об.). Застосували первинні стандартні зразки ПАТ «Фармак»: енісаміуму йодид (с. 07-16) та бензиламід ізонікотинової кислоти (с. 10413). Інші матеріали порівняння та реактиви використали з достатньою чистотою (ф. «Sigma-Aldrich»).

**Результати.** Встановлено ліміти детектування та ліміти кількісного визначення ідентифікованих і неідентифікованих домішок. Підтверджені такі валідаційні характеристики, як специфічність, правильність, прецизійність, діапазон застосування, робастність, внутрішньолабораторна прецизійність. Підтверджена лінійність в діапазоні 0,01–0,06 % для кожної із домішок (при максимально допустимому вмісті кожної домішки 0,05 %). Коефіцієнти кореляції лінійної залежності від концентрації (r) між введеними та виявленими значеннями для кожної із домішок, яку визначали, становлять понад 0,990, а відносні довірчі інтервали ( $\Delta_2$ ) знаходяться на рівні не більше ніж 5,0 %. Підтверджено стабільність випробовуваного розчину, розчину порівняння та розчину для перевірки придатності хроматографічної системи при їх зберіганні за кімнатної температури протягом 48 год.

**Висновки.** Експериментально доведено, що описана методика може бути застосована для контролю якості субстанції енісаміуму йодиду.

**Ключевые слова:** энисамиума йодид, субстанция, сопутствующие примеси, ВЭЖХ, валидация.

**Запорожский медицинский журнал.** – 2018. – Т. 20, № 5(110). – С. 708–716

## Валідація методики определения сопутствующих примесей в активном веществе противовирусного препарата энисамиума йодид

А. В. Бурмака, С. Н. Гуреєва, В. М. Маргітич

**Цель работы** – валідація методики високоєфективної жидкостної хроматографії по визначенню бензиламіна, ізонікотинової кислоти, бензиламіда ізонікотинової кислоти та неідентифікованих примесей в субстанції енісаміуму йодиду.

**Матеріали и методы.** Использовали жидкостный хроматограф Agilent 1200, оснащенный дегазатором, четырехканальным насосом, автоматическим вводом пробы, термостатом хроматографической колонки и диодноматричным детектором; а также хроматографическую колонку Zorbax Eclipse XDB-C18 размером 150,0 × 4,6 мм, заполненную октадецилсильным сорбентом, с размером частиц 5 мкм. Подвижная фаза представляла собой смесь буферного раствора рН 2,5, который содержал натрия октан-1-сульфоната в количестве 0,1 %: вода: ацетонитрил (30:44:26 об./об./об.). Использовали первичные стандартные образцы ПАО «Фармак»: энисамиума йодид (с. 07-16) и бензиламид изонікотинової кислоти (с. 10413). Другие материалы сравнения и реактивы имели достаточную степень чистоты (ф. «Sigma-Aldrich»).

**Результаты.** Установлены лимиты детектирования и лимиты количественного определения идентифицированных и неидентифицированных примесей. Подтверждены такие валидационные характеристики, как специфичность, правильность, прецизионность, диапазон применения, робастность, внутрिलाбораторная прецизионность. Подтверждена линейность в диапазоне 0,01–0,06 % для каждой примеси (при максимально допустимом содержании каждой примеси 0,05 %). Коэффициент корреляции линейной зависимости сигнала от концентрации (r) между введенными и найденными значениями для каждой из определяемых примесей составляет более 0,990, а относительные доверительные интервалы ( $\Delta_2$ ) находятся на уровне не более 5,0 %. Подтверждена стабильность испытываемого раствора, раствора сравнения и раствора для проверки пригодности хроматографической системы при их хранении при комнатной температуре на протяжении 48 часов.

**Выводы.** Экспериментально доказано, что описанная методика может быть использована для контроля качества субстанции энисамиума йодиду.

**Key words:** enisamium iodide, active pharmaceutical ingredient, related impurities, HPLC, validation studies.

## Validation of the method for determination of related impurities in the active antiviral ingredient of enisamium iodide

O. V. Burmaka, S. M. Hureieva, V. M. Marhitych

**The aim of the work.** To validate a method for the related impurities determination in the enisamium iodide active pharmaceutical ingredient (API) by means of high-performance liquid chromatography (HPLC). To characterize the sensitivity of the method by establishing the limit of detection and limit of quantification for the following impurities: benzylamine, isonicotinic acid (raw materials for API synthesis), isonicotinic acid benzylamide (intermediate product of API synthesis) and unidentified impurities. To confirm

the method compatibility with validation characteristics as recommended by the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Medicinal Products for Human Use (ICH).

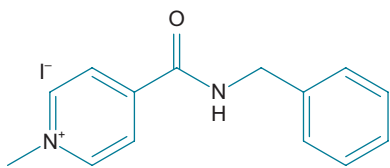
**Materials and methods.** The liquid chromatograph Agilent 1200 equipped with degasser, four-channel pump, auto sampler, chromatographic column thermostat and diode array detector was used. The Zorbax Eclipse XDB-C18 chromatographic column with dimensions 150.0 × 4.6 mm filled by octadecylsilane sorbent with a particles size of 5 μm, was used. The mobile phase was a mixture of a buffer solution pH 2.5 containing sodium octane-1-sulfonate in an amount of 0.1 %: water : acetonitrile (30 : 44 : 26 v/v/v). The primary standards of Farnak JSC were used: enisamium iodide (b. 07-16) and isonicotinic acid benzylamide (b. 10413). Other materials and reagents were used with sufficient purity (Sigma-Aldrich).

**Results.** Detection limits and limits of quantification for identified and unidentified impurities have been determined. Validation characteristics such as specificity, accuracy, precision, range of use, robustness, intermediate precision have been confirmed. The linearity has been confirmed within the range of 0.01–0.06 % for each of the impurities (with a maximum permitted content of each impurity of 0.05 %). The correlation coefficients of linear regression ( $r$ ) between the entered and found values for each of the determined impurities are greater than 0.990 and the relative confidence intervals ( $\Delta_z$ ) are at the level not more than 5.0 %. Stability of the test solution, reference solution and solution for system suitability test upon storage at room temperature for 48 hours have been confirmed.

**Conclusions.** It has been experimentally proved that the described method can be used for quality control of enisamium iodide substance.

У щорічному звіті Європейського центру профілактики та контролю за захворюваннями [1] відзначено, що вакцини виявляють недостатню ефективність, тому необхідність розробки і застосування ефективних і безпечних хіміотерапевтичних лікарських засобів є актуальним питанням щодо лікування грипу та ГРВІ.

Серед небагатьох оригінальних протівірусних хіміотерапевтичних засобів необхідно вказати на енісаміум йодид (N-метил-4-бензилкарбамідопіридинію йодид) [2,3], структурна формула якого наведена на *рис. 1*.



**Рис. 1.** Структурна формула енісаміуму йодиду.

У роботі [4] детально описано розробку методики визначення супровідних домішок субстанції енісаміуму йодиду, а на підставі стресових випробувань продемонстровано: методика є специфічною щодо визначення продуктів деградації субстанції.

Структурні формули ідентифікованих домішок наведено на *рис. 2*.

Бензиламін та ізонікотинова кислота є вихідними речовинами для синтезу субстанції, а бензиламід ізонікотинової кислоти – проміжним продуктом синтезу.

Відповідно до рекомендацій ICH Q2 (R1) [5], для аналітичної методики має бути наведений експериментальний доказ, що вона придатна для вирішення окреслених завдань.

У роботі вперше наведені дані з валідації аналітичної методики визначення бензиламіну, ізонікотинової кислоти, бензиламід ізонікотинової кислоти та неідентифікованих домішок.

## Мета роботи

Валідація методики ВЕРХ із визначення бензиламіну, ізонікотинової кислоти, бензиламід ізонікотинової кислоти та неідентифікованих домішок у субстанції енісаміуму йодиду.

## Матеріали і методи дослідження

У рамках валідації аналітичної методики використали субстанцію енісаміуму йодиду виробництва ПАТ «Фармак», серія 10416.

Хроматографічні роботи виконали з застосуванням хроматографа фірми Agilent Technologies, серії 1200. Для зважування стандартних зразків і реактивів використовували ваги електронні «Mettler Toledo AB54S» (Швейцарія). У роботі застосували посуд класу А фірми «Simax» (Чехія).

Для приготування розчину порівняння та модельних сумішей використали стандартні зразки (СЗ) та матеріали: СЗ енісаміуму йодиду виробництва ПАТ «Фармак», с. 07-16; СЗ бензиламід ізонікотинової кислоти виробництва ПАТ «Фармак», с. 10413; бензиламін Sigma-Aldrich, каталожний (кат.) № 185701; ізонікотинову кислоту Sigma-Aldrich, кат. № I17508.

У процесі приготування рухомої фази використали такі реактиви: вода очищена, яку отримали з установки Milli Q, виробництва Millipore Corporation (Німеччина); динатрію гідрогенфосфат безводний Sigma-Aldrich, кат. № 04276; натрій октан-1-сульфонат моногідрат Sigma-Aldrich, кат. № 74882; фосфорна кислота 85 % Sigma-Aldrich, кат. № 04107; ацетонітрил Sigma-Aldrich, кат. № 34851. Для приготування 0,1 М розчину натрію гідроксиду застосували натрію гідроксид Sigma-Aldrich, кат. № 06203.

*Приготування буферного розчину рН 2,5.* 1,085 г натрію октан-1-сульфонату моногідрату і 1,000 г динатрію гідрофосфату безводного розчиняють в 900 мл води очищеної, коригують рН розчину фосфорною кислотою 85 % до рН (2,50 ± 0,05) і доводять об'єм розчину водою очищеною до 1000 мл.

*Приготування рухомої фази.* До 300 мл буферного розчину рН 2.5 додають 440 мл води очищеної та 260 мл ацетонітрилу, перемішують і фільтрують крізь фільтр із розміром пор 0,45 мкм.

*Приготування розчину випробування.* До 0,4000 г випробовуваної субстанції додають 80 мл рухомої фази, перемішують до повного розчинення, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100 мл, перемішують. 10 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100 мл.

Таблиця 1. Дані, що підтверджують придатність хроматографічної системи

Параметри придатності хроматографічної системи	Вимоги	Отримані значення
Число теоретичних тарілок, розраховане за піком бензиламіну (при 205 нм)	не менше ніж 2500	19740
Симетрія піка бензиламіну (при 205 нм)	від 0,8 до 1,5	1,2
Співвідношення пік/западина для піка йодид-іону та піка ізонікотинової кислоти (при 265 нм)	не менше ніж 1,1	4,0
Співвідношення пік/западина для піка енісаміуму та піка бензиламіді ізонікотинової кислоти (при 205 нм)	не менше ніж 1,1	6,0
Відносне стандартне відхилення, розраховане для 3 паралельних інжекцій, для кожного з компонентів, який визначали, у %	не більше ніж 2,0	максимальне значення – 1,2

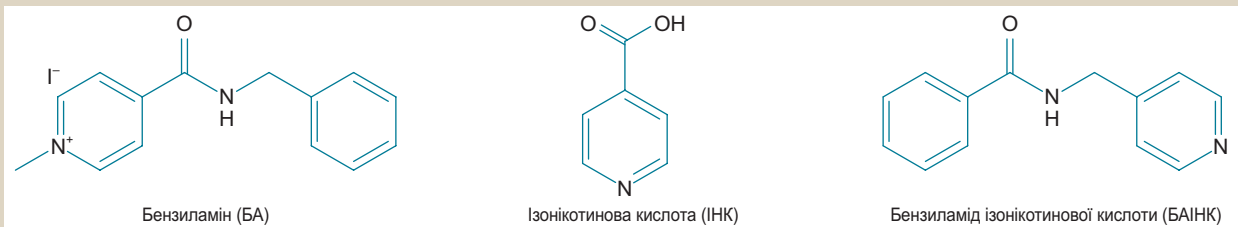


Рис. 2. Структурні формули ідентифікованих домішок.

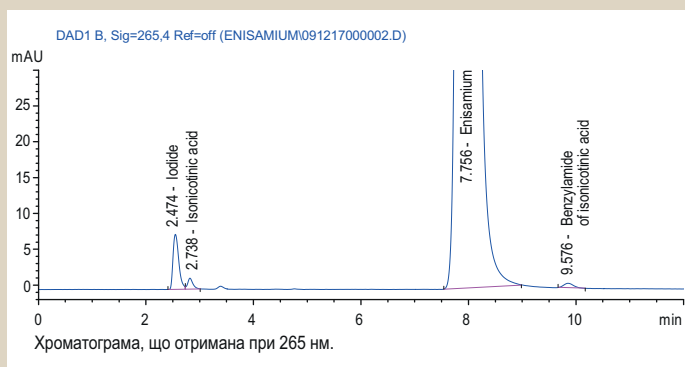
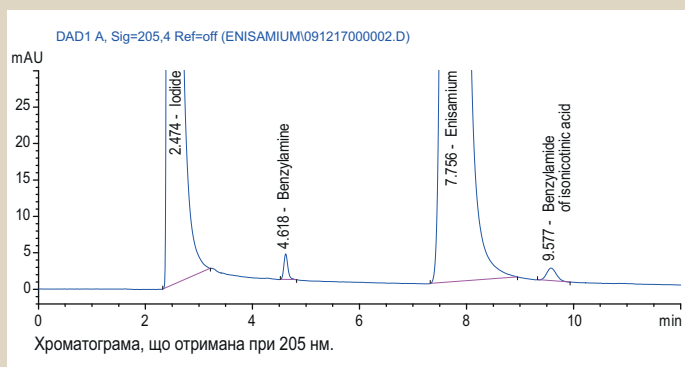


Рис. 3. Хроматограми розчину для перевірки придатності хроматографічної системи.

**Приготування проміжного розчину бензиламіну.** 0,100 г бензиламіну розчиняють в 10 мл ацетонітрилу і доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100 мл. 10 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100 мл.

**Приготування проміжного розчину бензиламіді ізонікотинової кислоти.** 0,010 г бензиламіді ізонікотинової кислоти розчиняють у 10 мл ацетонітрилу та доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100 мл.

**Приготування проміжного розчину ізонікотинової кислоти.** 0,100 г ізонікотинової кислоти розчиняють у

10 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду і доводять об'єм розчину рухомою фазою до 100 мл. 10 мл одержаного розчину доводять рухомою фазою до об'єму 100 мл.

**Приготування проміжного розчину енісаміуму йодиду.** 0,400 г стандартного зразка енісаміуму йодиду розчиняють в 80 мл рухомої фази і доводять об'єм розчину до 100 мл тим самим розчинником.

**Приготування кінцевого розчину порівняння.** До 10 мл проміжного розчину енісаміуму йодиду додають по 0,2 мл проміжних розчинів бензиламіну, бензиламіді ізонікотинової кислоти та ізонікотинової кислоти, перемішують і доводять об'єм розчину до 100 мл рухомою фазою.

**Приготування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи.** До 10 мл проміжного розчину енісаміуму йодиду додають по 0,12 мл проміжних розчинів бензиламіну, бензиламіді ізонікотинової кислоти та ізонікотинової кислоти, перемішують і доводять об'єм розчину до 100 мл рухомою фазою.

**Хроматографічні умови.**

Хроматографічна колонка – Zorbax Eclipse XDB-C18 розміром 150,0 × 4,6 мм, заповнена октадецилсилільним сорбентом з розміром часток 5 мкм.

Швидкість потоку рухомої фази – 0,5 мл/хв.

Довжина хвилі детектування – 205 нм та 265 нм.

Температура термостату колонки – 30 °С.

Об'єм інжекції – 20 мкл.

**Умови придатності хроматографічної системи.**

Хроматографічну систему вважають придатною, якщо на хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи виконуються такі умови:

– число теоретичних тарілок, розраховане за піком бензиламіну – не менше ніж 2500 (при довжині хвилі 205 нм);

– симетрія піка бензиламіну – від 0,8 до 1,5 (при довжині хвилі 205 нм);

– співвідношення пік/западина для піка йодид-іону та піка ізонікотинової кислоти – не менше ніж 1,1 (при довжині хвилі 265 нм);

– співвідношення пік/западина для піка енісаміуму та піка бензиламіді ізонікотинової кислоти – не менше ніж 1,1 (при довжині хвилі 205 нм);

– відносно стандартне відхилення, розраховане для 3 паралельних інжекцій, для кожного із компонентів, який визначали, має бути не більше ніж 2,0 %.

Для оцінювання вмісту домішок площі піків, одержаних на хроматограмі випробовуваного розчину, порівнюють із площами піків, що одержані на хроматограмі розчину порівняння. Оцінювання вмісту бензиламіну, бензиламиду ізонікотинової кислоти та неідентифікованих домішок проводять із хроматограм, що отримані при 205 нм, а оцінювання вмісту ізонікотинової кислоти – при 265 нм.

## Результати та їх обговорення

**Придатність хроматографічної системи.** Перед початком валідаційних робіт проаналізували розчин для перевірки придатності хроматографічної системи (рис. 3).

У таблиці 1 наведені результати щодо придатності хроматографічної системи.

**Специфічність.** Для підтвердження специфічності методики виконали хроматографування розчинника (рухомої фази), розчинів ідентифікованих домішок у концентрації 0,0004 мг/мл та розчин енісаміуму йодиду у концентрації 0,4 мг/мл.

Отримані хроматограми наведені на рис. 4.

Оскільки на хроматограмах відсутня інтерференція піків визначуваних домішок між собою, піками енісаміуму йодиду та піками рухомої фази, то можна стверджувати, що методика є специфічною.

У роботі [4] підтверджена специфічність аналітичної методики в рамках стресових випробувань, коли субстанцію піддавали впливу підвищеної температури, окисненню, кислотному та лужному гідролізу, а також впливу світла.

**Лінійність** вивчили на модельних сумішах, в яких концентрація бензиламіну, бензиламиду ізонікотинової кислоти, ізонікотинової кислоти та енісаміуму йодиду змінювалася в діапазоні від 0,01 % до 0,06 % щодо концентрації енісаміуму йодиду в розчині випробування (0,4 мг/мл).

Графіки лінійної залежності площ піків від концентрації компонентів наведені на рис. 5.

Параметри лінійної залежності розрахували методом найменших квадратів [6]. Отримані дані наведені в таблиці 2.

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності, що рекомендовані ДФУ [7].

Результати аналізу модельних сумішей для визначення домішок та їх статистичне опрацювання наведені в таблиці 3.

**Межа виявлення та межа кількісного визначення.** Межу виявлення (МВ) та межу кількісного визначення (МКВ) ідентифікованих і неідентифікованих домішок визначили за результатами лінійної регресії, використовуючи значення стандартного відхилення вільного члена лінійної залежності ( $S_a$ ) та кутового коефіцієнта для розрахованої регресійної прямої (b):

$$\begin{aligned} \text{МВ (\%)} &= 3,3 \cdot S_a / b \\ \text{МКВ (\%)} &= 10 \cdot S_a / b \end{aligned}$$

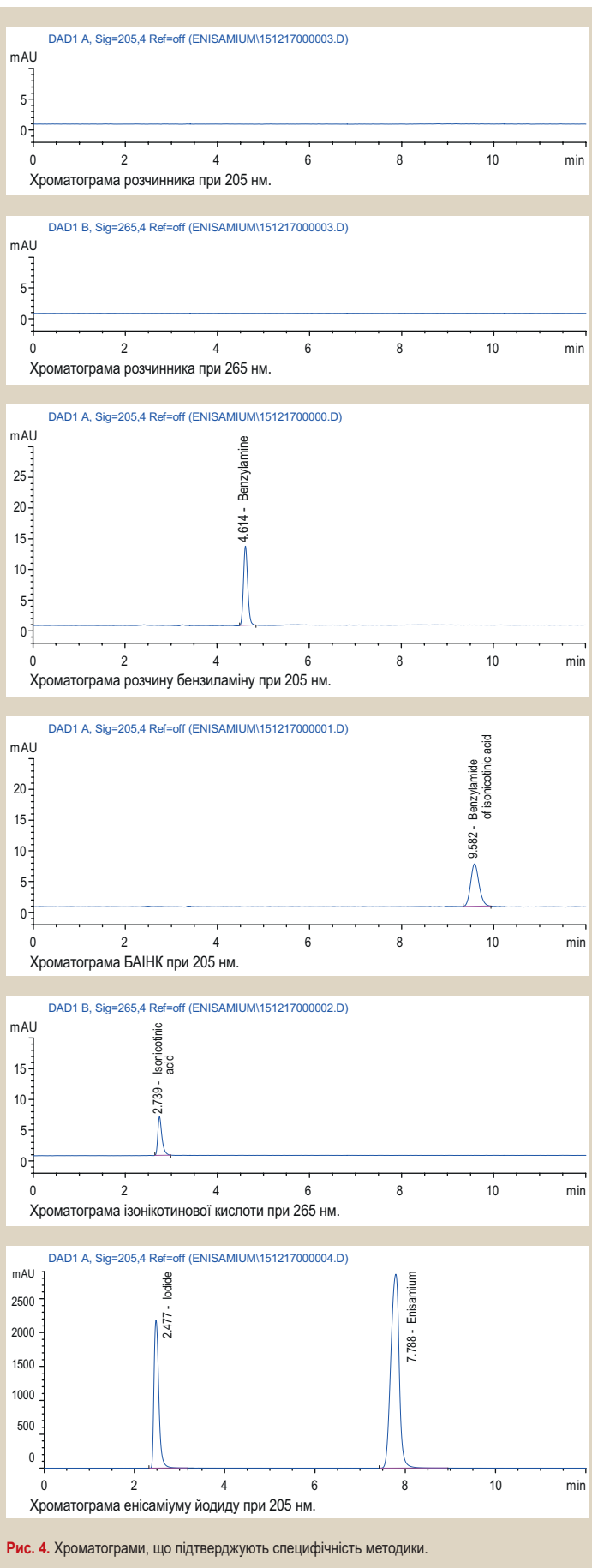


Рис. 4. Хроматограми, що підтверджують специфічність методики.

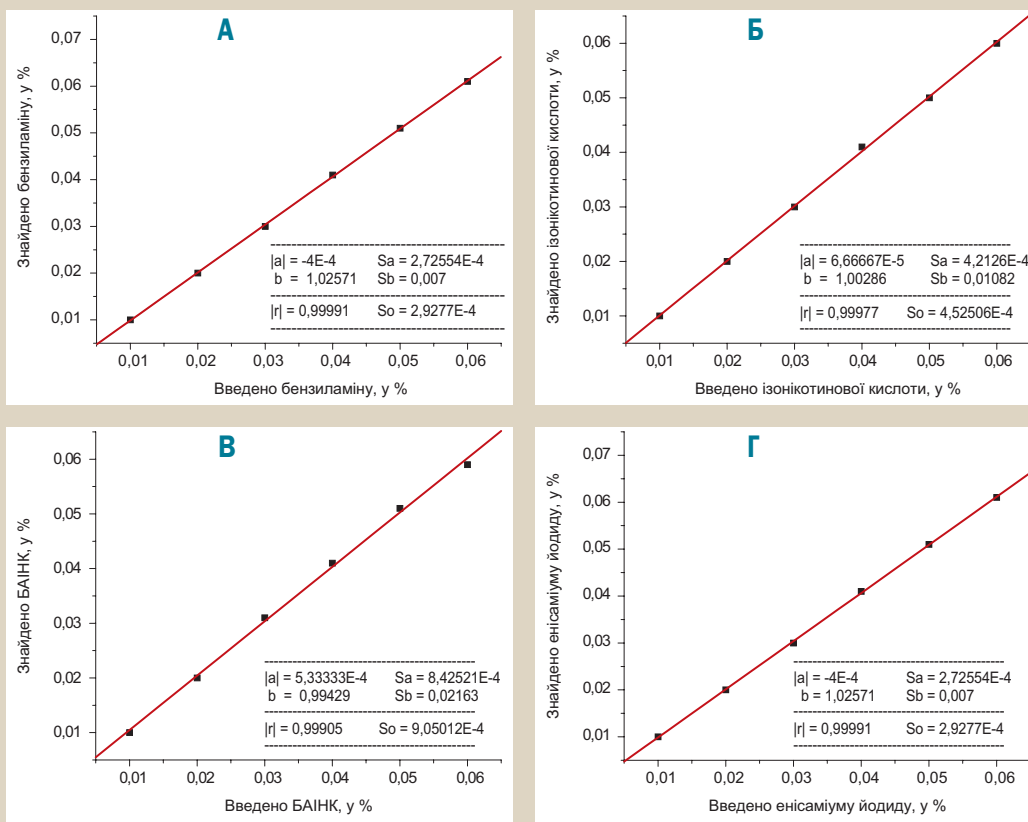


Рис. 5. Графіки лінійної залежності площ піків від концентрації компонентів:

- А: бензиламіну (БА);
- Б: ізонікотинової кислоти;
- В: бензиламід ізонікотинової кислоти (БАІНК);
- Г: енісаміуму йодиду.

Таблиця 2. Метрологічні характеристики лінійної залежності площ піків компонентів, які визначали, і концентрації

Величина	Критерій прийнятності параметрів лінійної залежності	Отримані значення			
		Бензиламін	Ізонікотинова кислота	БАІНК*	Енісаміум йодид
$b$	–	1,02571	1,00286	0,99429	1,02571
$s_b$	–	0,007	0,01082	0,02163	0,00700
$ a $	$\leq 5,0$	0,00040	0,00007	0,00053	0,00040
$s_a$	–	0,00027	0,00042	0,00084	0,00027
$s_0$	–	0,00029	0,00045	0,00090	0,00029
$s_0/b$	–	0,00028	0,00045	0,00090	0,00028
$ r $	$\geq 0,990$	0,99991	0,99977	0,99905	0,99991

\*: бензиламід ізонікотинової кислоти;  $b$ : кутовий коефіцієнт для розрахованої регресійної прямої;  $s_b$ : тангенс кута нахилу для розрахованої регресійної прямої;  $|a|$ : вільний член лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої;  $s_a$ : стандартне відхилення вільного члена лінійної залежності для розрахованої регресійної прямої;  $s_0$ : залишкове стандартне відхилення;  $|r|$ : коефіцієнт кореляції між введеним і знайденим значенням для компонента.

На основі даних, що наведені в таблиці 2, встановили МВ і МКВ. МВ і МКВ для визначуваних компонентів наведені в таблиці 4.

**Правильність (Accuracy).** Для оцінювання правильності готували 3 модельні розчини з концентрацією ідентифікованих домішок та енісаміуму йодиду 0,03 %, 0,05 % та 0,06 % щодо концентрації енісаміуму йодиду у розчині випробування в трьох паралельних дослідах для кожного концентраційного рівня. Результати наведені в таблиці 5.

Відносне стандартне відхилення між результатами для одного концентраційного рівня для всіх домішок, які визначали, становить не більше ніж 5,0 %.

Правильність аналітичної методики перебувають в межах критерію 95,0–105,0 %.

**Точність (Precision).** Точність вивчена на рівні збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності.

Для оцінювання збіжності готували та аналізували 6 модельних сумішей, у яких були наявні ідентифіковані домішки в концентрації 0,05 % щодо концентрації субстанції у випробовуваному розчині (на максимальному допустимому рівні домішок за наявності енісаміуму йодиду в концентрації 0,4 мг/мл) та 6 модельних розчинів енісаміуму йодиду в концентрації 0,05 % щодо концентрації енісаміуму йодиду в розчині випробування.

Внутрішньолабораторну прецизійність підтверджували в порівнянні результатів з іншим аналітиком, аналізуючи 12 додаткових модельних сумішей наступного дня (6 модельних сумішей домішок, які визначали, та 6 модельних розчинів енісаміуму йодиду).

Результати перевірки точності аналітичної методики наведені в таблиці 6.

Як видно з таблиці 6, відносне стандартне відхилення (RSD) отриманих результатів аналізу першого та другого аналітика, а також відносна різниця середніх значень результатів не перевищує 5,0 %, що свідчить про належну повторюваність результатів.

**Робастність** вивчали за стабільністю досліджуваних розчинів та надійністю хроматографічної процедури.

Стабільність розчинів випробування вивчали за зміною площ піків під час зберігання розчинів за температури 25 °С. Результати вивчення стабільності розчинів наведено в таблиці 7.

Експериментально встановлено, що випробовувані розчини стабільні протягом 48 год при зберіганні за температури не більше ніж 25 °С. Підтверджена стабільність розчину випробування, встановлено, що на

Таблиця 3. Результати аналізу модельних сумішей домішок та їхнє статистичне опрацювання

Концентрація аналітів								
У модельній суміші відносно концентрації в розчині порівняння, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 0.05$	Знайдена на підставі площ піків відносно концентрації в розчині порівняння, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 0.05$				Розрахована щодо введеної кількості, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$			
	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміуму йодид	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміуму йодид
0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	100,0	100,0	100,0	100,0
0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	100,0	100,0	100,0	100,0
0,030	0,030	0,030	0,031	0,030	100,0	100,0	103,3	100,0
0,040	0,041	0,041	0,041	0,041	102,5	102,5	102,5	102,5
0,050	0,051	0,050	0,051	0,051	102,0	100,0	102,0	102,0
0,060	0,061	0,060	0,059	0,061	101,7	100,0	98,3	101,7
Середнє, Z%					101,3	101,0	101,1	101,0
Відносне стандартне відхилення, RSD <sub>Z</sub> %					1,15	1,01	1,93	1,15
Довірчий інтервал збіжності результатів $\Delta_z \% = t(0,05; 5) \times RSD_z$					2,32	2,04	3,89	2,32
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_z \% \leq \Delta_{As}$ ( $\Delta_{As} = 5,0 \%$ )					2,32 < 5,00	2,04 < 5,00	3,89 < 5,00	2,32 < 5,00
Систематична похибка $\delta =  Z - 100 $					1,3	1,0	1,1	1,0
Критерій незначущості систематичної похибки $\delta \leq 0,32 \times \Delta_{As}$					1,3 < 1,6	1,0 < 1,6	1,1 < 1,6	1,0 < 1,6

Таблиця 4. Межі виявлення та межі кількісного визначення ідентифікованих і неідентифікованих домішок

Домішка	Межа виявлення	Межа кількісного визначення
Бензиламін	0,001 %	0,003 %
Ізонікотинова кислота	0,001 %	0,004 %
Бензиламід ізонікотинової кислоти	0,003 %	0,008 %
Неідентифіковані домішки (за піком енісаміуму)	0,001 %	0,003 %

Таблиця 5. Результати аналізу вивчення правильності

Концентрація аналітів								
У модельній суміші щодо концентрації в розчині порівняння, % $X_i = \frac{C_i}{C_{st}} \times 0.05$	Знайдена на підставі площ піків щодо концентрації в розчині порівняння, % $Y_i = \frac{S_i}{S_{st}} \times 0.05$				Розрахована щодо введеної кількості, % $Z_i = \frac{Y_i}{X_i} \times 100$			
	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміуму йодид	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміуму йодид
0,030	0,030	0,030	0,031	0,031	100,0	100,0	103,3	103,3
0,030	0,031	0,031	0,031	0,031	103,3	103,3	103,3	103,3
0,030	0,031	0,031	0,030	0,030	103,3	103,3	100,0	100,0
0,050	0,051	0,051	0,050	0,050	102,0	102,0	100,0	100,0
0,050	0,051	0,050	0,051	0,051	102,0	100,0	102,0	102,0
0,050	0,051	0,050	0,051	0,050	102,0	100,0	102,0	100,0
0,060	0,061	0,060	0,060	0,061	101,7	100,0	100,0	101,7
0,060	0,061	0,060	0,061	0,060	101,7	100,0	101,7	100,0
0,060	0,060	0,059	0,060	0,059	100,0	98,3	100,0	98,3
RSD (Z), % (для рівня 0,03 %)					1,86	1,86	1,86	1,86
RSD (Z), % (для рівня 0,05 %)					0	1,15	1,14	1,15
RSD (Z), % (для рівня 0,06 %)					0,97	0,97	0,97	1,68
RSD між значеннями всіх концентраційних рівнів (Z), %					1,16	1,69	1,39	1,69

$X_i$  та  $Y_i$ : нормалізовані значення «знайдено/введено»;  $Z_i$ : відношення «знайдено/введено» аналіту, у %;  $C_i$ : концентрація аналіту в  $i$ -тому аналізованому розчині;  $C_{st}$ : концентрація аналіту в розчині порівняння;  $S_i$ : площа визначуваного піка для  $i$ -того аналізованого розчину;  $S_{st}$ : площа визначуваного піка для розчину порівняння.

хроматограми випробовуваного розчину не спостерігали утворення піків домішок при його зберіганні за температури 25 °C протягом 48 год. Після зберігання розчину для перевірки придатності хроматографічної системи протягом 48 год підтверджена можливість оцінювання придатності хроматографічної системи.

Надійність хроматографічної процедури перевіряли за варіабельністю швидкості потоку рухомої фази, температури термостату колонки, складу рухомої фази,

pH буферного розчину та застосування альтернативної хроматографічної колонки (колонки з іншим серійним номером). Відповідно до цього проводили хроматографування розчину для перевірки придатності хроматографічної системи, розчину порівняння, модельної суміші, що містила по 0,05 % кожної домішки та модельну суміш енісаміуму йодиду 0,05 % (відсоткові значення щодо концентрації енісаміуму йодиду у випробовуваному розчині) з оцінюванням надалі вмісту речовин.

Таблица 6. Результаты проверки точности методики визначення домішок

Аналітик	Знайдений вміст, %				
	№ зразка	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміуму йодид
Перший	1	0,050	0,051	0,050	0,051
	2	0,051	0,050	0,050	0,050
	3	0,050	0,051	0,051	0,049
	4	0,051	0,051	0,051	0,050
	5	0,051	0,050	0,050	0,050
	6	0,050	0,050	0,051	0,049
	Середнє значення	0,051	0,051	0,051	0,050
	RSD <sub>x</sub> , %	1,08	1,08	1,08	1,51
Другий	1	0,050	0,050	0,050	0,049
	2	0,051	0,051	0,051	0,050
	3	0,051	0,050	0,051	0,050
	4	0,050	0,050	0,051	0,049
	5	0,050	0,051	0,050	0,050
	6	0,050	0,051	0,051	0,049
	Середнє значення	0,050	0,051	0,051	0,050
	RSD <sub>x</sub> , %	1,03	1,08	1,02	1,11
–	RSD внутрішньо-лабораторної прецизійності, %	1,02	1,03	1,02	1,31
–	Відносна різниця середніх значень	0,001	0	0	0,001

Таблица 7. Результаты вивчення стабільності випробовуваних розчинів

Часова точка, в год	Кінцевий розчин порівняння				Модельна суміш, що містить 0,05 % енісаміуму йодиду, порівняно з концентрацією енісаміуму йодиду в розчині випробування
	Площі піків, mAU × min				
	БА	ІНК	БАІНК	Енісаміуму йодид	Енісаміуму йодид
0	32,1	19,9	37,1	38499	19,4
6	32,0	20,0	37,5	38383	19,3
12	32,2	19,9	37,3	38309	19,2
24	32,1	20,1	37,2	38330	19,2
48	32,0	19,0	37,6	38380	19,3
RSD, %	0,26	2,24	0,56	0,19	0,43

Таблица 8. Результаты вивчення робастності

Умови, що змінюються		Результати вмісту домішок в модельній суміші (теоретичний вміст 0,05 % кожної)			Результати вмісту енісаміуму в модельній суміші (теоретичний вміст 0,05 %)
		БА	ІНК	БАІНК	Енісаміуму йодид
Швидкість потоку рухомої фази, в мл/хв	0,45	0,050	0,050	0,049	0,048
	0,50	0,050	0,048	0,050	0,050
	0,55	0,049	0,049	0,049	0,049
	RSD, %	1,16	2,04	1,17	2,04
Температура термостату колонки, в °C	25	0,050	0,050	0,050	0,049
	30	0,050	0,048	0,050	0,050
	35	0,049	0,048	0,049	0,048
	RSD, %	1,16	2,37	1,16	2,04
Склад рухомої фази: буферний розчин рН 2,5 : вода : ацетонітрил (об./об./об.)	28 : 44 : 28	0,050	0,050	0,049	0,051
	30 : 44 : 26	0,050	0,049	0,050	0,050
	32 : 44 : 24	0,049	0,049	0,049	0,049
	RSD, %	1,16	1,17	1,17	2,00
рН буферного розчину	рН 2,4	0,050	0,049	0,049	0,048
	рН 2,5	0,050	0,048	0,050	0,049
	рН 2,6	0,049	0,048	0,049	0,050
	RSD, %	1,16	1,19	1,17	2,04
Серійний номер хроматографічної колонки	B16099	0,049	0,048	0,050	0,050
	USYT001583	0,050	0,048	0,050	0,049
	RSD, %	1,43	0	0	1,43

У таблиці 8 наведено дані щодо робасності аналітичної методики.

Варіабельність площ піків аналітів для кожної з умов порівняно з початковими умовами становить не більше ніж 5 %. Отже, аналітичну методику можна вважати робасною.

Розрахунок сумарної невизначеності операції прободготовки виконали, виходячи з даних, що наведені в таблиці 9.

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для розчину порівняння:

$$\Delta Sp = \sqrt{0,1^2 + 0,12^2 + 0,12 + 0,12 + 0,25^2 + 1,23^2} = 1,28 \%$$

Розрахунок сумарної невизначеності  $\Delta Sp$  для випробовуваного розчину:

$$\Delta Sp = \sqrt{0,12^2 + 0,24^2 + 0,25^2} = 0,32 \%$$

Сумарна прогнозована невизначеність прободготовки становить:

$$\sqrt{1,28^2 + 0,32^2} = 1,32 \%$$

Невизначеність прободготовки не перевищує допустимий рівень, оскільки прийнятний рівень становить  $0,32 \times \Delta_{\text{tmp}} = 0,32 \times 5 = 1,6 \%$  ( $1,32 < 1,6$ ) [7].

Прогноз загальної невизначеності аналізу  $\Delta_{\text{As}}$  зробили за співвідношенням:

$$\Delta_{\text{As}} = \Delta_{\text{SP}}^2 + \Delta_{\text{FAO}}^2$$

$\Delta_{\text{SP}}$ : невизначеність прободготовки;  $\Delta_{\text{FAO}}$ : невизначеність кінцевої аналітичної операції (у цьому випадку – ВЕРХ).

$\Delta_{\text{FAO}}$  розраховується зі співвідношення:

$$\Delta_{\text{FAO}} = \sqrt{2} \times \frac{RSD_{\text{max}} \times t_{95\%, n-1}}{\sqrt{n}}$$

$\sqrt{2}$ : враховує наявність розчину порівняння та випробовуваного розчину;  $RSD_{\text{max}}$ : відносне стандартне відхилення (%), що описане у вимогах до придатності хроматографічної системи;  $t_{95\%, n-1}$ : однічний коефіцієнт Стьюдента для імовірності 95 %;  $n$ : число паралельних хроматограм.

Виходячи із даних RSD,  $\Delta_{\text{FAO}}$  становить:

$$\Delta_{\text{FAO}} = \sqrt{2} \times \frac{2,0 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 4,8 \%$$

Тоді  $\Delta_{\text{As}}$  дорівнює

$$\sqrt{1,32^2 + 4,8^2} = 4,9 \% < 5,0 \%$$

Отже, методика коректна та може бути відтворена в інших лабораторіях із необхідною точністю.

## Висновки

1. Для методики [4] встановлено ліміти детектування (БА = 0,001 %, ІНК = 0,001 %, БАІНК = 0,003 %, неідентифіковані домішки = 0,001 %) та ліміти кількісного визначення (БА = 0,003 %, ІНК = 0,004 %, БАІНК = 0,008 %, неідентифіковані домішки = 0,003 %).

2. Продемонстрована специфічність аналітичної методики, де забезпечено розділення домішок між собою та піками основного компонента.

Таблиця 9. Розрахунок невизначеності прободготовки

Операція	Дані для розрахунку	Невизначеність, %
Розчин порівняння		
Зважування стандартного зразка	з точністю до $\pm 0,0001$ г	0,1
Доведення до об'єму 100 мл	100 мл (3 колби)	0,12; 0,12; 0,12
Відбір аликвоти піпеткою Мора	10,0 мл	0,25
Відбір аликвоти піпеткою (проміжних розчинів домішок)	0,5 мл	1,23
Випробовуваний розчин		
Зважування випробовуваної субстанції	з точністю до $\pm 0,0001$ г	0,1
Доведення до об'єму 100 мл	100 мл (2 колби)	0,12; 0,12
Відбір аликвоти піпеткою Мора	10,0 мл	0,25

3. Коефіцієнти кореляції лінійної залежності ( $r$ ) між введеним і знайденими значеннями для домішок, які визначали, становлять  $>0,990$ , а відносні довірчі інтервали ( $\Delta_2$ ) знаходяться на рівні  $<5,0 \%$ .

4. Підтверджені такі валідаційні характеристики, як правильність, прецизійність і робасність.

5. Підтверджено стабільність випробовуваного розчину, розчину порівняння та розчину для перевірки придатності хроматографічної системи при їх зберіганні за кімнатної температури протягом 48 год.

6. Описана методика ВЕРХ визначення супровідних домішок може бути використана для контролю якості субстанції енісаміуму йодид.

## Подяка

Автори висловлюють подяку А. М. Стельмаху та В. Д. Корзуненку за плідну дискусію та цінні поради щодо статті.

**Конфлікт інтересів.** Автори статті є працівниками фармацевтичної компанії ПАТ «Фармак». Крім того, В. Маргітич є співавтором патенту Zhebrovska F., Margitych V., Kostyuk G., Syarkevych O., Vanat M. Alpha-crystalline form of carbabenzpyridine (2013) US Patent No. US 8,404,857 B2.

## Відомості про авторів:

Бурмака О. В., провідний інженер Центральної лабораторії фармацевтичної розробки, ПАТ «Фармак», м. Київ, Україна.  
Гуреєва С. М., д-р фарм. наук, начальник Центральної лабораторії фармацевтичної розробки ПАТ «Фармак», м. Київ, Україна.

Маргітич В. М., д-р мед. наук, головний науковий консультант ПАТ «Фармак», м. Київ, Україна.

## Сведения об авторах:

Бурмака А. В., ведущий инженер Центральной лаборатории фармацевтической разработки ПАО «Фармак», г. Киев, Украина.  
Гуреева С. Н., д-р фарм. наук, начальник Центральной лаборатории фармацевтической разработки ПАО «Фармак», г. Киев, Украина.

Маргитич В. М., д-р мед. наук, главный научный консультант ПАО «Фармак», г. Киев, Украина.

## Information about authors:

Burmaka O. V., Leading Engineer of the Central Laboratory of Pharmaceutical Development, Farmak JSC, Kyiv, Ukraine.  
Hureieva S. M., Dr.hab., Head of the Central Laboratory of Pharmaceutical Development, Farmak JSC, Kyiv, Ukraine.  
Marhitych V. M., MD, PhD, DSci, Chief Scientific Advisor, Farmak JSC, Kyiv, Ukraine.

Надійшла до редакції / Received: 08.02.2018

Після доопрацювання / Revised: 12.02.2018

Прийнято до друку / Accepted: 15.02.2018



## Список літератури

- [1] European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014 – respiratory tract infections. Stockholm: ECDC; 2014. Retrieved from: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/Respiratory-tract-infections-annual-epidemiological-report-2014.pdf>.
- [2] Antiviral activity of enisamium against influenza viruses in differentiated normal human bronchial epithelial cells / D. Boltz, X. Peng, M. Muzzio, et al. // The 3rd Antivirals Congress (12–14 October 2014). – Amsterdam, 2014. – P. 46.
- [3] Antiviral Effect of a Derivative of Isonicotinic Acid Enisamium Iodide (FAV00A) Against Influenza Virus / D. Boltz, D. Cocking, J. Cinatl, et al. // The 5th ISIRV AVG Conference (14–16 June 2017). – Shanghai, 2017. – P. 56.
- [4] Бурмака А.В. Разработка методики контроля сопутствующих примесей субстанции энисамиума йодида / А.В. Бурмака, С.Н. Гуреева, В.М. Маргитич // Фармаком. – 2017. – №3. – С. 17–25.
- [5] Validation of analytical procedures: text and methodology / ICH Expert Working Group. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2 (R1), Step 4 version. – Guideline of European Medicines Agency. – London, 1995. – 13 p.
- [6] Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – X. : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – С. 891–893.
- [7] Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – X. : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – С. 924–925.

## References

- [1] (2014) European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014 – respiratory tract infections. Stockholm: ECDC. Retrieved from: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/Respiratory-tract-infections-annual-epidemiological-report-2014.pdf>.
- [2] Boltz, D., Peng, X., Muzzio, M., Dash, P., Thomas, P., Mehta, R., & Margitich, V. (2014) Antiviral activity of enisamium against influenza viruses in differentiated normal human bronchial epithelial cells. *Proceedings of the 3rd Antivirals Congress*, (P. 46). Amsterdam.
- [3] Boltz, D., Cocking, D., Cinatl, J., Peng, X., Jonson, W., Muzzio, M., et al. (2017) Antiviral Effect of a Derivative of Isonicotinic Acid Enisamium Iodide (FAV00A) Against Influenza Virus. *Proceedings of the 5th ISIRV AVG Conference*. (P. 56). Shanghai.
- [4] Burmaka, A. V., Gureeva, S. N., & Margitich, V. M. (2017). Razrabotka metodiki kontrolya soputstvuyushchikh primesej substancii e'nisami-uma yodida [Development of HPLC method for the determination of related substances in API enisamium iodide]. *Farmakom*, 3, 17–25. [in Russian].
- [5] ICH Expert Working Group. (1995). *Validation of analytical procedures: text and methodology*. London.
- [6] Derzhavne pidpriemstvo «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv» (2015). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]*. (Vol. 1). (P. 891–893). Kharkiv. [in Ukrainian].
- [7] Derzhavne pidpriemstvo «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv» (2015). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]*. (Vol. 1). (P. 924–925). Kharkiv. [in Ukrainian].