

УДК 543.544.5.068.7:543.612:547.857.8:547.735

О. В. ТКАЧЕНКО, С. М. ГУБАРЬ

*Національний фармацевтичний університет*

## РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КОНТРОЛЮ СУПРОВІДНИХ ДОМІШОК У СУБСТАНЦІЇ 4-ОКСО-2-ТІОКСО-1,4-ДИГІДРОТІЄНО[3,2-*d*]ПІРИМІДИН-3-ПРОПАНОВОЇ КИСЛОТИ

*Розроблено методику визначення супровідних домішок у субстанції 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідротієно[3,2-*d*]піримідин-3-пропанова кислота. Вивчено хроматографічний профіль домішок вперше синтезованого похідного 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідротієно[3,2-*d*]піримідин-3-пропанова кислота в умовах оберненофазового варіанту методу високоефективної рідинної хроматографії. Проведено валідацію розробленої методики.*

*Ключові слова:* похідні тієно[3,2-*d*]піримідину; метод ВЕРХ; валідація

### ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Як об'єкт дослідження була обрана нова субстанція 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідротієно[3,2-*d*]піримідин-3-пропанова кислота, яка здатна достовірно пригнічувати функціональну активність ЦНС за рахунок зниження дослідницької та емоційної активності на тлі збереження як локомоторної, так і вертикальної рухової активності, що дозволяє запропонувати субстанцію для виробництва нового ефективного психотропного препарату.

Контроль чистоти субстанції для фармацевтичного застосування є необхідною частиною вимог до субстанцій на стадії фармацевтичної розробки [5] та актуальною задачею при створенні нових активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ).

### АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Основним документом, який регламентує вимоги до показників, за якими контролюється якість АФІ, є Державна фармакопея України (ДФУ) [2]. Всі аналітичні методики, що входять до аналітичної нормативної документації (АНД) на фармацевтичну субстанцію або готову лікарську форму, мають бути валідовані. Це забезпечує одержання правильних результатів досліджень з необхідною прецизійністю [2, 3]. Речовина 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідротієно[3,2-*d*]піримідин-3-пропанова кислота є новою, а методики контролю супровідних домішок в АФІ та їх валідація в літературі не описані.

### ВИДІЛЕННЯ НЕ ВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ

Згідно з методикою синтезу в субстанції можуть бути присутні домішка А (домішка синтезу), домішка В (домішка розкладання субстанції 1) та домішка С (домішка розкладання субстанції 2) (табл. 1).

Для хроматографічного аналізу гетероциклічних сполук найбільш прийнятним є оберненофазовий варіант методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [4]. Тому дослідження домішок у субстанції було запропоновано проводити методом ВЕРХ, так як за допомогою даного селективного методу можна контролювати напівпродукти і побічні продукти (домішки синтезу), а також продукти розкладання (домішки розкладання). Відповідно до вимог ДФУ для підтвердження відповідності методики визначення супровідних домішок у субстанції методом ВЕРХ критеріям прийнятності необхідно проводити валідаційні дослідження з визначення її специфічності і межі виявлення [2].

### ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

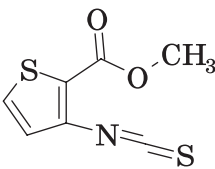
Метою роботи була розробка та валідація методики визначення супровідних домішок у новій субстанції 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідротієно[3,2-*d*]піримідин-3-пропанової кислоти методом ВЕРХ.

### ВИКЛАДЕННЯ ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

Розробку методики визначення супровідних домішок в АФІ проводили методом ВЕРХ на рі-

Таблиця 1

**ДОМІШКИ СУБСТАНЦІЇ 4-ОКСО-2-ТІОКСО-  
1,4-ДИГІДРОТІЕНО[3,2-*d*]ПРИМІДИН-  
3-ПРОПАНОВОЇ КИСЛОТИ**

Домішка А (домішка синтезу)	
Домішка В (домішка розкладання субстанції 1)	(неідентифікована)
Домішка С (домішка розкладання субстанції 2)	(неідентифікована)

динному хроматографі Varian ProStar (США) за таких умов: колонка розміром 150 см × 4,6 см заповнена силікагелем *октадецилсилільним для хроматографії Р* з розміром часток 3,5 мкм; швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв; температура колонки – 35°C; детектування за довжини хвилі – 210 нм; об'єм інжекції – 20 мкл; рухома фаза А – вода – трифторооцтова кислота (999:1, об/об); рухома фаза В – ацетонітрил – трифторооцтова кислота (999:1, об/об); співвідношення рухомих фаз А : В – (90 : 10). Було досягнуто повне розділення компонентів модельної суміші основної речовини та домішок.

На підставі отриманих експериментальних даних розділення введено до проекту МКЯ в наступній редакції.

«Супровідні домішки.

Визначення проводять методом рідинної хроматографії [2].

*Випробовуваний розчин.* Близько 25 мг субстанції поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 30 мл *метанолу Р*, перемішують та доводять до позначки тим самим розчинником.

*Розчин порівняння.* 1 мл випробовуваного розчину поміщають у колбу місткістю 100,0 мл, доводять *метанолом Р* до позначки та перемішують.

*Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи.* 10 мл випробовуваного розчину поміщають у конічну колбу, додають 1 мл 0,1 М *розчину кислоти хлористоводневої* та кип'ятять на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хвилин. До розчину додають розчин натрію гідроксиду, розведений до рН 7 за універсальним індикатором.

Перед хроматографуванням *випробовуваний розчин, розчини порівняння та розчин для перевірки придатності хроматографічної системи* фільтрують крізь мембранні фільтри з розміром пор не більше 0,45 мкм. Розчини використовують свіжоприготованими.

Послідовно хроматографують розчинник (отримують бланк-хроматограму) та *розчин для перевірки придатності хроматографічної системи* (не менше 2 разів).

Хроматографічна система вважається придатною, якщо на хроматограмі *розчину для перевірки придатності хроматографічної системи* ступінь розділення  $R_s$  між піками домішки розкладання 2 та випробовуваної речовини складає не менше 2. Хроматографують розчин порівняння та випробовуваний розчин, отримуючи не менше 2 хроматограм. Час утримування відносно основної речовини (час утримування – близько 3 хв)

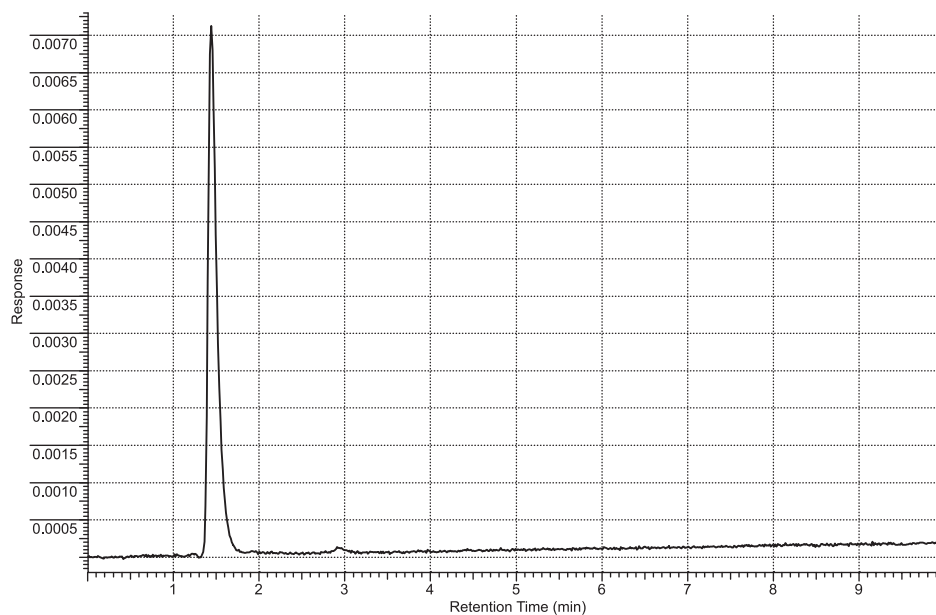


Рис. 1. Хроматограма бланк-розчину

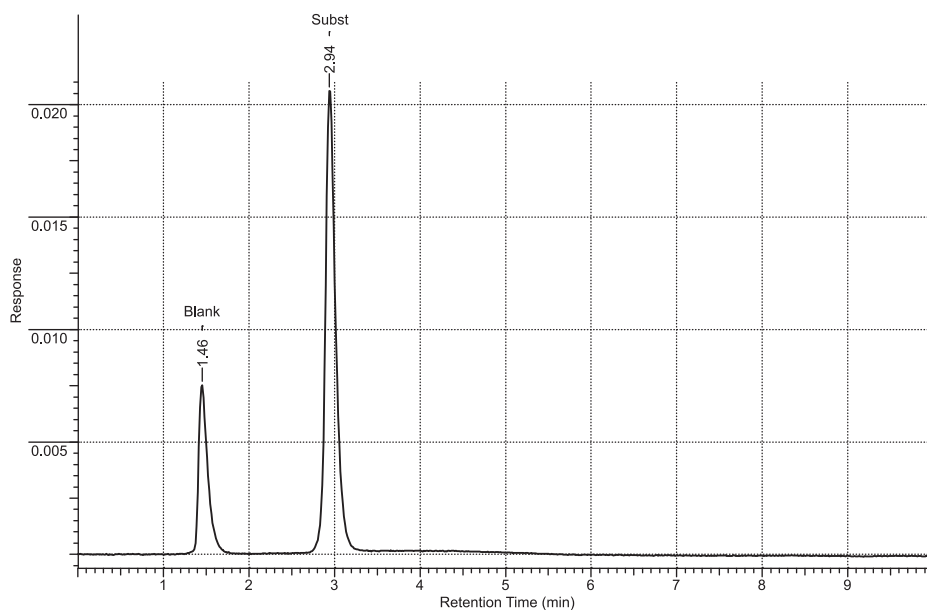


Рис. 2. Хроматограма розчину порівняння

складає для домішки А близько 1,8, для домішки В – близько 0,65, для домішки С – близько 0,72.

*Нормування:* на хроматограмі випробовуваного розчину площа домішки А, домішки В, домішки С не повинна перевищувати 0,5 площі основного піку на хроматограмі розчину порівняння (0,5 %); площа жодної іншої домішки повинна перевищувати 0,2 площі основного піку на хроматограмі розчину порівняння (0,2 %). Сума площ

піків усіх домішок не повинна перевищувати площі основного піку на хроматограмі розчину порівняння (1,0 %). Піки, площа яких становить менше, ніж 0,1 площі піку на хроматограмі розчину порівняння (0,1 %), не враховують».

Для підтвердження відповідності методики визначення супровідних домішок у субстанції методом ВЕРХ критеріям прийнятності було проведено її валідацію. Обов'язковими валідаційни-

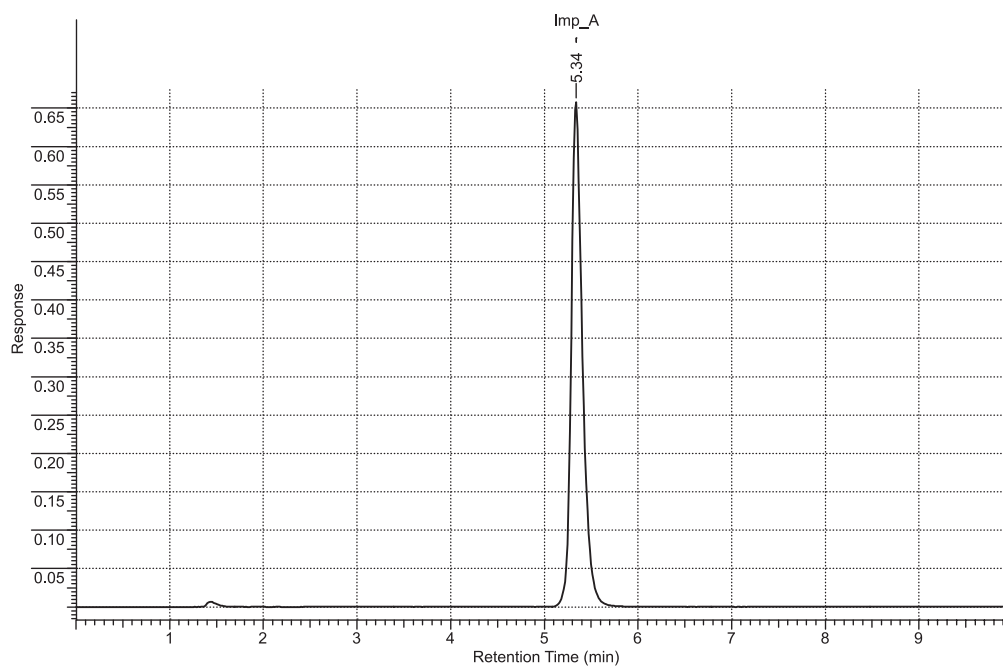


Рис. 3. Хроматограма модельного розчину домішки А

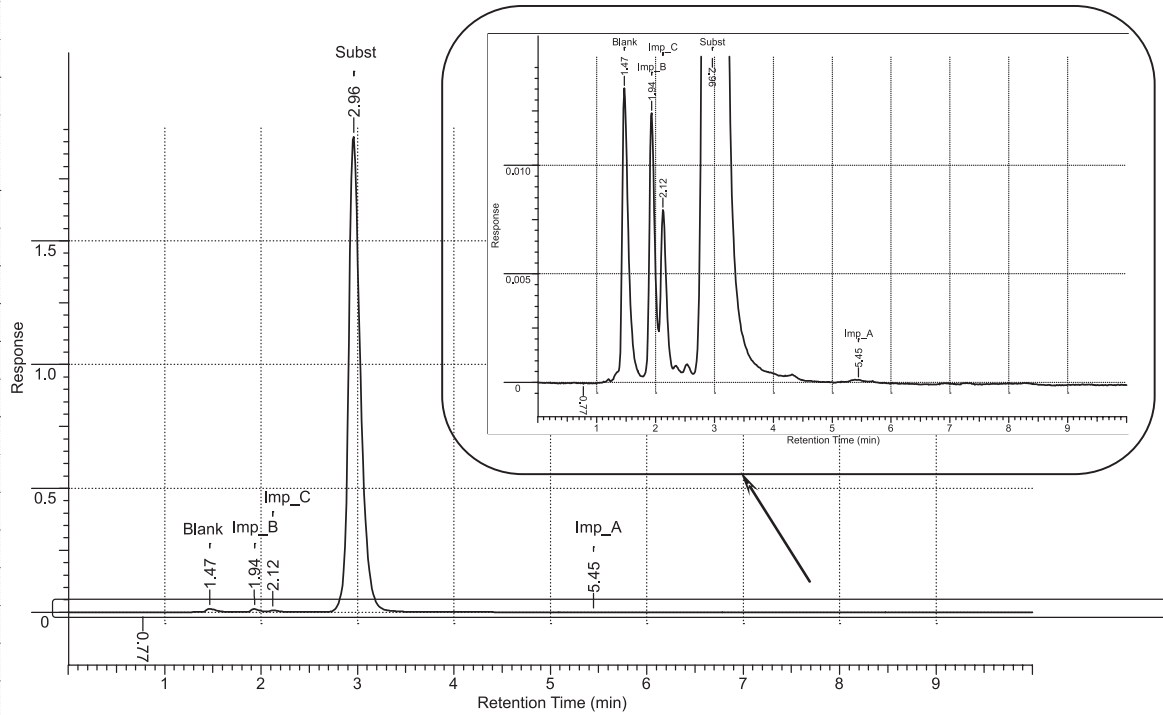


Рис. 4. Хроматограма випробовуваного розчину

ми характеристиками випробування на граничний вміст для контролю домішок згідно з [5] є специфічність та межа виявлення.

Специфічність – це здатність методики достовірно визначити аналізовану речовину в присутності компонентів, які можуть бути в пробі (домішки, продукти розкладання, плацебо тощо). Для визначення специфічності були приготувані наступні розчини: бланк-розчин (розчинник), випробуваний розчин, модельні розчини домішок, розчин порівняння. Хроматограми розчинів представлені на рис. 1-5.

Порівняння хроматограм свідчить, що в умовах методики визначення домішок не заважають ні розчинник, ні рухома фаза, ні основна речовина.

Ми можемо вважати специфічність доведеною.

Вимоги тесту для перевірки придатності хроматографічної системи наведені в табл. 2. Хроматограма розчину для перевірки придатності хроматографічної системи наведена на рис. 5.

Межа виявлення (МВ) є достатньою для аналізу за МКК і значимо не впливає на прийняття рішень про якість для граничних випробувань,

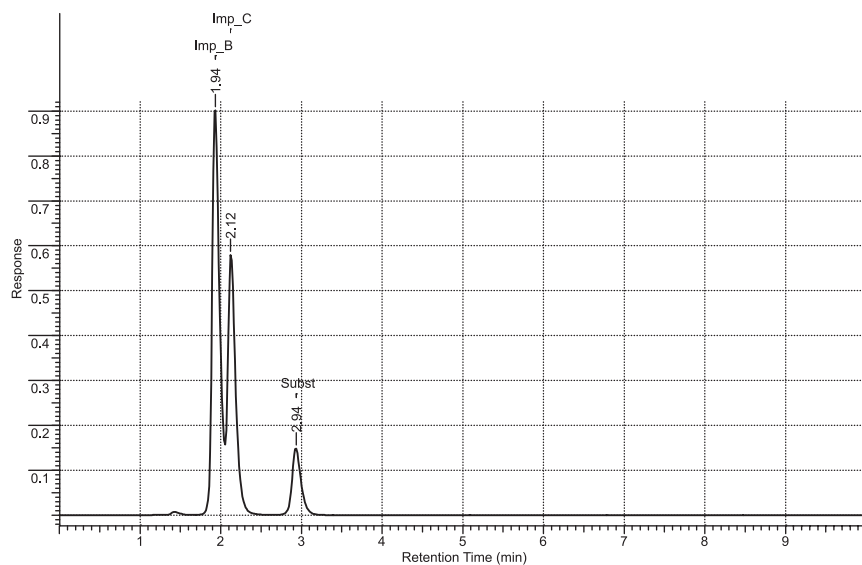


Рис. 5. Хроматограма розчину для перевірки придатності хроматографічної системи

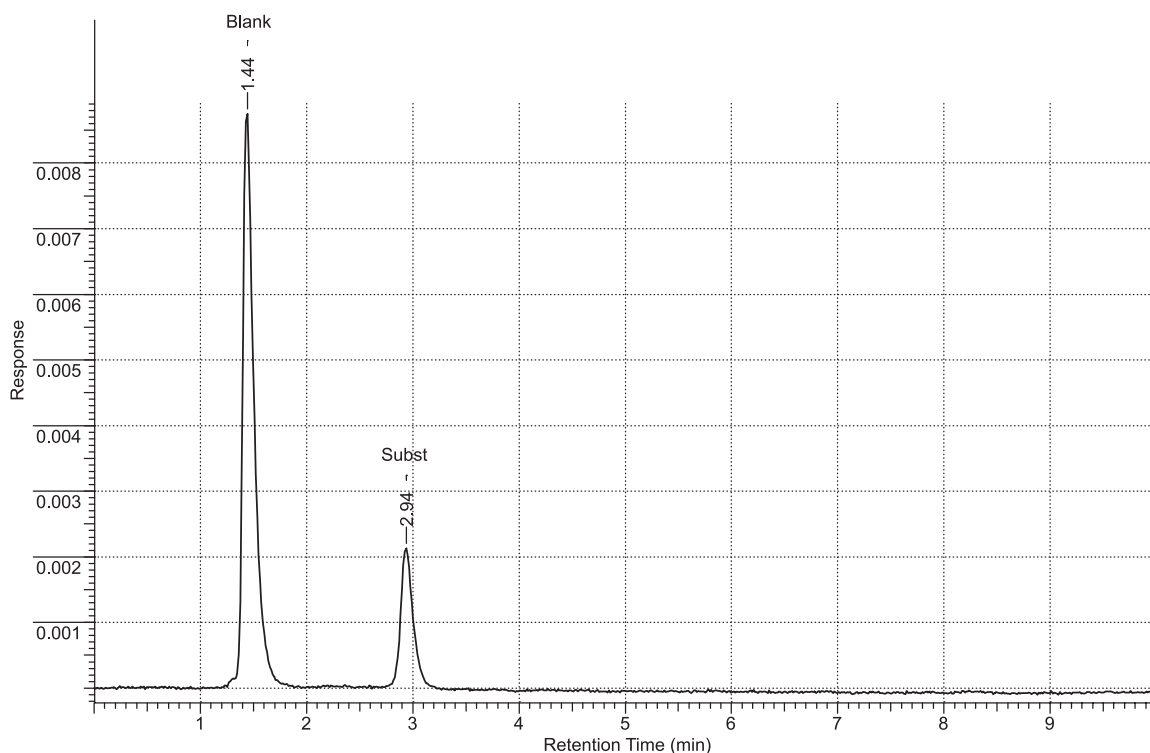


Рис. 6. Хроматограма розчину для визначення межі виявлення

Таблиця 2

**ВИКОНАННЯ ТЕСТУ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ  
ХРОМАТОГРАФІЧНОЇ СИСТЕМИ**

Параметр	Вимоги	Знайдено
Ступінь розділення $R_s$ між піками домішки С та випробовуваної речовини на хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи	не менше 2	2,8

якщо вона є незначущою у порівнянні з граничним за МКК вмістом домішки ІмL [1]:

$$MB \leq \max MB = 0,32 * ImL \text{ (або } 32 \% \text{ от } ImL).$$

Максимальний вміст одиначної домішки в субстанції відповідно до методики визначення повинен бути не більше 0,5 %.

$$MB = 0,32 * 0,5 \% = 0,16 \% \text{ від вмісту субстанції.}$$

В умовах методики концентрація випробовуваного розчину щодо субстанції становить близько 0,25 мг/мл. Таким чином, розрахунковий  $MB_{\text{imp}} \leq 0,16 \% * 0,25 = 0,0004 \text{ мг/мл} \approx 0,4 \text{ мкг/мл}$ .

Для визначення межі виявлення використано співвідношення сигнал/шум. Для визначення співвідношення сигнал/шум порівнюють величини сигналів, отриманих для контрольного експерименту (бланк-розчин) і для зразків з низькими концентраціями сполуки, що визначається.

Хроматограма розведеного розчину (0,25 мкг/мл) наведена на рис. 6.

Визначено, що межа виявлення складає значно менше 0,25 мкг/мл, що задовольняє критеріям прийнятності.

Таким чином, усі параметри відповідають необхідним критеріям прийнятності. Метод вважається валідованим і може бути використаний для визначення супровідних домішок у субстанції методом ВЕРХ згідно з проектом МКЯ.

**ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ  
ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**

1. Розроблено методику визначення супровідних домішок нової субстанції 4-оксо-2-тіоксо-1,4-дигідротієно[3,2-d]піримідин-3-пропанової кислоти.
2. Визначені валідаційні характеристики та експериментально підтверджено їх відповідність необхідним критеріям прийнятності.
3. Результати проведених досліджень свідчать про те, що розроблена методика відповідає сучасним вимогам до аналітичних методик на граничний вміст домішок і дозволяє однозначно характеризувати вміст домішок у новому АФІ.

**ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ  
ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ**

1. Гризодуб О. І. Стандартизована процедура валідації методик кількісного визначення лікар-

- ських засобів методом стандарту / [О. І. Гризодуб, Д. А. Леонтьев, Т. М. Доценко та ін.] // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 3-17.
2. Державна фармакопея України. Т. 1. – 2-е вид. – Х.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – 1130 с.
  3. Настанова СТ-Н МОЗ У 42 4.0:2016 «Лікарські засоби. Належна виробнича практика» / [М. Ляпунов, О. Безугла, Н. Тахтаулова та ін.]. – К. : МОЗ України, 2016. – 335 с.
  4. Соловова Н. В. Жидкостная хроматография некоторых производных пятичленных гетероциклов / Н. В. Соловова, С. В. Курбатова, З. П. Белоусова, Д. М. Осокин // Вестник СамГУ. Естественнонаучная серия. – 2002. – № 4 (26). – С. 113-119.
  5. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (ICH Q2). Step 5. Note for guidance on validation of analytical procedures: text and methodology. CPMP/ICH/381/95 – ICH Q2 (R1). – London : EMEA, 1995. – 15 p.

**УДК 543.544.5.068.7:543.612:547.857.8:547.735****Е. В. Ткаченко, С. Н. Губарь****РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОНТРОЛЯ СОПУТСТВУЮЩИХ ПРИМЕСЕЙ В СУБСТАНЦИИ 4-ОКСО-2-ТИОКСО-1,4-ДИГИДРОТИЕНО[3,2-*d*]ПИРИМИДИН-3-ПРОПАНОВОЙ КИСЛОТЫ**

Разработана методика определения сопутствующих примесей в субстанции 4-оксо-2-тиоксо-1,4-дигидротieno-[3,2-*d*]пиримидин-3-пропановая кислота. Изучен хроматографический профиль примесей впервые синтезированного производного тieno[3,2-*d*]пиримидина в условиях обращенно-фазового варианта метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проведена валидация разработанной методики.

*Ключевые слова:* производные тieno[3,2-*d*]пиримидина; метод ВЭЖХ; валидация

**UDC 543.544.5.068.7:543.612:547.857.8:547.735****O. V. Tkachenko, S. M. Gubar****DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD OF CONTROL RELATED SUBSTANCES IN THE SUBSTANCES 4-OXO-2-THIOXO-1,4-DIHYDROTHIENO[3,2-*d*]PYRIMIDIN-3-PROPANOIC ACID**

A HPLC method for related substances of and 4-oxo-2-thioxo-1,4-dihydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-3-propanoic acid determination was developed. The impurities of newly synthesized derivative of thieno[3,2-*d*]pyrimidine chromatographic profile was studied using reversed-phase HPLC. The created HPLC methodic was validated.

*Key words:* thieno[3,2-*d*]pyrimidine; HPLC; validation

*Адреса для листування:*

61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.

Тел. (0572) 68-56-71.

E-mail: elenatkachenko@nuph.edu.ua;

labcq@nuph.edu.ua.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 04.10.2016 р.