

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

ЧОРНИЙ ВАСИЛЬ АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК 543.544.5.068.7:543.544.3:001.891:615.451.3

**РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ
ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ З БЕНЗИДАМІНУ ГІДРОХЛОРИДОМ З
ПОЗИЦІЙ "ЗЕЛЕНОЇ ХІМІЇ"**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук**

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Дисертаційна робота виконана в Національному фармацевтичному університеті Міністерства охорони здоров'я України.

Науковий керівник: доктор фармацевтичних наук, професор,
ГЕОРГІЯНЦЬ ВІКТОРІЯ АКОПІВНА
Національний фармацевтичний університет,
завідувачка кафедри фармацевтичної хімії.

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, професор,
ГРИЗОДУБ ОЛЕКСАНДР ІВАНОВИЧ
Директор ДП «Український науковий
фармакопейний центр якості лікарських засобів»,
Завідувач відділу Державної фармакопеї України,
м. Харків;

доктор фармацевтичних наук, професор,
ВАСЮК СВІТЛАНА ОЛЕКСАНДРІВНА
Запорізький державний медичний університет,
завідувачка кафедри аналітичної хімії.

Захист відбудеться « 22 » квітня 2021 року о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий « 20 » березня 2021 р.

В.о. вченого секретаря
спеціалізованої вченої ради, професор

О.А. Рубан

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Розширення фармацевтичної галузі у світі є реальністю сьогодення, що ґрунтується на щоденних викликах і дедалі більшій потребі в лікарських засобах. Це означає зростання конкуренції на ринку виробництва препаратів та субстанцій, а як результат – підвищення вимог до якості препаратів, що своєю чергою відбивається на кількості експериментів, які проводять під час фармацевтичної розробки, та рутинного контролю в процесі виробництва. Унаслідок цього збільшуються ризики негативного впливу виробництва лікарських засобів на навколишнє середовище та виробничий персонал, що є причиною стурбованості підприємств «великої фарми».

Для виявлення балансу між вимогами до якості та збереженням навколишнього середовища головним трендом фармацевтичних виробників є використання принципів «зеленої хімії», які в розрізі контрольних лабораторій передбачають переважно мінімізацію часу, дій та операцій контролерів якості, уникнення або зменшення контакту зі шкідливими речовинами, заощадження енергетичних витрат. Викладені питання до якості та «зеленого» підходу означають необхідність застосування нових підходів до розробки аналітичних методик, їх валідацію та управління подальшим життєвим циклом.

Використання «зеленої хімії» у розробці аналітичних методик розпочалось відносно недавно, а спрямовано його переважно на такі об'єкти, як персонал, зразки, реагенти, обладнання, методи та відходи. Основні для синтетичної «зеленої хімії» (Anastas, 1998) аналітичні процедури використовують 4 принципи – забезпечення мінімізації відходів, використання безпечних розчинників та допоміжних реагентів, дизайн енергетичної ефективності та уникнення дериватизації, а також специфічні для аналітичних досліджень підходи (Tobiszewski M., 2010, Gałuszka A. 2013, 2019, M. de la Guardia 2020).

Сучасні підходи до фармацевтичної розробки передбачають імплементацію концепції «Quality by design», що не тільки охоплює коректні методики стандартизації з погляду забезпечення якості лікарських засобів, але й ураховує сучасні вимоги до цих методик відповідно до принципів «зеленої хімії».

На фармацевтичному ринку України однією з відносно нових, але ефективних, є лікарська форма «оромукозні спреї», що наразі є вельми популярною і на ринках країн ЄС. Фармацевтичну розробку оромуюкозних спреїв, що містять бензидаміну гідрохлорид, внесено до плану наукових досліджень АТ «Фармак». Оскільки стратегія розвитку підприємства є екоспрямованою, логічно, що і як власне виробництво, так і аналіз субстанцій та лікарських форм мають бути максимально «зеленими». З огляду на вищенаведене актуальним завданням наукового дослідження визначено формулювання підходів до розробки аналітичних методик та безпосередньо розробку методик контролю якості лікарських форм з бензидаміну гідрохлоридом.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертацію виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт НФаУ за темою «Розробка та валідація методів контролю якості лікарських засобів аптечного і промислового виробництва» (№ державної реєстрації НДР: 0114U000949). Робота є частиною наукових досліджень, здійснюваних у рамках співпраці АТ «Фармак» та Національного фармацевтичного університету в напрямі розробки нових лікарських засобів, кваліфікації аналітичних методів та підходів до фармацевтичної розробки.

Мета і завдання дослідження

Метою роботи було обґрунтування вибору, розробка та валідація методик контролю якості оромукозних спреїв, що містять бензидаміну гідрохлорид, з погляду «зеленої хімії».

Для досягнення визначеної мети необхідно було розв'язати такі завдання:

- провести моніторинг сучасного ринку препаратів на основі бензидаміну гідрохлориду, розглянути літературні дані щодо методів аналізу цих препаратів та оцінити їх з погляду «зеленої хімії»;
- сформулювати підходи до вибору методик контролю якості бензидаміну гідрохлориду з урахуванням принципів «зеленої хімії»;
- розробити методику визначення супровідних домішок бензидаміну гідрохлориду в готовій лікарській формі;
- розробити методику ідентифікації бензидаміну гідрохлориду та його метаболіту в присутності інших НПЗЗ для цілей судово-хімічного аналізу;
- розробити методику визначення залишкових кількостей бензидаміну гідрохлориду на поверхні технологічного обладнання;
- розробити методики одночасного кількісного визначення АФІ та допоміжних речовин у спреї та розчині бензидаміну гідрохлориду, що відповідатиме вимогам «зеленої хімії»;
- дослідити якість ефірної олії різних виробників на вміст основного маркеру з метою вибору постачальника для комбінованої лікарської форми;
- обґрунтувати та розробити методику одночасного визначення АФІ та допоміжних речовин у комбінованій лікарській формі.

Об'єкт дослідження.

Методологія розробки та валідації хроматографічних методів контролю якості з використанням підходів «зеленої хімії».

Предмет дослідження.

Розробка та валідація методик контролю якості лікарських засобів з бензидаміну гідрохлоридом – оромукозного спрею, розчину, комбінованого лікарського засобу, розробка методики визначення залишкових кількостей бензидаміну гідрохлориду на поверхні технологічного обладнання, обґрунтування використання підходів «зеленої хімії» до фармацевтичної розробки та рутинного аналізу лікарських препаратів з бензидаміну гідрохлоридом.

Методи дослідження

Для реалізації проекту та розв'язання окреслених завдань було використано методи вискоефективної рідинної хроматографії, газової

хроматографії та УФ-спектрофотометрії, а також процедуру валідації методів за вимогами ДФУ та ІСН Q2.

Наукова новизна отриманих результатів

Шляхом узагальнення та імплементації принципів «зеленої хімії» запропоновано авторське «дерево рішень» для вибору «зеленої» методики аналізу та надано обґрунтування його застосування для вибору методик контролю якості лікарських форм з бензидаміну гідрохлоридом.

Автором розроблено методику визначення супровідних домішок препарату на основі бензидаміну гідрохлориду, проведено вивчення примусової деградації та визначено потенційні продукти деградації. Методику визначення супровідної домішки бензидаміну N-оксиду, що одночасно є основним метаболітом, покладено в основу ідентифікації бензидаміну гідрохлориду та його метаболіту в присутності НПЗЗ (пат. України на корисну модель № 142803).

Розроблено оригінальну методику одночасного визначення АФІ (бензидаміну гідрохлориду) та антимікробного консерванта (метилпарагідроксибензоату) методом рідинної хроматографії. У рамках імплементації підходу «зеленої хімії» запропоновано також оригінальну методику визначення цих компонентів методом газової хроматографії.

Доведено, що введення ефірної олії м'яти перцевої сприяє посиленню антибактеріальних властивостей бензидаміну гідрохлориду, на основі чого запропоновано оригінальний комбінований оромукозний спрей. Розроблено оригінальну методику одночасного визначення інгредієнтів розробленої лікарської форми методом газової хроматографії.

Практичне значення отриманих результатів

За результатами проведених досліджень теоретично обґрунтовано «дерево рішень», що має практичне значення як алгоритм для вибору «зелених» методик контролю якості під час фармацевтичної розробки.

Розроблені методики контролю якості бензидаміну гідрохлориду та його супутніх домішок можуть бути використані в рутинному фармацевтичному та судово-хімічному аналізі. Результати досліджень з розробки та валідації методик контролю якості лікарських препаратів з бензидаміну внесено до відповідних реєстраційних досьє (модуль 3 Якість) АТ «Фармак».

Результати наукових досліджень впроваджено в науково-практичну діяльність кафедри фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету; кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; кафедри фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова; кафедри фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії Київського національного медичного університету ім. О. О. Богомольця.

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота є самостійною науковою завершеною працею. Постановку мети та методологію досліджень сформульовано разом із науковим керівником.

Наукові роботи опубліковано в співавторстві з В. А. Георгіянц, С. М. Гурєвою, О. В. Чорною, І. О. Журавель, Г. С. Абдуллаєвою, О. В. Чубенко, В. М. Кушнірук, Ю. М. Гончаровою. Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведено дослідження. За результатами досліджень, над якими працювали співавтори наукових публікацій, особисто дисертантом проведено інформаційний пошук та аналіз літературних даних за темою дисертації, аналіз стану українського ринку бензидаміну гідрохлориду; розроблено підхід до вибору методів аналізу препарату на основі бензидаміну гідрохлориду з погляду «зеленої хімії»; розроблено та валідовано методику визначення супровідних домішок бензидаміну гідрохлориду в готовій лікарській формі методом ВЕРХ; розроблено та валідовано методику кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом ВЕРХ; розроблено та валідовано методику визначення залишкових кількостей бензидаміну на поверхні технологічного обладнання; розроблено та валідовано методику кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом газової хроматографії; здійснено аналіз ефірних олій м'яти перцевої різних виробників на вміст ментолу; розроблено та валідовано методику одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену і ментолу в оромукозній лікарській формі. Експериментальні дослідження з розробки аналітичних методик, наведені в роботі, проводили на базі лабораторії розробки (м. Харків) відділу технологічної розробки АТ «Фармак» за сприяння начальника відділу д-ра фарм. наук С. М. Гурєвої.

У наукових працях за співавторства здобувача йому належить творчий доробок та наведені в дисертації результати експериментальних досліджень.

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: II Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Аналітична хімія у фармації» (м. Харків, 17 березня 2016 р.); VIII Національний з'їзд фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (м. Харків, 13-16 вересня 2016 р.); XI науково-практична конференція з міжнародною участю «Управління якістю в фармації» (м. Харків, 19 травня 2017 р.); VI науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології» (м. Харків, 13 жовтня 2017 р.).

Публікації

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових робіт, у тому числі 7 статей у вітчизняних та зарубіжних наукових фахових виданнях, з яких 1 стаття в іноземному виданні, індексованому базою даних Scopus, 1 патент України на корисну модель та 4 тези доповідей на міжнародних науково-практичних конференціях.

Обсяг і структура дисертації

Дисертаційна робота, викладена на 185 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 4 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 3 додатків. Обсяг основного тексту дисертації становить 114 сторінок друкованого тексту. Роботу ілюстровано 50 таблицями та 27 рисунками. Список використаних джерел містить 172 найменування, з них 69 кирилицею та 102 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** дисертаційної роботи обґрунтовано актуальність теми, вибір об'єктів дослідження, сформульовано мету й завдання, об'єкти й методи досліджень, визначено наукову новизну й практичне значення одержаних результатів, наведено відомості щодо впровадження результатів дисертаційної роботи.

Розділ 1. Сучасний стан створення оромукозних лікарських засобів (огляд літератури).

У розділі детально описано переваги препаратів у вигляді оромукозних спреїв та їх поширення на території України. Наведено аналіз ринку України та визначено, що оромукозні спреї становлять приблизно 3 % і представлені переважно ЛЗ зарубіжного виробництва.

Розглянуто властивості Бензидаміну гідрохлориду, його терапевтичний ефект, наведено перелік препаратів, до яких входить зазначена діюча речовина. Надано інформацію щодо схеми синтезу молекули, методів контролю якості субстанції. Описано потенційні домішки, які можуть утворюватися в процесі синтезу. Проведено оцінку методів дослідження бензидаміну гідрохлориду, як у вигляді субстанції, так і у вигляді готового ЛЗ. У більшості випадків, описаних у літературі, аналітичні процедури визначення бензидаміну та його споріднених домішок базуються саме на методі ОФ ВЕРХ з використанням октадецилсилільнольної фази і УФ-детектування. Проте метод ВЕРХ, незважаючи на певну універсальність, має низку недоліків, пов'язаних з проблемами забруднення навколишнього середовища.

В огляді також наведено основні принципи «зеленої хімії», імплементацію загальних підходів до використання в аналітичних лабораторіях та шляхи оптимізації методів з метою покращення впливу на навколишнє середовище.

Розділ 2. Обґрунтування загальних підходів до вибору методології дослідження, матеріали та методи досліджень.

Протягом багатьох років трендом стандартизації субстанцій та лікарських форм було використання хроматографічних методів, особливо широко застосовували метод ВЕРХ. Маючи беззаперечні переваги, цей метод має низку недоліків з погляду «зеленої хімії» – використання токсичних розчинників, досить велика кількість відходів, енергетичні затрати тощо. Для обґрунтування методології наукових досліджень розглянуто фактори, що впливають на

відповідність аналітичних методик (зокрема і хроматографічних) принципам «зеленої хімії». Під час формування алгоритму вибору методики враховували такі параметри: порівняльна оцінка токсичності розчинників, витрати ресурсів, розчинників та реагентів. Визначено, що за своєю «зеленістю» фізико-хімічні методи, які найчастіше використовують у фармацевтичному аналізі, можна розташувати в ряд УФ-ВЕРХ-УВЕРХ-ГХ. За результатами узагальнення наведених факторів запропоновано «дерево рішень» для вибору аналітичних методик з позицій принципів «зеленої хімії» (рис. 1).

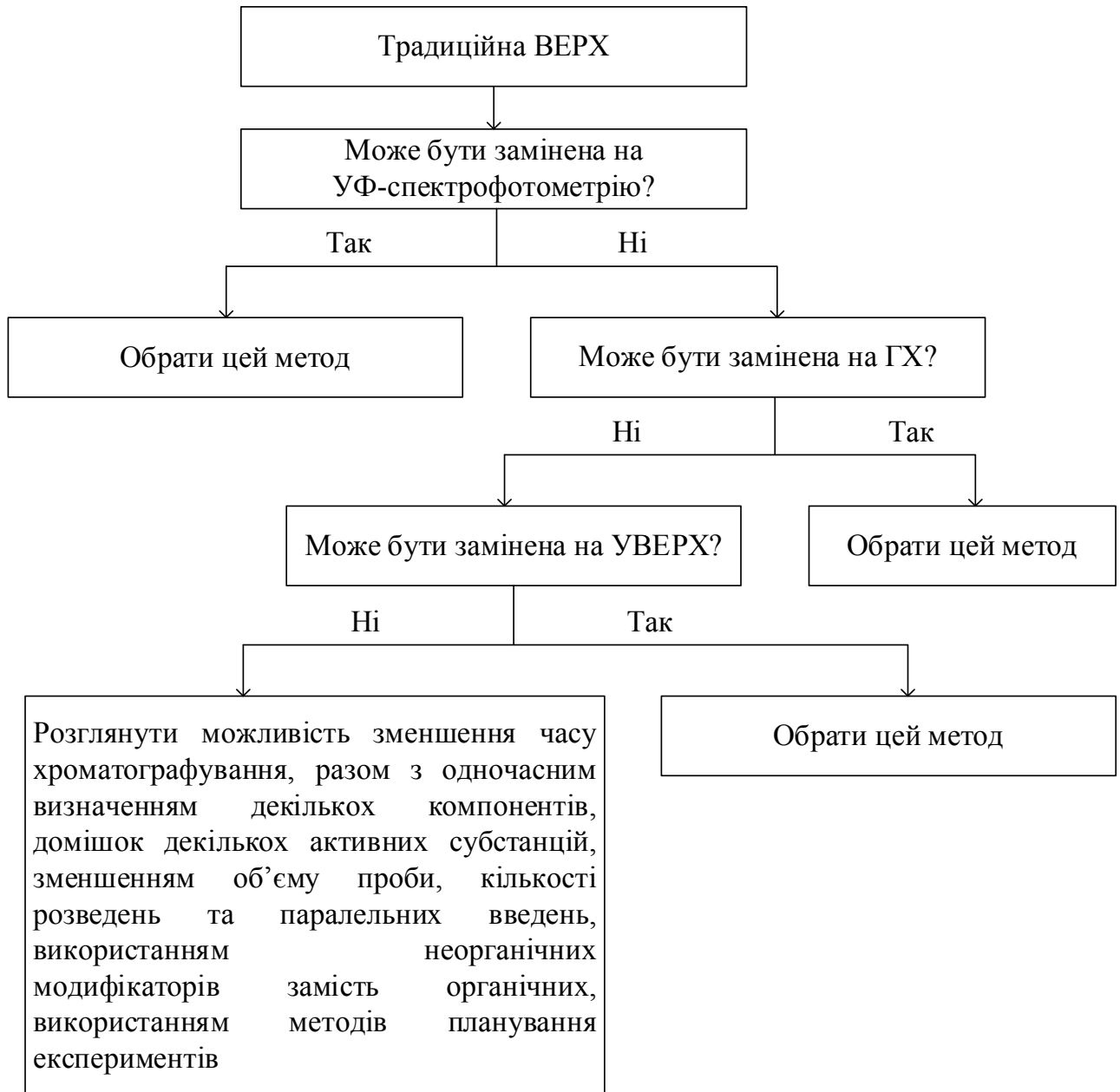
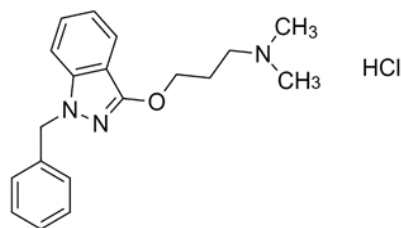


Рис. 1 «Дерево рішень» щодо вибору аналітичних методик з позицій «зеленої хімії»

Надано обґрунтування застосування «дерева рішень» для розробки аналітичних методик контролю якості препаратів з бензидаміну гідрохлоридом (I).



I

Відповідно до «дерева рішень», спершу ми оцінили можливість використання методу УФ-спектрофотометрії. Однак він не дозволяє кількісно визначити ні активну сполуку, ні консервант через складність матриці препарату та інтерференцію хвиль поглинання різних компонентів системи.

Метод ГХ дозволяє кількісно оцінити декілька аналітів за допомогою однієї інжекції. У нашому випадку теоретично він може бути застосований до кількісної оцінки бензидаміну та метилпарабену. Однак метод ГХ не є селективним для визначення домішок бензидаміну гідрохлориду.

Методика ВЕРХ могла б дозволити провести всі визначення в одній пробі. Але під час попередніх досліджень було виявлено, що внаслідок різниці в концентраціях АФІ та домішок не вдається досягти коректних результатів. Тому прийнято рішення розробити окремо: методику визначення супутніх домішок – методом ВЕРХ; методики одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду – методом ВЕРХ аналогічно методиці визначення домішок та методом ГХ як альтернативним.

Розділ 3. Методи дослідження показників якості оромукозного спрею та розчину з бензидаміну гідрохлоридом.

Для стандартизації спрею оромукозного та розчину з бензидаміну гідрохлоридом важливим було розробити методики визначення супутніх домішок, кількісного визначення АФІ (бензидаміну гідрохлориду) та консерванта (метилпарагідроксибензоату). Відповідно до планування розробці підлягали окремо методика для визначення домішок, а також методика для одночасного кількісного визначення бензидаміну та метилпарабену. На першому етапі проведено аналіз провідних фармакопей світу для вибору відповідних методик. На сьогодні до ДФУ не внесено монографії ні на субстанцію бензидаміну гідрохлориду, ні на його готові лікарські форми. Стандартно для аналізу АФІ потрібно застосовувати монографію ЄФ. Щодо монографій на спрей, то її містить Британська фармакопея (БФ).

Розробка методики визначення супровідних домішок. Для визначення домішок бензидаміну гідрохлориду в спреї монографія БФ пропонує метод ТШХ для виявлення супровідної домішки С, проте цей метод не забезпечує визначення інших продуктів можливої деградації субстанції, чого вимагають регуляторні органи України та Європи. Тому використання підходу БФ може бути розглянуто як мінімальна, але не достатня вимога щодо забезпечення якості готового лікарського засобу. Використання ж методики ЄФ на супровідні

домішки для АФІ (метод ВЕРХ) не забезпечує достатньої селективності методики для готової лікарської форми, бо препарат містить досить складну «матрицю» допоміжних речовин, яка спричиняє накладання піків плацебо на піки домішок АФІ. Тому було розроблено оригінальну методику та здійснено її валідацію. Критерії прийнятності для нормування домішок визначали відповідно до максимальної добової дози препарату. Як специфіковану обрано домішку С, що є побічним продуктом синтезу бензидаміну гідрохлориду та яка водночас може бути продуктом деградації діючої речовини. Експериментальними дослідженнями доведено, що достатня роздільна здатність забезпечується за використанням перхлоратного буфера як рухомої фази. З метою покращення симетрії піку шляхом пасивації силанольних груп нерухомої фази до рухомої фази додавали триетиламін. Розділення проводили на колонці Grace Alltima розміром 250 мм × 4,6 мм, заповненій силікагелем октадецилсилільним з розміром часток 5 мкм. Оптимальне значення рН буферного розчину визначено на рівні рН 3,0, а органічною складовою елюента вибрано ацетонітрил. Наведені умови хроматографування виявились оптимальними (рис. 2).

Для оцінювання можливості інтерференції між бензидаміну гідрохлоридом, домішкою С та можливими неідентифікованими продуктами деградації зразок препарату піддавали стрес-дослідженням. Досліджували вплив луку, кислоти, окислення, фотолізу та температури. Щоб підтвердити природу продуктів деградації, вводили холостий розчин і розчин плацебо.

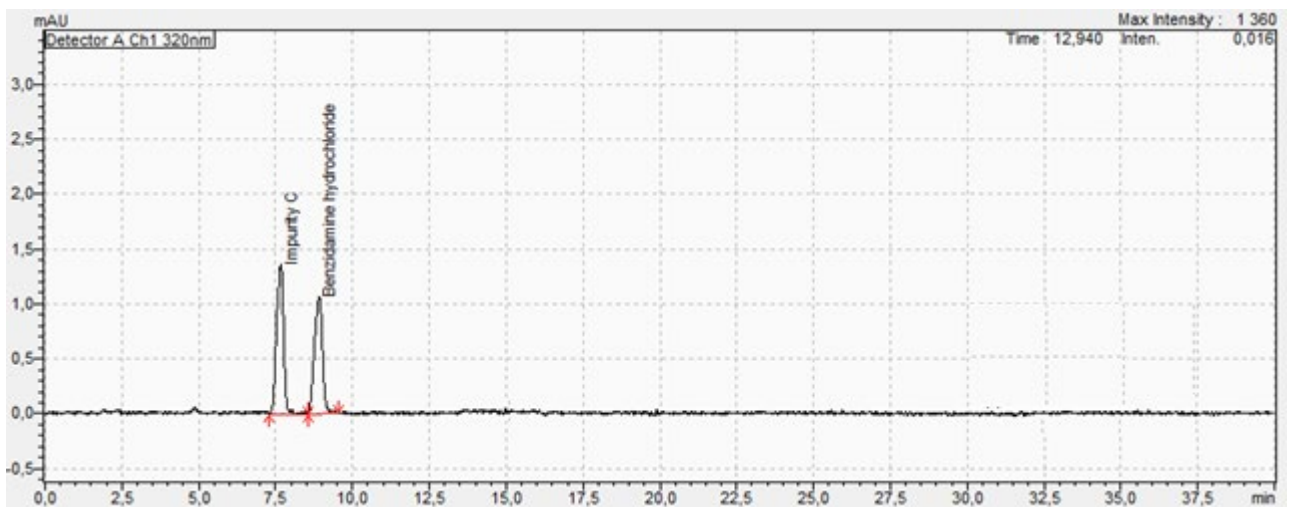


Рис. 2 Хроматограма розчину порівняння, отримана за оптимальних умов хроматографування

Дослідження примусової деградації засвідчили, що бензидаміну гідрохлорид є досить стійким до дії луку, температури та фотолізу. Значна деградація бензидаміну гідрохлориду відбувалась при дії H_2O_2 (окислення) і кислотою з утворенням неідентифікованого продукту деградації та домішки С (Рис. 3).

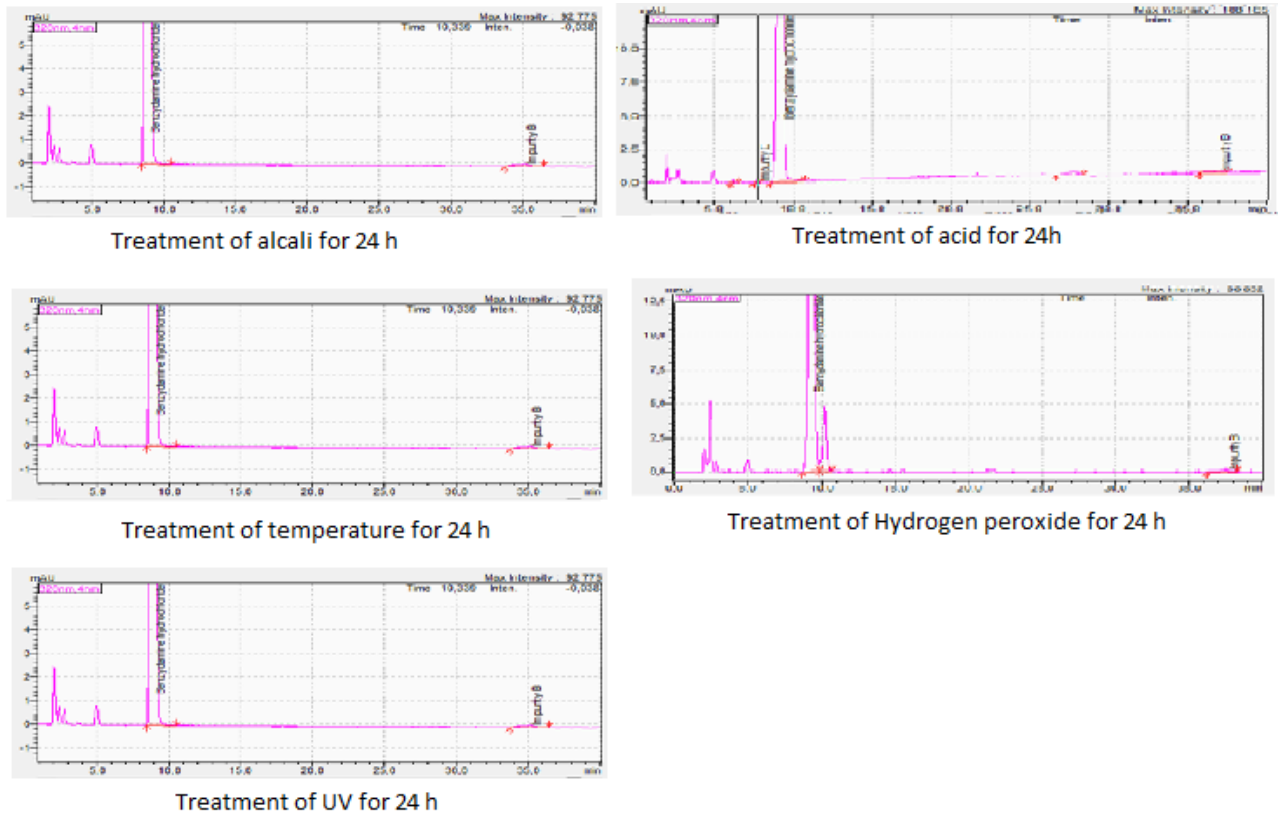


Рис. 3 Хроматограми стрес-тестів бензидаміну гідрохлориду в готовій лікарській формі

За допомогою методу ВЕРХ/МС визначено, що невідомою домішкою був бензидаміну N-оксид із відповідною масою 326, 2 m/z (рис. 4).

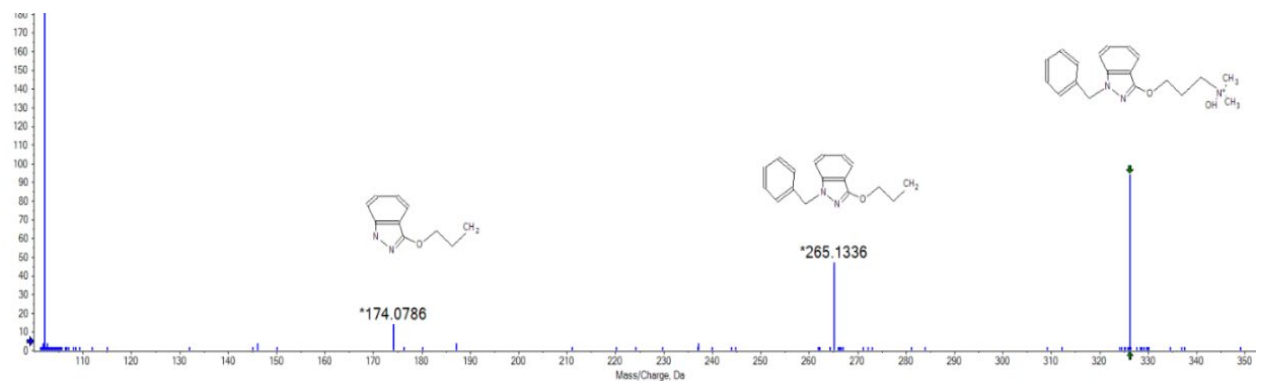


Рис. 4 Мас-спектр невідомої домішки (бензидаміну N-оксиду)

Розроблену ВЕРХ методику було валідовано відповідно до вимог ДФУ та ІСН за такими критеріями: лінійність, межі виявлення та кількісного визначення, прецизійність, правильність, робастність та специфічність. Лінійність, збіжність, правильність і діапазон застосування методики визначали на модельних сумішах з відомим вмістом супровідних домішок речовини в межах від 25 % до 125 % щодо максимально допускового значення.

Одержані значення метрологічних характеристик методики наведено в табл. 1.

**Метрологічні характеристики лінійної залежності для
неідентифікованої домішки та домішки С**

Показник	Критерій прийнятності	Отримане значення для неідентифікованої домішки	Отримане значення для домішки С
r	0,9976	0,9992	0,9998
a	$\leq 2,1$	0,8526	0,2857
b	—	0,9780	1,0003
S _a	—	0,62	0,36
S _b	—	0,0102	0,0058
S _r	—	1,21	0,69

Оскільки бензидамін N-оксид є основним метаболітом бензидаміну в організмі людини, розроблена нами методика визначення супровідних домішок може бути також використана і для цілей судово-хімічного аналізу, бо вона дозволяє одночасно визначати бензидаміну гідрохлорид і його метаболіт. З огляду на те, що в літературі не описано методи ідентифікації бензидаміну та його метаболіту в присутності інших НПЗЗ, такі дослідження є актуальними і мають практичне значення.

Дослідження було проведено за консультаційної підтримки доцента кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації ХМАПО, канд. фарм. наук О. В. Чубенко. Розроблено хроматографічну методику визначення бензидаміну в присутності таких лікарських засобів, як диклофенак натрію, німесулід, кислота мефенамінова, індометацин, мелоксикам, пропіфеназон.

Розробка методики одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарагідроксибензоату методом ВЕРХ. Відповідно до дизайну дослідження було проаналізовано можливість одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену в одному зразку методами ВЕРХ та ГХ.

В основу методики кількісного визначення методом ВЕРХ покладено умови хроматографування, визначені нами як оптимальні для виявлення супровідних домішок. На жаль, у результаті попередніх експериментальних досліджень було з'ясовано, що проводити одночасне визначення домішок та АФІ неможливо внаслідок значної відмінності в концентраціях. Відповідно до попереднього аналізу спектрів поглинання для бензидаміну гідрохлориду було обрано довжину хвилі 320 нм, а для метилпарабену – 254 нм. Розроблену ВЕРХ-методику було валідовано згідно з вимогами ДФУ та ІСН Q2 за такими показниками: лінійність, прецизійність, правильність, робастність та специфічність. Специфічність методики було підтверджено відсутністю інтерференції між піками аналітів та піками плацебо на хроматограмах випробуваного розчину (рис. 5).

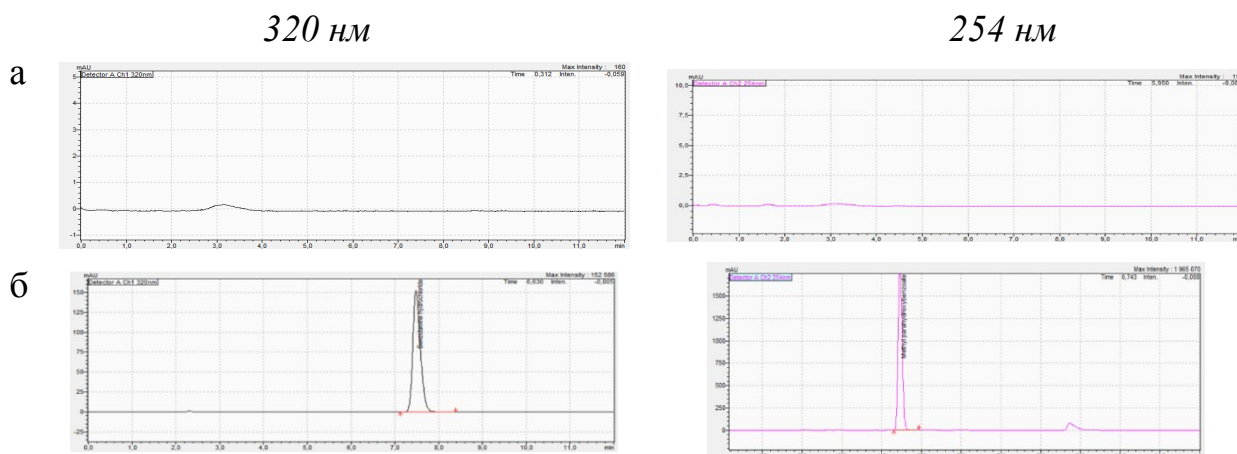


Рис. 5 Хроматограми плацебо (а) та випробуваного розчину (б) за 320 нм та 254 нм

Методика виявилась лінійною на всьому діапазоні концентрацій (рис. 6).

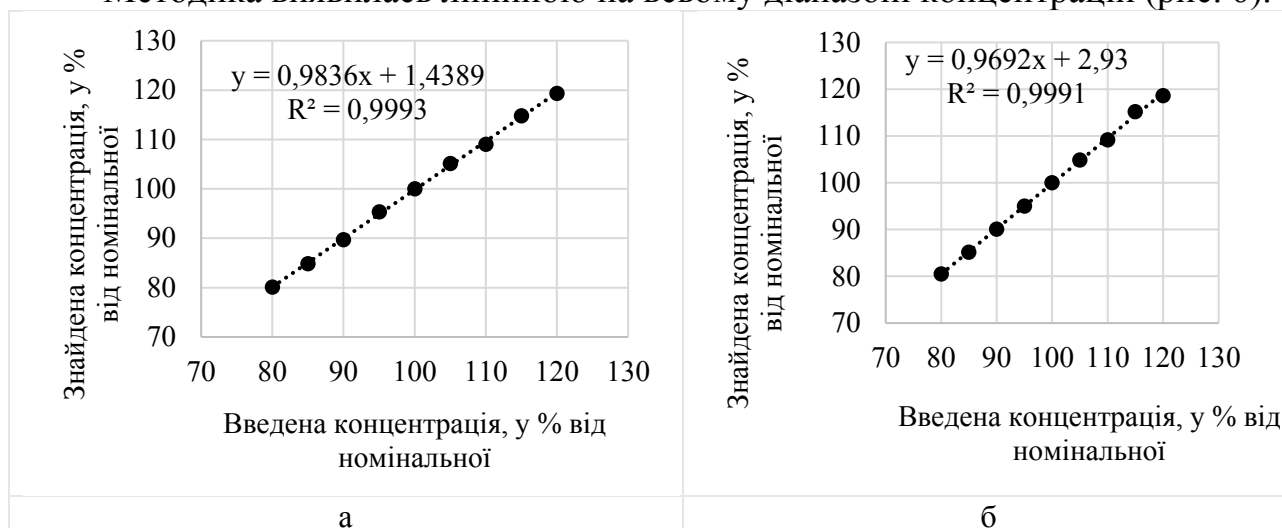


Рис. 6 Графіки дослідження лінійності для бензидаміну гідрохлориду (а) та метилпарабену (б)

Високі значення коефіцієнта кореляції для бензидаміну ($r = 0,9993$) та метилпарабену ($r = 0,9991$) задовольняють вимогам критерію прийнятності. Методика аналізу також відповідає вимогам прецизійності (збіжності), оскільки виявлене значення відносного довірчого інтервалу величини Z (0,72 для бензидаміну та 0,98 для метилпарабену) менше критичного значення для збіжності результатів (1,6 % та 3,2% відповідно).

Розробка методики одночасного визначення бензидаміну та метилпарабену методом ГХ. Для подальшої імплементації підходу «зеленої хімії», згідно з запропонованим «деревом рішень», ми спробували розробити методику кількісного визначення бензидаміну та метилпарабену методом газової хроматографії. За основу методики було взято монографію Британської фармакопеї для визначення бензидаміну в готовій лікарській формі. Відповідно до цієї методики пробопідготовку проводять екстракцією хлороформом після оброблення випробуваного розчину лугом. Однак така процедура не підходить для визначення метилпарабену, оскільки значення рН розчину більше за 8,0 призводить до деградації його молекули та унеможливує подальше кількісне

визначення аналіту. Під час вибору умов екстракції було з'ясовано, що оптимальним значенням рН середовища є 6,0–7,0. За цих умов деградація визначених речовин не відбувається і вони повністю мігрують до органічного розчинника.

Під час процесу розроблення методики було визначено оптимальні умови: температуру інжектора, детектор, швидкість потоку рухомої фази, нерухому фазу, тип введення зразка, градієнт температури та внутрішній стандарт. Для аналізованих речовин найкращу селективність та симетрію піків спостерігали за використання неполярної фази НР-5 з геометрією колонки 30 м x 0,32 мм x 0,25 мкм (рис. 7). Як внутрішній стандарт було обрано домішку А бензидаміну гідрохлориду, яка відповідала всім вимогам, що їх висувають для внутрішнього стандарту.

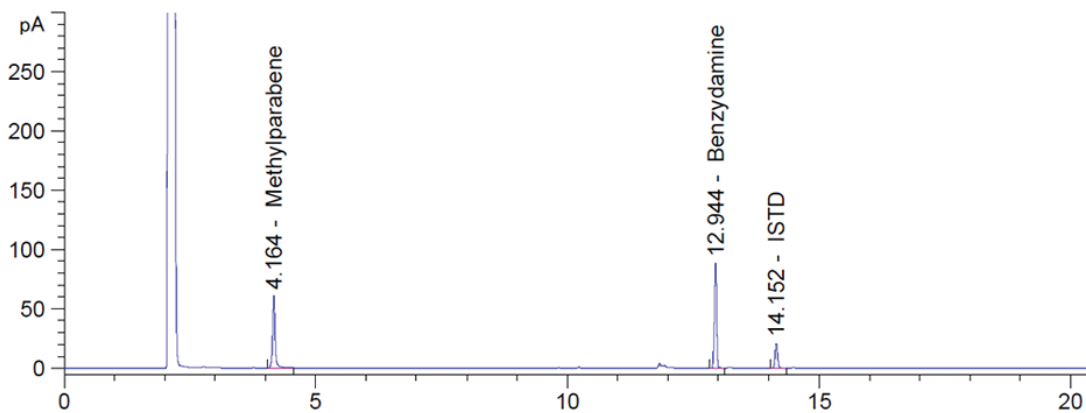


Рис. 7 Хроматограма бензидаміну та метилпарабену на колонці НР-5

Валідацію методики проводили згідно з вимогами ДФУ 5.3.N.2 та ІСН Q2. Лінійність, збіжність, правильність і діапазон застосування методики підтверджено на модельних сумішах з відомим вмістом діючої речовини в межах від 80 до 120 % щодо номінального значення визначуваних компонентів. За результатами валідаційних досліджень методику визнано коректною – її можна використовувати в рутинному аналізі для одночасного визначення бензидаміну та метилпарабену в препаратах, що містять ці компоненти.

Розробка методики визначення залишкових кількостей бензидаміну гідрохлориду на поверхні технологічного обладнання. Одним із потенційних джерел виникнення домішок може бути технологічне обладнання та залишкові кількості лікарських засобів на ньому. Тому очищення обладнання та контроль залишкових кількостей лікарських засобів є важливим етапом фармацевтичного виробництва. Зазвичай контроль очищення обладнання проводять з використанням хроматографічних методів. Але з огляду на підходи «зеленої хімії» найбільші переваги для цих цілей має метод УФ-спектрофотометрії. Тому для визначення залишкових кількостей АФІ на поверхні технологічного обладнання розроблено та валідовано спектрофотометричну експрес-методику. Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 310 нм, що відповідає максимуму поглинання бензидаміну гідрохлориду. Критерії вмісту допускних кількостей залишкових лікарських засобів на поверхні обладнання (10 ppm) розраховували, зважаючи на оцінки ризиків, пов'язаних із залишками цих АФІ

відповідно до рекомендацій Pharmaceutical inspection cooperation scheme (PICS). Валідаційні дослідження проводили згідно з вимогами ДФУ. За результатами визначення валідаційних характеристик методу можна вважати коректною.

Розділ 4. Дослідження з розробки та стандартизації комбінованого спрею ормукозного з бензидаміну гідрохлоридом.

Відомо, що бензидаміну гідрохлорид у спектрі своєї активності має і антибактеріальні властивості, що є безумовно позитивним у разі застосування. Під час фармакологічних досліджень було з'ясовано, що антибактеріальні властивості за додавання як одорантів ефірних олій підвищились. Тому було прийнято рішення щодо розробки комбінованого спрею ормукозного з додаванням ефірної олії як АФІ для лікування захворювань порожнини рота, що супроводжуються бактеріальним компонентом.

Вибір ефірної олії та її постачальника. Для вибору ефірної олії було проведено попередні дослідження впливу введення ефірних олій евкаліпту, лаванди та м'яти перцевої на антибактеріальну активність розчину бензидаміну гідрохлориду. Технологію введення ефірних олій (у кількості 1,5%) до розчину бензидаміну гідрохлориду для мікробіологічних досліджень розроблено за консультативної підтримки д-ра фарм. наук, професора, завідувачки кафедри заводської технології ліків НФаУ О. А. Рубан. Мікробіологічні дослідження проведено спільно з д-ром фарм. наук, професором кафедри біотехнологій НФаУ О. П. Стрілець. Як контроль використовували розчин бензидаміну гідрохлориду. Як засвідчили результати попередніх досліджень, найбільше підвищує антибактеріальні властивості бензидаміну додавання ефірної олії м'яти перцевої (рис. 8).

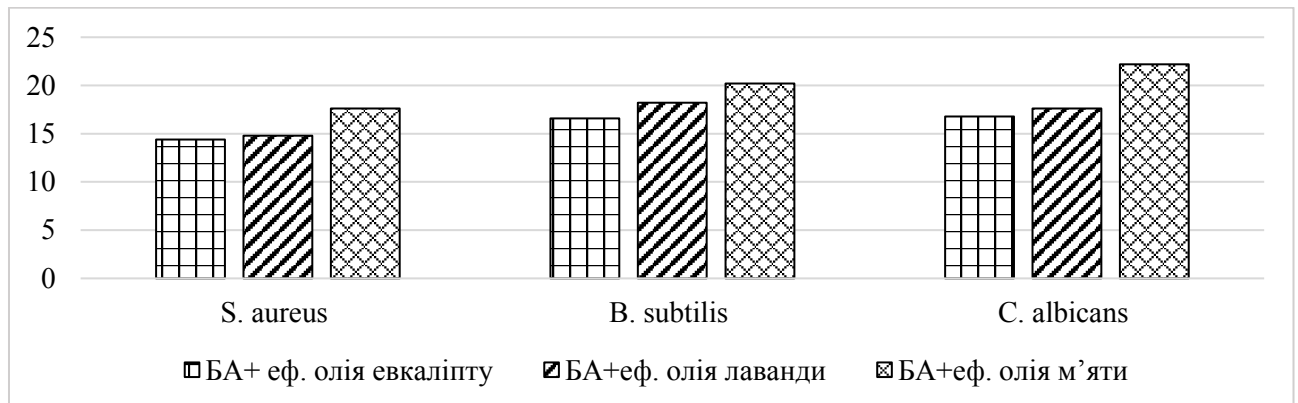


Рис. 8 Результати дослідження антимікробної активності зразків ефірних олій

Отже, для подальших досліджень було запропоновано комбінований спрей такого складу:

Бензидаміну гідрохлорид	1,5мг/мл
Ефірна олія м'яти перцевої	0,45
Твін-80	0,9
Спирт етиловий 96%	6,0
Консервант (метилпарабен)	1 мг
Вода очищена	до 30,0 мл

Для подальших досліджень фармацевтичної розробки та перспективи використання у виробництві проведено вибір постачальника ефірної олії. Для цього 5 з наявних на ринку України зразків було оцінено на їх відповідність вимогам ЄФ. Результати проведеного аналізу хімічного складу досліджуваних зразків (метод ГХ) наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Нормування (ЄФ) та вміст хімічних речовин у зразках ефірної олії м'яти перцевої (метод ГХ)

Лимонен, 5-7%	Цинеол 1,5%	Ментон 17-35%	Ізоментон 5-13%	Ментилаце-таг-1,5-7%	Ізопулегол 1-3%	Ментол 30-50%	Пулегон не > 2,5%	Карвон не > 2,0%
5,2	1,1	33,0	10,6	3,0	2,0	44,0	0,8	0,3
6,0	0,8	32,0	12,0	6,0	2,2	39,1	1,5	0,4
6,3	0,0	28,0	11,5	5,8	2,4	44,3	0,9	0,8
5,5	9,0	34,0	9,7	3,3	1,9	36,0	0,5	0,1
5,8	1,3	26,4	10,5	6,9	1,7	47,0	0,3	0,1

Розробка методики одночасного визначення бензидаміну, ментолу та метилпарагідроксибензоату методом ГХ. Кількісному визначенню у розробленій лікарській формі підлягають такі компоненти – бензидаміну гідрохлорид, ефірна олія м'яти перцевої (у перерахунку на ментол) та метилпарабен. З огляду на принципи та підходи «зеленої хімії» та на розроблене «дерево рішення», ми спробували розробити методику одночасного визначення компонентів ГЛС методом газової хроматографії. Розробку методики одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та ментолу проводили шляхом підбору оптимальних хроматографічних параметрів та підготовки зразків. За основу взято попередньо розроблену нами методику аналізу бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом газової хроматографії. Початкові концентрації бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та ментолу в лікарській формі становлять 1,5, 1,0 та 0,22 мг/мл відповідно, що відповідає концентраціям 0,15, 0,1 та 0,022 мкг/мкл під час хроматографування. За цих концентрацій перевантаження піків не спостерігали. Найкращу роздільну здатність сполук виявлено на колонці НР-5. Щоб запобігти перевантаженню колонки було обрано об'єм введення 1 мкл з подальшим розведенням 20:1. З урахуванням високих температур кипіння аналізованих речовин та значних відмінностей їх точок кипіння було обрано температуру 300 °С, що дозволило досягти повного випаровування зразка без потенційної дискримінації та деградації аналізованих речовин. У результаті експериментальних досліджень було виявлено, що ментол елюється за температури 220 °С протягом 5 хв у запропонованій хроматографічній системі,

а метилпарабен – протягом 10 хв. Після елюювання метилпарабену температуру підвищували до 270 °С на 20 °С/хв. Витримання за температури 270 °С протягом 18 хв дозволяло елюювати як бензидамін, так і внутрішній стандарт. Хроматограми тестового розчину та розчину порівняння, отримані за наведених умов хроматографування, наведені на рис. 9, 10.

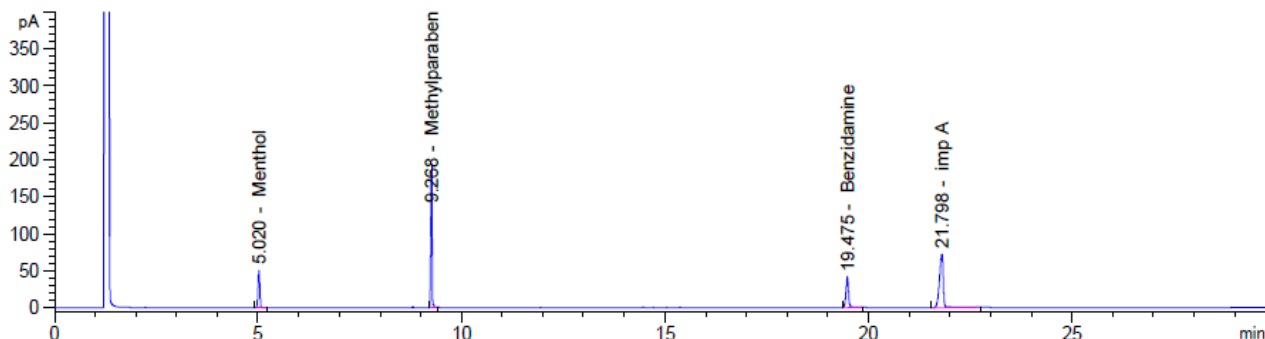


Рис. 9 Хроматограма стандартного розчину бензидаміну, ментолу, метилпарабену та внутрішнього стандарту на колонці НР-5

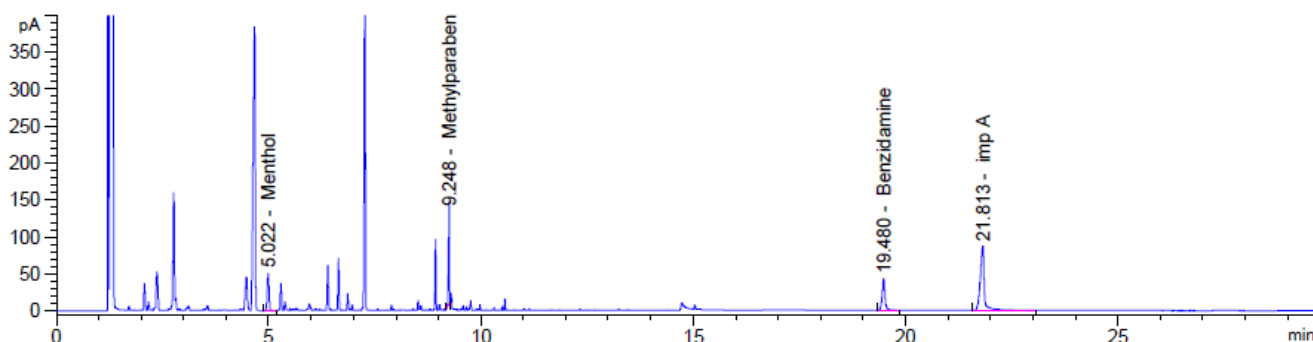


Рис. 10 Хроматограма тестового розчину бензидаміну, ментолу, метилпарабену та внутрішнього стандарту на колонці НР-5

Валідацію розробленої методики проводили відповідно до вимог ДФУ за такими показниками: селективність, придатність хроматографічної системи, лінійність, прецизійність, правильність та робастність. Для підтвердження селективності методики вводили випробуваний та стандартний розчини та оцінювали інтерференцію піків плацебо з аналітами. Роздільна здатність для аналізованих сполук становила не менше 1,5. Коелюювання не спостерігали, що свідчить про те, що методика має достатню селективність для визначення сполук. Параметри та критерії придатності хроматографічної системи наведено в табл 3.

Таблиця 3

Придатність хроматографічної системи для розробленої методики (n = 3)

Речовина	Час утримування, хв	RSD % відношення площ внутрішнього стандарту та аналіту	Число теоретичних тарілок	Фактор асиметрії
Критерій		$\leq 0,5$	≥ 40000	≤ 2
Ментол	5,0	0,24	64108	1,14

Речовина	Час утримування, хв	RSD % відношення площ внутрішнього стандарту та аналіту	Число теоретичних тарілок	Фактор асиметрії
Метилпарабен	9,2	0,25	406197	1,72
Бензидаміну гідрохлорид	19,5	0,12	436177	1,04

Як видно з результатів, наведених у табл. 3, у поданій системі максимальне відносне стандартне відхилення для співвідношення площ піків становить 0,25 для трьох паралельних введень; число теоретичних тарілок для ментолу становить 64108, що вдвічі більше, ніж поріг придатності хроматографічної системи для розробленої методики; фактор асиметрії піка не перевищує 1,8 для кожної сполуки.

Лінійність методики оцінювали шляхом введення 9 стандартних розчинів у трьох паралельних дослідах з різною концентрацією аналітів, яка становила від 80% до 120% до їх номінального вмісту в лікарській формі.

Графіки залежності площ під піками від концентрації уведених речовин у нормалізованих координатах наведено на рис. 11.

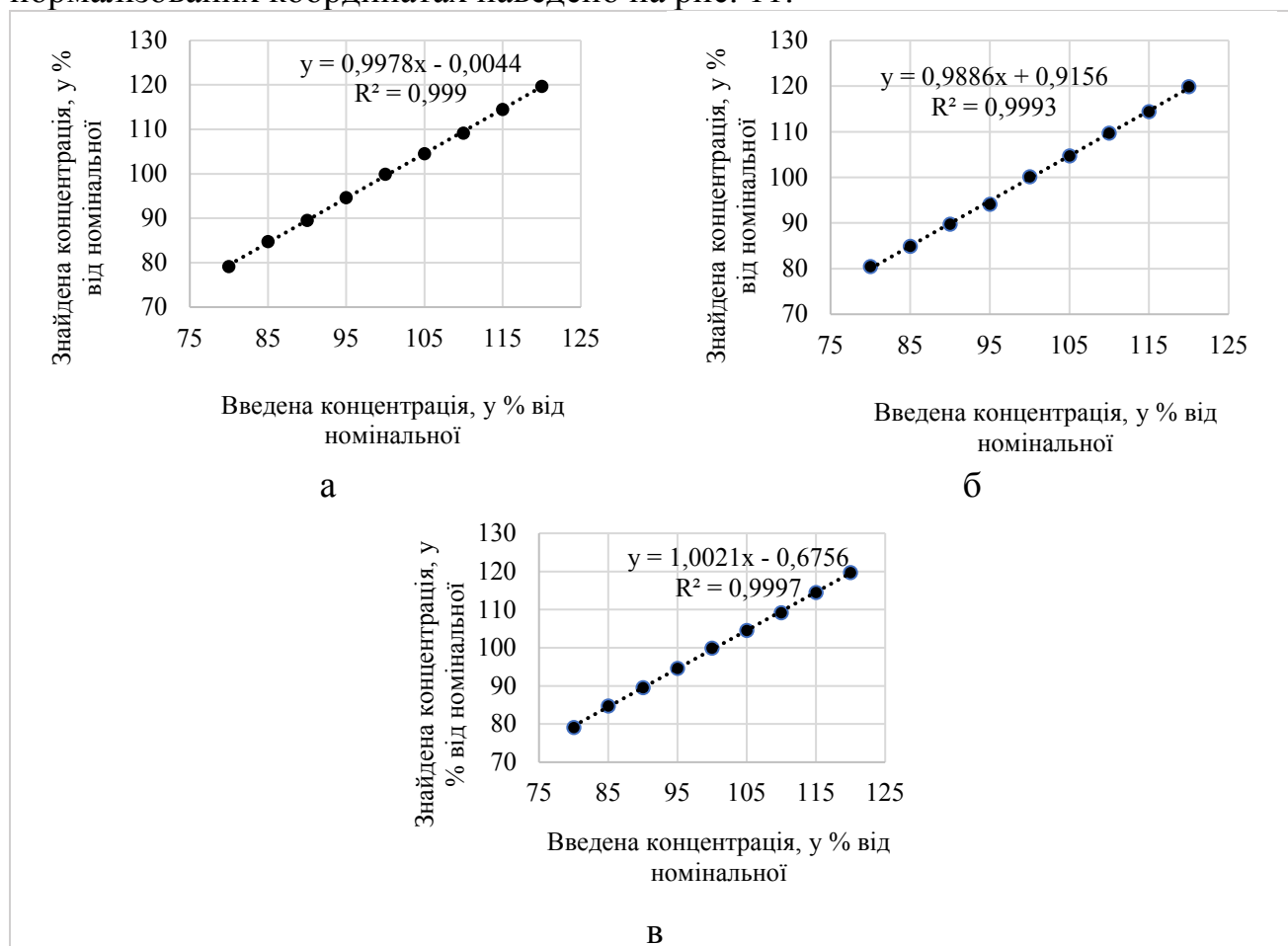


Рис.11 Графіки залежності площ під піками від концентрації бензидаміну (а), ментолу (б), метилпарабену (в) у нормалізованих координатах

Високе значення коефіцієнтів кореляції (більше 0,999) доводить лінійну залежність між введеною та виявленою кількістю компонентів у діапазоні 80-120 % для усіх речовин. Значення вільного члена рівняння також перебуває в межах критеріїв прийнятності.

Робасність методики вивчали шляхом зміни таких параметрів, як швидкість потоку, об'єм введення, початкова температура колонки (табл. 4).

Таблиця 4

Результати дослідження робасності

	Бензидаміну гідрохлорид	Метилпарабен	Ментол
Температура колонки, °С	Різниця між відношенням площ піків залежно від початкової температури методики, %		
220	-	-	-
215	0,34	0,77	0,94
225	0,26	0,53	0,81
Швидкість потоку, мл/хв	Різниця між відношенням площ піків аналіту та внутрішнього стандарту проти встановлених умов методики, %		
1,0	-	-	-
0,9	0,19	0,33	0,28
1,1	0,28	0,21	0,41
Об'єм введення, мкл	Різниця між відношенням площ піків аналіту та внутрішнього стандарту проти кінцевих умов методики, %		
1,0	-	-	-
0,9	0,09	0,11	0,12
1,1	0,06	0,10	0,11

Отже, запропонована методика одночасного визначення трьох компонентів спрею на основі бензидаміну є коректною, відповідає принципам «зеленої хімії» і її можна використовувати в рутинному контролі.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено обґрунтування та експериментальне розв'язання наукового завдання – розробки методик контролю якості оромукозних лікарських препаратів з бензидаміну гідрохлоридом: бензидамін спрею 1,5 мг/мл, бензидамін розчину 1,5 мг/мл та оригінальної комбінації бензидаміну з ефірною олією м'яти перцевої, спрею. Для розробки методик використано принципи «зеленої хімії», що дозволяє зменшити шкідливий вплив на навколишнє середовище та виробничий персонал. Розроблені методики використовують в АТ «Фармак» у рутинному контролі якості під час виробництва лікарських препаратів з бензидаміну гідрохлоридом.

1. З урахуванням основних принципів «зеленої аналітичної хімії» розроблено «дерево рішень» щодо оптимізації вибору аналітичних методик. Обґрунтовано методологію та тактику досліджень щодо

- імплементатії принципів «зеленої хімії» у розробку методик контролю якості лікарських препаратів з бензидаміну гідрохлоридом.
2. Розроблено методику визначення супровідних домішок бензидаміну гідрохлориду в спреї та розчині методом ВЕРХ. Обрано оптимальні умови хроматографування. Дослідження примусової деградації довели, що бензидаміну гідрохлорид є стійким до дії луку, температури та фотолізу. Значна деградація бензидаміну гідрохлориду відбувалася за оброблення H_2O_2 (окислення) та кислотою з утворенням продукту деградації, який було ідентифіковано методом ГХ/МС як бензидамін N-оксид. Методику валідовано відповідно до вимог ДФУ.
 3. Розроблену методику визначення супровідних домішок покладено в основу методики ідентифікації бензидаміну гідрохлориду та його метаболіту бензидамін N-оксиду в присутності інших НПЗЗ (пат. України на корисну модель №142803).
 4. Уперше запропоновано та розроблено методику одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену в готовій лікарській формі методом ВЕРХ. Час однієї хроматографічної процедури склав менше 10 хв. Проведено процедуру валідації розробленої методики відповідно до вимог ДФУ та підтверджено її надійність, специфічність, лінійність у діапазоні концентрацій 80–120 % для кожного аналізу. Усі параметри валідації відповідають критеріям прийнятності.
 5. Розроблено альтернативну методику одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену в готовій лікарській формі методом ГХ, що максимально враховує підходи «зеленої хімії». Експериментально визначено оптимальні умови пробопідготовки та методики: температуру інжектора, детектор, швидкість потоку рухомої фази, нерухомої фази, тип введення зразка, градієнт температури та внутрішній стандарт. Коректність розробленої методики та її придатність для рутинного контролю доведено валідаційними дослідженнями.
 6. Розроблено та валідовано визначення залишкових кількостей бензидаміну на поверхні технологічного обладнання методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області.
 7. За результатами мікробіологічних досліджень для потенціювання антибактеріальних властивостей бензидаміну гідрохлориду найбільш ефективною виявилась олія м'яти перцевої. Для вибору постачальника досліджено відповідність зразків олії м'яти перцевої на їх відповідність вимогам ЄФ. З'ясовано, що хімічний профіль досліджуваних олій та вміст нормованих речовин відповідає фармакопейним вимогам.
 8. Для оригінальної комбінованої лікарської форми – спрею бензидаміну гідрохлориду з ефірною олією м'яти перцевої розроблено методику одночасного визначення ментолу, метилпарабену та бензидаміну гідрохлориду методом газової хроматографії. Час утримування ментолу, метилпарабену та бензидаміну гідрохлориду склав 5,0, 9,2 та 19,4 хв відповідно. Проведено процедуру валідації методики згідно з вимогами

ДФУ, яка підтвердила її селективність, придатність хроматографічної системи, лінійність, прецизійність, правильність та робастність.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Cherniy V.A., Gureeva S.N., Georgiyants V.A. Development and validation of alternative analytical method for determination of related substances of benzydamine hydrochloride in oral spray by HPLC. *Pharmaceutical Sciences and Technology*. 2016. Vol. 1, № 5. P. 25–33.
2. Чорний В. А., Георгіянц В. А. Розмір частинок оромукозних спреїв як основний параметр, що визначає якість і характеристики продукції. Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. – 2017. – Вип. 28. – С. 140–147.
3. Chorny V., Kushniruk, V., Georgiyants V. Design and implementation of green chemistry approaches into pharmaceutical analysis of benzydamine dosage forms. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2019. №5(21). P. 12-17.
4. Chorny V.A., Georgiyants V.A., Gureyeva S.N., Chorna O.V. Simultaneous determination of benzydamine hydrochloride, methylparaben and peppermint oil in a spray dosage form by gas chromatography. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019. Vol. 11, № 6. P. 147–153.
5. Черный В.А., Георгіянц В.А., Черная О.В., Журавель И.А., Ибадуллаева Г.С. Валидация методики определения остаточного количества бензидамина на поверхности технологического оборудования. *Фармація Казахстану*. 2019. №4(25). С. 25–28.
6. Chorny V., Georgiyants V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben in benzydamine dosage form by GC. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2019. Vol.6, № 1. P. 28–35.
7. Chorny V., O Chorna., Georgiyants V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben in dosage form by HPLC. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2020. №3(25). P. 12–18.
8. Пат. України на корисну модель № 14283. «Спосіб ідентифікації бензидаміну та його метаболіту в присутності деяких протизапальних нестероїдних препаратів» № u 2020 00615; заявл. 03.02.2020 р.; опубл. 25.06.2020 р., Бюл. № 12
9. Черный В. А., Гуреева С. Н., Георгіянц В. А. Разработка и валидация методики определения сопутствующих примесей бензидамина гидрохлорида методом ВЭЖХ с использованием диодно-матричного детектирования. *Аналітична хімія у фармації* : матеріали II міжнар. наук.-практ. Інтернет-конф., м. Харків, 17 берез. 2016 р. – Х. : Вид-во НФаУ, 2016. – С. 85–86.
10. Черный В. А., Пономарева Ю. Н., Черная О. В., Георгіянц В. А. Разработка методики одновременного количественного определения

- бензидамина гидрохлорида и метилпарабена в готовой лекарственной форме методом ВЭЖХ с применением принципов зеленой химии. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи* : матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України, м. Харків, 13-16 верес. 2016 р. – Х., 2016. – Т. 1. – С. 213.
11. Черный В. А., Гончарова Ю. Н., Черная О. В., Георгиянц В. А. Разработка методики одновременного количественного определения бензидамина гидрохлорида и метилпарабена в готовой лекарственной форме методом газовой хроматографии. *Управління якістю в фармації* : матеріали XI наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 19 трав. 2017 р. – Х., 2017. – С. 177.
12. Черный В. А., Георгиянц В. А., Черная О. В. Методология определения вымываемых веществ из элементов первичной упаковки в готовых лекарственных средствах. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології* : зб. наук. пр. – Х. : Вид-во НФаУ, 2017. – Вип. 3. – С. 325–326.

АНОТАЦІЯ

ЧОРНИЙ В. А. Розробка методик контролю якості лікарських препаратів з бензидаміну гідрохлоридом з позицій «зеленої хімії». – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 «Фармацевтична хімія та фармакогнозія». – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2021.

У дисертації висвітлено питання розробки та валідації аналітичних методик контролю якості оромукозних препаратів з бензидаміну гідрохлоридом за принципами «зеленої хімії». Розроблено «дерево рішень» щодо вибору аналітичних методик з огляду на їх відповідність принципам «зеленої хімії», за результатами його імплементації обґрунтовано методологію досліджень.

Розроблено методику визначення супровідних домішок у препаратах бензидаміну гідрохлориду спреї та розчині методом ВЕРХ, проведено дослідження деградації АФІ в стресових умовах. Запропоновано підходи до ідентифікації бензидаміну та його метаболіту в присутності НПЗЗ. Розроблено методики одночасного визначення АФІ (бензидаміну гідрохлориду) та консерванта (метилпарагідроксибензоату) методами ВЕРХ та ГХ. Визначено оптимальні умови пробопідготовки та хроматографування, проведено їх валідацію. Розроблено методику визначення залишкових кількостей АФІ на поверхні обладнання методом абсорбційної спектрофотометрії. Розроблено методику одночасного визначення бензидаміну, ментолу та метилпарабену в оригінальній комбінованій лікарській формі методом ГХ. Розроблені методики відповідають принципам «зеленої хімії» та є коректними за результатами валідаційних досліджень.

Ключові слова: бензидаміну гідрохлорид, «зелена хімія», контроль якості, валідація, ВЕРХ, газова хроматографія.

АННОТАЦИЯ

ЧЕРНЫЙ В. А. Разработка методик контроля качества лекарственных препаратов с бензидамина гидрохлоридом с позиций «зеленой химии». – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия». – Национальный фармацевтический университет, МОЗ Украины, Харьков, 2021

Диссертация посвящена разработке и валидации аналитических методик контроля качества оромукозных препаратов на основе бензидамина гидрохлорида по принципам «зеленой химии». Разработано «дерево решений» по выбору аналитических методик с учетом их соответствия принципам «зеленой химии», по результатам его имплементации обоснована методология исследований.

Разработана методика определения сопутствующих примесей в препаратах бензидамина гидрохлорида спрей и раствор методом ВЭЖХ, проведено исследование деградации АФИ в стрессовых условиях. Разработаны методики одновременного определения АФИ (бензидамина гидрохлорида) и консерванта (метилпарагидроксибензоата) методами ВЭЖХ и ГХ. Определены оптимальные условия пробоподготовки и хроматографирования, проведена их валидация. Разработана методика определения остаточных количеств АФИ на поверхности оборудования методом абсорбционной спектрофотометрии. Разработана методика одновременного определения бензидамина, ментола и метилпарабена в оригинальной комбинированной лекарственной форме методом ГХ. Разработанные методики соответствуют принципам «зеленой химии» и являются корректными по результатам валидационных исследований.

Ключевые слова: бензидамина гидрохлорид, «зеленая химия», контроль качества, валидация, ВЭЖХ, газовая хроматография.

SUMMARY

Chernyi V. A. Development of the quality control methods for Benzydamine hydrochloride pharmaceuticals according to “green chemistry” principles. – A manuscript.

Thesis for a Candidate of Pharmaceutical Science degree in the specialty 15.00.02 – Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy. – National University of Pharmacy, Kharkiv, 2021.

The dissertation is devoted to the development and validation of analytical methods of quality control of oromucosal preparations with benzydamine hydrochloride according to the principles and approaches of "green chemistry".

The development of the "decision tree" was performed on the basis of assessing the degree of use of organic compounds and solvents by various analytical methods, as

well as the direct ability of these methods to simultaneously determine multiple analytes, ie to "built-in selectivity" of analytical methods. As result of "decision tree" implementation methodology of investigations was substantiated.

To develop a method for the related substances of benzydamine hydrochloride in oromucosal spray and solution, the method of liquid chromatography was used as the most effective technique for the separation of related substances. A GraceAltima C18 chromatographic column was selected for separation. As the mobile phase, a buffer solution based on sodium perchlorate, with a pH of 3.0, and triethylamine as an ion-pair additive was selected. Stress tests were performed to determine potential degradation products. The main degradation product, benzydamine N-oxide, was determined by mass spectrometric determination in tandem with HPLC. The validation characteristics of the method were selected and investigated taking into account the requirements of SPhU and ICH Q2. The characteristics of linearity, precision, accuracy and robustness are determined in accordance with the specified criteria and are within their limits.

The development of a method for the simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben was carried out according to the further implementation of the green chemistry approach.

At first step, HPLC was used to simultaneously determine the components. Wavelengths of 320 and 254 nm were used to detect benzydamine and methylparaben. A mixture of acetonitrile buffer with pH 3.0 consisting of sodium perchlorate, perchloric acid and triethylamine was chosen as the mobile phase. The specificity of the method was proved by the absence of the effect of placebo peaks on the studied components, as well as the lack of coelution between benzydamine and methylparaben. The correlation coefficient of the regression line R^2 for both analytes was more than 0.999. The requirements for the suitability criteria of the chromatographic system were established. The robustness of the method was tested by slightly varying the parameters of the method, namely, the flow rate and pH of the mobile phase.

When developing a method for the simultaneous determination of benzydamine and methylparaben by gas chromatography, the possibility of elution of both analytes simultaneously on a gas chromatographic column was evaluated. To do this, it was necessary to solve the problem of transferring benzydamine hydrochloride to the base to reduce the boiling point. Weakly polar chloroform was used as an extractant. Benzydamine impurity A was used as an internal standard, which is not a product of possible decomposition of the molecule and accordingly will not change its concentration during sample preparation. The gradient parameters of the method were selected so as to simultaneously determine both components.

The method of absorption spectrophotometry was used to develop a method for determining the residual amounts of API on the surface of the equipment. The maximum allowable amounts of API that can be transferred to another drug during the technological process due to cross-contamination were taken into account. It was determined that the maximum allowable amount of benzydamine hydrochloride on the surface of the equipment should not exceed 10 ppm. Determination of API residues is proposed to be performed at a wavelength of 310 nm, because this is the wavelength where the maximum absorption is observed at a given concentration. The specificity

of the method was proved by the lack of effect of placebo on the signal of the desired substance. The correlation coefficient in determining the linearity of the method was 0.999. The coefficient of variation of the definition did not exceed 1%.

To enhance the antibacterial effect of benzydamine oromucosal spray it was proposed the adding of essential oil into the composition of the spray. Oil screening was performed by comparative studying of the antimicrobial action of benzydamine solutions after adding of essential oils as eucalypt, lavender and peppermint respectively. Peppermint essential oil has been shown the highest enhance of antibacterial effect of benzydamine solution.

To quantify the components of the original combination spray, the possibility of further implementation of the "green chemistry" approach was considered, which would allow the simultaneous determination of API, preservative and menthol as marker component of essential oil. The method developed before for the simultaneous determination of benzydamine and methylparaben by gas chromatography was taken as a basis. The determination was performed after preliminary extraction components with chloroform. The calculation of the quantitative content of the components was performed through the relationship to the internal standard. Sufficient separation of all analytes from drug matrix components was shown. The coefficient of linearity for all detectable components was more than 0.999. The correctness and reproducibility of the quantification were established. RSD% for all components does not exceed 0.25% for five parallel injections. The reliability of the procedure was studied by varying the parameters of the method, namely the initial temperature, the velocity of the mobile phase and the sample volume.

The proposed methods are implemented by JSC "Farmak" into the internal specification for the control of the finished dosage forms.

Keywords: benzydamine hydrochloride, green chemistry, quality control, validation, HPLC, gas chromatography.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТ – акціонерне товариство
АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт
БФ – Британська фармакопея
ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія
ГХ – газова хроматографія
ДФУ – Державна фармакопея України
ЄФ – Європейська фармакопея
ЛЗ – лікарський засіб
НПЗЗ – нестероїдні протизапальні засоби
НФаУ – Національний фармацевтичний університет
ОФ ВЕРХ – обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія
ТШХ – тонкошарова хроматографія
УВЕРХ – ультрависокоефективна рідинна хроматографія
УФ – ультрафіолетова
ХМАПО – Харківська медична академія післядипломної освіти
ІСН – Міжнародна конференція з гармонізації технічних вимог до лікарських засобів для людини
PICS – Pharmaceutical inspection cooperation scheme

Підписано до друку 18.03.2021 р. Формат 60×84/16.
Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman. Друк цифровий.
Ум. друк.арк.0,9. Наклад 100 пр. Зам. № б/н.
Надруковано ФОП Пісня О. В., м. Харків, вул. Гіршмана 16-а
Свідоцтво про державну реєстрацію В02 № 248750 від 13.09.2007 р.