

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

Фармацевтичний факультет

Спеціальність – 226 «Фармація, промислова фармація»

Кафедра аналітичної, фізичної та колоїдної хімії

Допущено до захисту
Протокол засідання кафедри
№ _____ від “ _____ ” 2023р.

Завідувачка кафедри
Аналітичної, фізичної та колоїдної
хімії
Кандидат хімічних наук, доцент
Зайцева Г.М.

КВАЛІФІКАЦІЙНА ВИПУСКНА РОБОТА

**Кількісне визначення ітраконазолу у твердих лікарських формах
методом високоефективної рідинної хроматографії**

Виконала: студентка 5-го курсу, групи
8803 фармацевтичного факультету

Кисіль Ірина Ігорівна

Науковий керівник:

Професор кафедри
аналітичної, фізичної та колоїдної
хімії, доктор педагогічних наук,

Рева Тетяна Дмитрівна

Рецензент:

Доцент кафедри ліків та лікарської
токсикології

Головченко Оксана Іванівна

Київ – 2023

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів	4
Вступ.....	5
Розділ 1. Ітраконазол, методи визначення.....	8
1.1. Застосування ітраконазолу.....	8
1.2. Фізико-хімічні властивості ітраконазолу.....	8
1.3. Механізм дії та метаболізм ітраконазолу.....	9
1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.....	10
1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення.....	14
1.6. Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).....	15
Розділ 2. Експериментальна частина.....	16
2.1. Матеріали та методи.....	16
2.1.1. Мета дослідження.....	16
2.1.2. Об'єкти дослідження.....	16
2.1.3. Посуд та обладнання.....	17
2.1.4. Реактиви.....	17
2.1.5. Методика та умови хроматографування.....	18
2.1.6. Приготування стандартного розчину.....	18
2.1.7. Приготування розчину досліджуваного зразка.....	18
2.1.8. Розрахунок результатів.....	19
2.2. Переваги хроматографа, за допомогою якого було здійснено дослідження.....	20
2.3. Пробопідготовка.....	21
2.4. Регенерація колонки.....	21
2.5. Захист хроматографічної колонки.....	22
Розділ 3. Результати та їх обговорення.....	23
3.1. Вибір оптимального температурного режиму хроматографічної колонки.....	23
3.2. Вибір довжини хвилі детектування.....	24

3.3 Градувальна залежність площі піку від концентрації стандартного розчину для подальшого кількісного визначення ітраконазолу у лікарській формі.	24
3.3.1. Лінійність.	..24
3.4. Визначення ітраконазолу у лікарських формах.	...26
3.5. Валідація методики.	...30
3.5.1. Перевірка специфічності методики.	30
3.5.2. Перевірка лінійності методики.	31
3.5.3. Перевірка прецизійності методики.	32
3.5.4. Перевірка правильності методики.	34
3.6. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення ітраконазолу.	
Висновки.	36
Список використаної літератури.	37
Додатки.	40

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ТШХ – тонкошарова хроматографія

ДФУ – державна фармакопея України

Ph.Eur. – European Pharmacopoeia

CYP3A4 – цитохром P₄₅₀3A4

ERG11 – стерол-14-деметилаза

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

HClO₄ – перхлоратна кислота

CO₂ – Карбону (II) оксид

GLP – належна лабораторна практика

GMP – належна виробнича практика

ISO – міжнародна організація зі стандартизації

ТЛФ – тверда лікарська форма

ЛЗ – лікарський засіб

г – грам

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мл – мілілітр

нм – нанометр

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

С⁰ – градуси Цельсія

ВСТУП

Лікарські засоби (ЛЗ), до складу яких входить тріазольний цикл, широко розповсюджені у медичній та фармацевтичній практиці як препарати, які ефективно застосовуються при лікуванні (в залежності від замісників по 1,2,4-тріазоловому циклу) широкого кола захворювань оскільки проявляють протигрибковий, противірусний, протипухлинний та ранозагоючий ефекти[1].

Грибкові інфекції виникають через багато різних причин. Розвитку захворювання сприяє екологія, вологий клімат, тому заразитися легко як дітям, так і дорослим. Одна людина з грибковою інфекцією може заразити всю родину. Патологія цього захворювання є достатньо поширеною проблемою. За даними світових експертів до 30 % всього населення планети Земля страждають від грибкових захворювань, а в деяких професійних спільнотах ця цифра досягає 75% [1]. Причини цього інфекційного захворювання (мікозу) знаходяться у контактній взаємодії шкірного покриву здорової людини зі збудником. Але не будь який контакт зі спорами патогенного грибка приводить до зараження. Організм людини, яка не хворіє, має достатньо механізмів, які дозволяють запобігти інфекції або ефективно з нею боротися. Нажаль, достатньо невеликого дисбалансу організму, і цей самозахист починає давати збій. Прояви мікозу зумовлені руйнівною патогенною дією грибка в епідермісі людини. Активність впливу збудника інфекції є завжди індивідуальною і залежить від цілого ряду чинників, серед яких є індивідуальний імунітет людини, ступінь пошкодження епідермісу, наявність хронічних захворювань (наприклад, печінки). Як правило, після потрапляння в сприятливе середовище, патогенний грибок починає активно розмножуватися у верхньому шарі шкіри. Інкубаційний період залежить від ряду факторів: природи збудника, локалізації процесу тощо.

Мікози класифікують на дві групи: поверхневі та системні[2]. Поверхневими можуть уражатися епідерміс людини, волосся, нігті, слизова оболонка статевих органів та рота, травний тракт (при цьому найбільш розповсюдженими вважаються дріжджеподібні гриби роду *Candida*, зокрема *Candida albicans*). Якщо патологія має більш системний характер (наприклад, захворювання «глибокий мікоз») уражається не тільки епідерміс, а ще і кістки, м'язи, тканини, які приймають участь у сполученні, тобто можна стверджувати, що процес зараження розповсюджується на внутрішні органи.

Для лікування мікозів часто призначають лікарські засоби, до складу яких входить ітраконазол.

Актуальність: Пошук нових методик кількісного визначення лікарських засобів, до складу яких входить тріазольний цикл.

Мета: розробити методику кількісного визначення ітраконазолу у твердих лікарських формах Ітракон, Спораксол, Ітрунгар методом ВЕРХ.

Завдання:

1. Проаналізувати літературні джерела щодо застосування ітраконазолу, фізико-хімічні та фармакологічні властивості, механізм дії та метаболізм ітраконазолу.
2. Проаналізувати методики кількісного визначення ітраконазолу.
3. На основі проведених систематичних досліджень розробити методику кількісного визначення ітраконазолу у твердих лікарських формах Ітракон, Спораксол, Ітрунгар методом ВЕРХ.
4. Провести валідацію методики кількісного визначення ітраконазолу методом ВЕРХ.

Предмет дослідження: Процес високоефективної рідинної хроматографії, який все ширше використовується у медичній та фармацевтичній практиці для кількісного визначення лікарських засобів.

Практичне значення отриманих результатів: завдяки дослідженню процесів адсорбції-десорбції збільшити чутливість кількісного визначення ітраконазолу.

Наукове значення: результатом роботи є нова сучасна альтернативна методика кількісного визначення ітраконазолу у твердих лікарських формах.

Розділ 1. Ітраконазол, методи визначення.

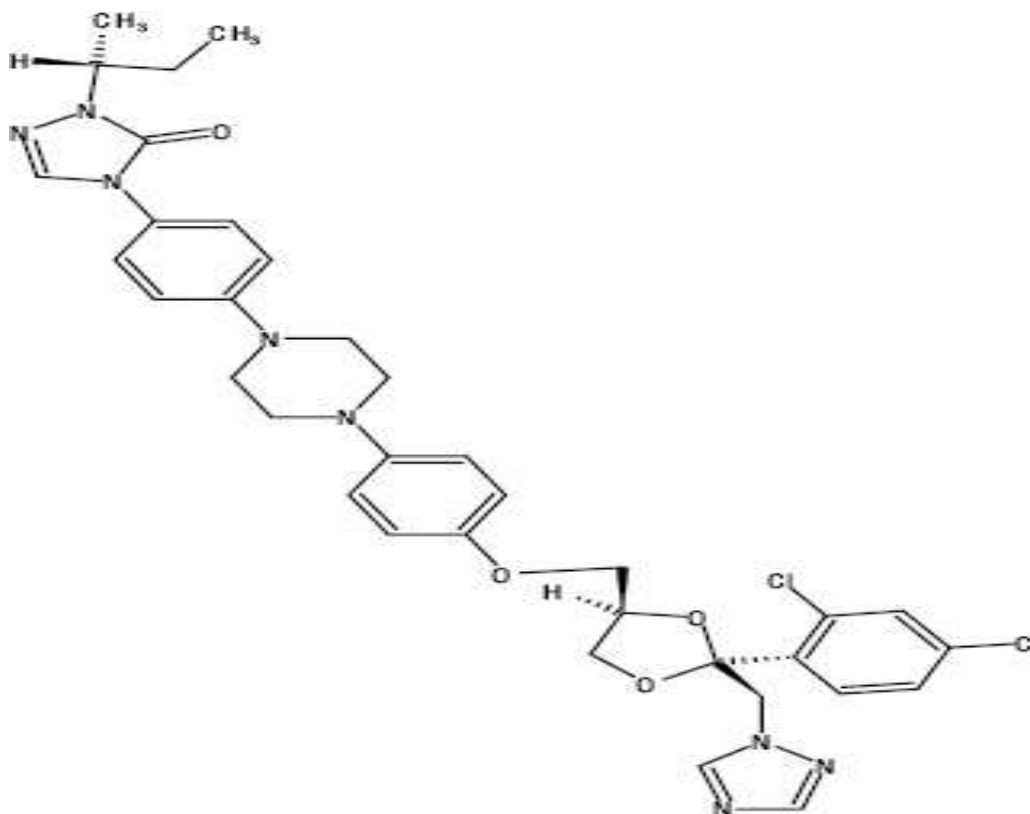
1.1 Застосування ітраконазолу.

Ітраконазол відносять до класу триазолів. Це п'ятичленні гетероциклічні органічні речовини, до складу яких входять три атоми Нітрогену та два атоми Карбону. Ітраконазол має широкий спектр дій, його відносять до групи протигрибкових препаратів оскільки він проявляє фунгіцидну та фунгістатичну дію.

Уперше ітраконазол синтезували у 1984 році працівники бельгійської компанії «JanssenPharmaceutica», препарат мав початкову назву R51211[3].

Ітраконазол відносять до фармакологічної групи J02A C02[4].

1.2. Фізико-хімічні властивості ітраконазолу.



За IUPAC хімічна речовина має наступну назву: 4-[4-[4-[4- [[цис-2-(2,4-дихлорофеніл)-2-(1H-1,2,4-тріазол-1-ілметил)-1,3-діоксолан-4-іл]метокси]

феніл] піперазин-1-іл]феніл]-2-[(1RS)-1-метилпропіл]-2,4-дигідро-3Н-1,2,4-тріазол-3-он.

Молекулярна формула: $C_{35}H_{38}Cl_2N_8O_4$

Молекулярна маса становить 705,64 г/моль.

Ітраконазол є препаратом синтетичного походження. За зовнішнім виглядом це білий кристалічний порошок, практично нерозчинний у воді, але сполука легко розчиняється в органічних розчинниках, наприклад у хлороформі, слабкорозчинна у органічних спиртах[4].

Деякі фізико-хімічні характеристики ітраконазолу наведені нижче:

$T_{пл} = 166\text{--}170\text{ }^{\circ}\text{C}$. pK_a 3,7. $[\alpha]_D^{20}$ від $-0,10^{\circ}$ до $+0,10^{\circ}$. Коефіцієнт розподілу в системі октанол — вода =5,66.

Зберігають ітраконазол у щільно закріпленому хімічному посуді, контейнері з темного скла без доступу повітря [4].

1.3. Механізм дії та метаболізм ітраконазолу.

Механізм дії ітраконазолу схожий на механізм, які проявляють сполуки класу триазолів, тобто ітраконазол запобігає утворенню ергостеролу клітинних стінок грибів, виявляючи вплив ферменту, який залежить від цитохрому Р-450 (наланостериндиметилаза). Ітраконазол метаболізується переважно у печінці за участю СYP3A4, утворює велику кількість похідних, наприклад гідроксиітраконазол. Останній також проявляє протигрибкову дію[5]. Ітраконазол гальмує метаболізм ліків, що розщеплюються різними ферментами типу СYP3A4. Це, у свою чергу, приводить до виникнення можливих побічних реакцій. Деякі лікарські засоби (астемізол, бепридил, цизаприд, дофетилід, левацетилметадол тощо) протипоказані для прийому під час лікування ітраконазолом.

1.4. Фармакологічні ефекти, побічні ефекти та передозування.

Як було зазначено раніше, ітраконазол гальмує синтез ергостеролу в клітинах грибів (дослідження *in vitro*) [6]. Ергостерол є важливим компонентом клітинних мембран грибів, його протигрибкова дія досягається шляхом пригнічення його синтезу.

Ітраконазол гальмує зростання широкого кола грибів, які вважаються патогенними для організму у концентраціях ≤ 1 мкг/мл:

- дерматофіти (*Trichophyton spp.*, *Microsporum spp.*, *Epidermophyton floccosum*);
- дріжджі (*Candida spp.*, включаючи *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* та *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia spp.*, *Trichosporon spp.*, *Geotrichum spp.*), *Aspergillus spp.*; *Histoplasma spp.*, включаючи *H. capsulatum*; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Sporothrix schenckii*; *Fonsecaea spp.*; *Cladosporium spp.*; *Blastomyces dermatitidis*; *Coccidioides immitis*; *Pseudallescheria boydii*; *Penicillium marneffeii* та інші різновиди дріжджів та грибків.

Відомо, що *Candida krusei*, *Candida glabrata* та *Candida tropicalis* є найменш чутливими видами *Candida*, а деякі види взагалі демонструють резистентність до ітраконазолу *in vitro*. Не пригнічуються ітраконазолом зигоміцети (*Rhizopus spp.*, *Rhizomucor spp.*, *Mucor spp.*, та *Absidia spp.*, *Fusarium spp.*, *Scedosporium proliferans* та *Scopulariopsis spp.*). Звикання до сполук класу «азоли» зростає повільно, як правило, це є результатом постадійних генетичних мутацій. Ці механізми включають надлишкову виразність ERG11, сполука, яка у свою чергу, гальмує дію 14-диметилази, є стартом до початку точкових змін (мутацій) у ERG11. Відповідно, це призводить до зменшення афінності 14-деметилази до речовини ітраконазол і у результаті цього - зростанню відтіку ітраконазолу з грибкових клітин. У

літературі неоднаразово було повідомлення щодо резистентності ітраконазолу до штамів *Aspergillus fumigatus*[5-7].

Найвищі концентраційні значення ітраконазолу в плазмі після перорального застосування досягаються вже через 2 години [6-7]. Через нелінійну фармакокінетику ітраконазол накопичується в плазмі при повторному прийомі. Рівноважні концентрації зазвичай досягаються протягом 15 діб з максимальними концентраціями 0,5 мкг/мл, 1,1 мкг/мл та 2,0 мкг/мл після прийому їжі 100 мг один раз на добу, 200 мг один раз на добу та 200 мг двічі протягом доби. Час, за який діюча речовина наполовину виводиться з організму, зростає з 15 до 29 годин. Після завершення процесу лікування концентрація діючої речовини ітраконазол стає майже нульовою у плазмі протягом 14 діб. У літературних джерелах зазначено, що показник «середній плазмовий кліренс» після внутрішньовенного введення приймає значення 278 мл/хв[8], але завдяки насиченому печінковому метаболізму показник кліренсу знижується при використанні більш концентрованих доз [8-9].

Переважаю ітраконазол призначають перорально, оскільки лікарська форма має при цьому найбільший відсоток всмоктування і максимальна концентрація досягається протягом 5 годин після прийняття дози, рекомендованою лікарем. Зазначено, що абсолютна біодоступність при цьому досягає 60 %. Окремо у літературних джерелах зроблено наголос на тому, що максимальна біодоступність спостерігається після прийому висококалорійної їжі [10-12].

Всмоктування діючої речовини ітраконазол у лікарській формі знижується у хворих зі зниженою кислотністю шлункового соку, у хворих, які приймають лікарські засоби, що гальмують секрецію шлункового соку (інгібітори помпи або антагоністи рецепторів), а також у хворих з ателектазом унаслідок деяких захворювань. У такому випадку у хворих одночасний прийом лікарської форми ітраконазолу з газованими напоями збільшує адсорбцію ітраконазолу натщесерце.

Максимальна частина діючої речовини ітраконазол зв'язується з білками плазми (99,7%). Зробимо наголос на тому, що основним зв'язуючим компонентом є альбумін (99,6% для гідроксиметаболітів) оскільки він має високу спорідненість до жирів. Тільки приблизно 0,2% ітраконазолу залишається у крові у вигляді вільної речовини. Таким чином, помітний розподіл ітраконазолу є достатньо великим, що свідчить про широкий розподіл діючої речовини у тканинах. Концентрація у внутрішніх органах організму людини та м'язах у 2 рази перевищує концентрацію у плазмі крові. Накопичення речовини ітраконазол в епідермісі у 4 рази було більшим, ніж у плазмі крові. Навпаки, концентрація у спинномозковій рідині виявилася значно нижчою, ніж у плазмі, але, було показано, що ітраконазол ефективний проти інфекцій, які локалізовані саме у спинномозковій рідині[10-13].

Треба зазначити, що ітраконазол здебільшого розщеплюється у печінці організму з утворенням низки метаболітів. Основний фермент, який приймає участь у метаболізмі ітраконазолу є CYP3A4. Визначено, що основним метаболітом є гідроксиітраконазол, який має протигрибкову дію, порівнянну з ітраконазолом. Концентрація гідроксиітраконазолу у плазмі крові приблизно у 2 рази перевищує концентрацію ітраконазолу.

Після перорального прийому ітраконазол виводиться у вигляді неактивних метаболітів (35% із сечею та 54% з калом) протягом 7 днів. При внутрішньовенному введенні ниркова екскреція ітраконазолу та його активного метаболіту гідроксиітраконазолу становить менше 1% від дози. Швидкість виведення незміненого препарату з фекаліями становить 3-18% [10-13].

Побічними реакціями вважають реакції з боку травної системи організму, нейропатія, головний біль, іноді запаморочення а також алергічні реакції дерматологічного та печінкового походження.

При обговоренні фармакологічної дії ітраконазолу треба зупинитись на його особливості застосування. Не бажано призначати препарат вагітним жінкам (тільки при системних мікозах і у випадку, коли інші лікарські форми не приносять терапевтичного ефекту). Жінкам, які годують груддю дитину, препарат слід призначати обережно і тільки у випадку, якщо очікуваний ефект терапії перевищує ризик небажаного впливу на малюка. З обережністю треба призначати препарат пацієнтам, які мають підвищений рівень трансамінази у крові, якщо терапевтичний ефект від лікування ітраконазолом перевищує ризик гепатотоксичної дії. Необхідно контролювати стан печінки у пацієнтів, які страждають цирозом або мають порушення функції нирок, якщо курс лікування триває більше 30 діб і з'являються побічні ефекти (біль у животі, нудота, блювання тощо). На сьогодні недостатньо даних для того, щоб призначати препарат дітям. Слід обережно призначати препарат пацієнтам, які мають чутливість до лікарських форм, діючу речовину яких відносять до групи азолів [14-16].

Результати досліджень не показали випадки про передозування. Ітраконазол не виводиться за допомогою процедури гемодіалізу. Антидот ітраконазолу не визначено [16].

1.5. Методи ідентифікації та кількісного визначення.

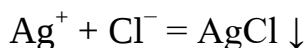
За ДФУ[17] ітраконазол ідентифікують:

- за ІЧ-спектром поглинання субстанції;
- визначають $T_{пл}$ методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) у системі розчинників амонію ацетат-діоксану-метанол (20:40).

Тонкошарова хроматографія, як метод розділення та ідентифікації сумішей, зоснований на теорії сорбції та на різній властивості ліофільності та ліофобності рухомої та нерухомої фаз. З точки зору межі визначення (10^{-9} г), метод вважають достатньо чутливим, нерухомою фазою виступають сорбенти різного виду (силікагелі, у тому числі і хімічно-модифіковані, оксид алюмінію тощо).

Крім того, проводять реакцію на хлориди:

При додаванні до досліджуваного розчину розчинних солей Аргентуму (як правило, Аргентум (I) нітрату) утворюється білий осад, який розчиняється у надлишку реагенту з утворенням безбарвної комплексної сполуки:



Кількісно ітраконазол визначають безводним ацидиметричним титруванням розчином 0,1 М кислоти перхлоратної у середовищі льодяної етанової кислоти і метилетилкетону [17]. За Європейською фармакопеею [18] ітраконазол кількісно визначають титруванням у безводному середовищі методом ацидометричного титрування. Точку еквівалентності фіксують потенціометрично(Додаток 1):

Наважку ітраконазолу розчиняють у невеликій кількості метилкетону та етанової кислоти (70 мл суміші, 7:1). Перемішують 15 хвилин та титрують стандартним розчином $HClO_4$ концентрації 0,1М. [18].

Потенціометричне титрування проводять з використанням електродної пари скляного електроду (як індикаторного) та хлорсрібного електроду (як

порівняння). Основним недоліком цього процесу є те, що при титруванні необхідно вважати заходів щодо захисту розчину, який є стандартом (перхлоратна кислота) від CO_2 повітря. Тому процес титрування проводять в інертній атмосфері (наприклад, атмосфері гелію або азоту).

1.6. Метод ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) є методом розділення, ідентифікації та кількісного визначення речовин. У методі ВЕРХ рухомою фазою є рідина (подається під високим тиском), а нерухомою фазою є тверда речовина [19]. Нерухомими фазами можуть бути силікагелі (у тому числі і хімічно-модифіковані), алюмогелі, Алюмінію (III) оксид тощо. Технічно розділення відбувається у хроматографічній колонці, яка заповнюється нерухомою фазою. Розділення речовин, і, відповідно, ідентифікація або кількісне визначення, базуються на теорії сорбції. Кількісне визначення можна провести або методом абсолютного калібрування або методом внутрішнього стандарту [20]. Результатом методу абсолютного калібрування є побудова залежності площі піків аналізованої речовини від її вмісту (концентрації) у пробі. Іноді цю залежність називають градувальним графіком. Принцип з'ясування цієї залежності простий. Готують серію розчинів з відомою концентрацією (серію стандартних розчинів) і для них проводять вимірювання хроматографічних піків. Для кожного стандартного розчину проводять декілька вимірів, потім визначають середнє значення площі піків для кожної концентрації. Після побудови залежності вимірюють площу піку речовини, концентрація якої невідома, умови хроматографування при цьому не змінюють. Використовуючи градувальний графік, знаходять концентрацію досліджуваної речовини. Як правило, вимірювання проводять декілька разів. У фармацевтичній промисловості процеси спостереження за виконанням нормативних показників дають можливість отримання та контролю лікарських форм на рівні міжнародних стандартів [21-25].

Розділ 2. Експериментальна частина.

Робота була виконана у лабораторії рідинної хроматографії Інституту гігієни та екології НМУ.

2.1. Матеріали та методи.

2.1.1. Мета дослідження. Після ознайомлення з методиками та аналізу методик кількісного визначення ітраконазолу у субстанції та лікарських формах ми вирішили розробити методику кількісного визначення ітраконазолу у твердих лікарських формах методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

2.1.2. Об'єкти дослідження. Для розробки методики було обрано ТЛФ Ітракон, Спораксол та Ітругар. Тверді лікарські форми реалізуються аптеками у капсулах та мають склад:

1) Капсули Спораксолу. Склад: діюча речовина ітраконазол, 1 капсула містить ітраконазолу 100 мг. Допоміжні речовини: цукор сферичний (сахароза, крохмаль кукурудзяний, вода очищена), полоксамер 188, гіпромелоза 6 сР, полоксамер мікронізований, капсула (індигокармін (Е 132), хіноліновий жовтий (Е 104), титану діоксид (Е 171), вода очищена, желатин).

2) Капсули Ітругару. Склад: діюча речовина ітраконазол, 1 капсула містить ітраконазолу 100 мг. Допоміжні речовини: гідроксипропілметилцелюлоза, крохмаль кукурудзяний, сахароза.

3) Капсули Ітракону. Склад: діюча речовина ітраконазол, 1 капсула містить ітраконазолу 100 мг. Допоміжні речовини: гіпромелоза (гідроксипропілметилцелюлоза (Е5)), цукроза (Додаток 2).

Наявність у складі лікарських форм ітраконазолу указана в інструкціях для медичного застосування.

2.1.3. Посуд та обладнання.

1. Мірні колби і піпетки класу точності А.
2. Ділильна лійка місткістю 1000 мл для екстракції.
3. Грушоподібна колба для відгону розчинників.
4. Ротаційний випарник RE-100-PRO.
5. Водяна баня.
6. Хроматограф рідинний Shimadzu LC-10ADvp, зав. № C20964330924CS, свідоцтво про калібрування № 3991 від 05.07.2019 ТОВ «МЕТРОЛОДЖІ СЕРВІС» (Додаток 3).
7. Колонка Nova-Pak C18 150 мм × 3,9 мм (внутрішній діаметр).
8. УФ-детектор 2998 матричний фотодіодний для високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) систем Alliance, фільтр 0,45 мкм.
9. Мікрошприц 50 мкл.
10. Ваги лабораторні електронні аналітичні RADWAG AS 220.R2, зав. № 502964, свідоцтво про калібрування № 3816 від 03.06.2019 ТОВ «МЕТРОЛОДЖІ СЕРВІС».

2.1.4. Реактиви.

1. Фармакопейний стандартний зразок ДФУ Ітраконазол, каталожний номер 10214, реєстраційний номер CAS_84625-61-6.
2. Вода для хроматографії Р, отримана за допомогою установки SimplicityUV, Millipore, USA.
3. Метанол (клас HPLC).
4. Етилацетат (клас HPLC).
5. Ацетонітрил (клас HPLC).
6. Натрію сульфат безводний марки ХЧ.
7. Ізопропанол (клас HPLC).
8. Метиленхлорид (клас HPLC).

9. Гексан (клас HPLC).

2.1.5. Методика та умови хроматографування.

Після приготування розчинної суміші метанол-вода, яка є рухомою фазою при хроматографічному визначенні, на лабораторних терезах зважують 0,1 г зразка та розчиняють наважку у цієї суміші. Струшують протягом 10 хвилин. Потім проводять хроматографію і визначають вміст ітраконазолу.

Умови хроматографічного визначення:

Температурний режим хроматографічної колонки: 34⁰С

Швидкість рухомої фази: 0,8 мл/хв

Склад рухомої фази : Метанол:вода =70:30

Довжина хвилі детектора: 220 нм

Тиск у системі P= 140 Бар

Об`єм інжектування: 20 мкл.

Час утримування: 7 хвилин.

2.1.6. Приготування стандартного розчину.

Фармакопейний стандартний зразок зважують на лабораторних терезах (маса наважки 0,1 г) і розчиняють у 40 мл метанолу. Струшують протягом 15 хвилин, доводять водою до 50 мл, охолоджують при необхідності до кімнатної температури.

2.1.7. Приготування розчину досліджуваного зразка.

Після процедури пробопідготовки (п.2.3.) 0,1 г змісту капсули переносять у мірну колбу на 50 мл, додять метанол приблизно 40 мл та при струшуванні ретельно розчиняють наважку, при необхідності охолоджують до кімнатної температури. Доводять водою до риси.

2.1.8. Кількісне визначення.

Масу діючої речовини ітраконазол розраховують за формулою:

$$m, \text{мг} = R_2 \times m_1 \times A / R_1 \times m_2$$

де R_1 = площа піку стандартного розчину (середнє значення);

R_2 = площа піку зразка (середнє значення);

m_1 = маса стандарту;

m_2 = маса зразка;

A = чистота стандарту, вважається 1.

2.2. Переваги хроматографа, за допомогою якого було здійснено дослідження.

Для виконання дослідження було обрано такий хроматограф тому, що він має низку переваг:

1. Висока продуктивність. Завдяки новому автосамплеру швидкість інжектування може досягати 0,67 мкл/сек.
 2. Повна автоматизація та комп'ютеризація. Хроматограф дозволяє повністю зробити процес розділення суміші або ідентифікації автоматичним, промивка колонки та її кондиціонування відбувається в автоматичному запрограмованому режимі, і, іноді, при відсутності інженера.
 3. Автоматична валідація системи. Валідація приладів є одним з найважливіших та необхідніших кроків при використанні обладнання та роботі лабораторій, відділів контролю тощо. Хроматограф LC-2010 має вбудовану функцію автовалідації відповідно до вимог GLP/GMP або ISO. Результати хроматографування автоматично заносяться до звітів.
- Валідація аналітичного обладнання відповідно до вимог - одна з необхідних складових у роботі акредитованих контрольно-аналітичних лабораторій та відділів контролю якості виробництв.
4. Простота в обробці результатів та у використанні. Параметри аналізів задаються вручну або автоматично, режими хроматографування можуть бути статичними, ізократичними або градієнтними.

2.3. Пробопідготовка.

Капсулу твердої лікарської форми розкривають (кожну окремо), зміст переносять у мірну колбу на 0,5 л, розчиняють у воді, постійно при цьому струшують розчин, доводять водою до риси. Наступним кроком поміщають приготовану суспензію у ділильну воронку на 1 л. Екстрагують трьома порціями діючу речовину ітраконазол етилацетатом (кожна по 50 мл), струшуючи лійку впродовж 1-2 хвилин. Після екстракції органічні фракції етилацетату об'єднують у мірний посуд місткістю 0,25 л. Об'єднаний екстракт висушують безводним Na_2SO_4 (наважка Na_2SO_4 приблизно 20 г) 60 хвилин. Потім екстракт переносять у грушоподібну колбу для відгону місткістю 0,25 л і концентрують на ротаційному випарнику при температурі водяної бані не вище 45°C до об'єму 0,2-0,3 мл. Сухий залишок отримують остаточним випаровуванням розчинника на повітрі.

2.4. Регенерація колонки.

У результаті роботи нами були розроблені кроки, які дозволяють, при необхідності, регенерувати хроматографічну колонку, а саме:

1. Приєднати колонку до хроматографа у протилежному напрямку.
2. Промити колонку зворотнім струмом 25 мл дистильованої води зі швидкістю 0,2-0,3 мл/хв.
3. Промити колонку 25 мл розчину ізопропанолу зі швидкістю 0,2-0,3 мл/хв.
4. Промити колонку 25 мл розчину метиленхлориду зі швидкістю 0,5 мл/хв.
5. Промити колонку 25 мл розчину гексану зі швидкістю 0,5 мл/хв.
6. Промити колонку ще раз 25 мл розчину метиленхлориду зі швидкістю 0,5 мл/хв.

7. Промити колонку ще раз 25 мл розчину ізопропанолу зі швидкістю 0,2-0,3 мл/хв.
8. Приєднати колонку звичайним способом.
9. Привести колонку до рівноваги 25-50 мл рухомої фази.
10. Ввести пробу або стандартний розчин для впевнення, що колонка регенерована.

2.5. Захист хроматографічної колонки.

Накопичення домішок, що сильно утримуються, на нерухомій фазі колонки може істотно скоротити термін її служби. Скорочуючи активну площу поверхні нерухомої фази, ці домішки викликають зміщення часів утримання, погіршення роздільної здатності та форми піків.

Найкращим способом захисту аналітичної хроматографічної колонки від такого роду забруднень є встановлення передколонки у лінію між інжектором та аналітичною хроматографічною колонкою.

Рекомендується використовувати передколонки з сорбентом, аналогічним сорбенту в аналітичній хроматографічній колонці. При цьому передколонки повинні бути прості у використанні і не повинні знижувати ефективність аналітичної хроматографічної колонки.

Важливим параметром передколонки є мертвий об'єм. Конструкція з універсального тримача та змінного картриджа дозволяє максимально знизити мертвий об'єм.

Розділ 3. Результати та їх обговорення.

Однією з задач при підготовці методики кількісного хроматографічного визначення є вибір оптимального температурного режиму хроматографічної колонки та вибір хвилі детектування аналізованої речовини.

3.1. Вибір оптимального температурного режиму хроматографічної колонки.

Для вибору оптимального температурного режиму хроматографічної колонки була встановлена залежність тиску у хроматографічній колонці від температури (Рис.1.):

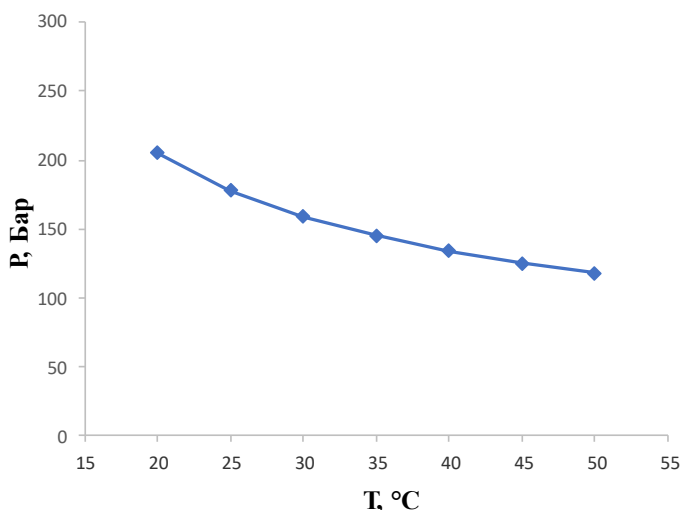


Рис. 1. Графічна залежність тиску у хроматографічній колонці від температури.

Для проведення у подальшому кількісного визначення ітраконазолу у твердих лікарських формах було обрано температуру 35°C, оскільки, як показали дослідження, при такій температурі знижується тиск, і відсутні ризики руйнування силікагелю в результаті гідролізу. Для визначення такої залежності використовували модельний розчин ітраконазолу з концентрацією 100 мкг/л, який готували за стандартною методикою (п.2.1.6.).

3.2. Вибір довжини хвилі детектування.

З аналізу літературних джерел обрано хвилю детектування 232 нм, яка є максимумом спектру поглинання ітраконазолу [26].

3.3. Градувальна залежність площі піку від концентрації стандартного розчину для подальшого кількісного визначення ітраконазолу у твердій лікарській формі.

Для побудови градувального графіку готували серію стандартних розчинів ітраконазолу з концентраціями 80, 100 та 120 мкг/мл шляхом розведення попередньо приготованого розчину (стандартний розчин готували згідно п.2.1.6). Проводили хроматографічний аналіз проб та фіксували висоту піків. Потім будували градувальну залежність площі піку від концентрації стандартного розчину.

Хроматограми зразків стандартних розчинів для наочності представлені у Додатках 4,5,6.

3.3.1. Лінійність.

Очікувані результати мають бути лінійними і для цієї залежності повинні виконуватися такі умови:

1. Вільний член a повинен статистично не відрізнятися від нуля. Критерій статистичної незначущості – параметр a не повинен перевищувати свій довірчий інтервал.

2. Коефіцієнт кореляції (R^2) має бути не менше 0,999.

3. Значення $a/st100\%$ не більше 3,18 %.

Лінійність методики досліджували в діапазоні концентрацій від 80 до 120 мкг/мл.

Вимірювання проводили для приготованих 6 розчинів різної концентрації (п'ять послідовних інжекцій різних зразків y_1 , y_2 , y_3 , y_4 , y_5 , y_6).

За результатами побудовано залежність виду $y=a \cdot x+b$ в нормалізованій системі координат.

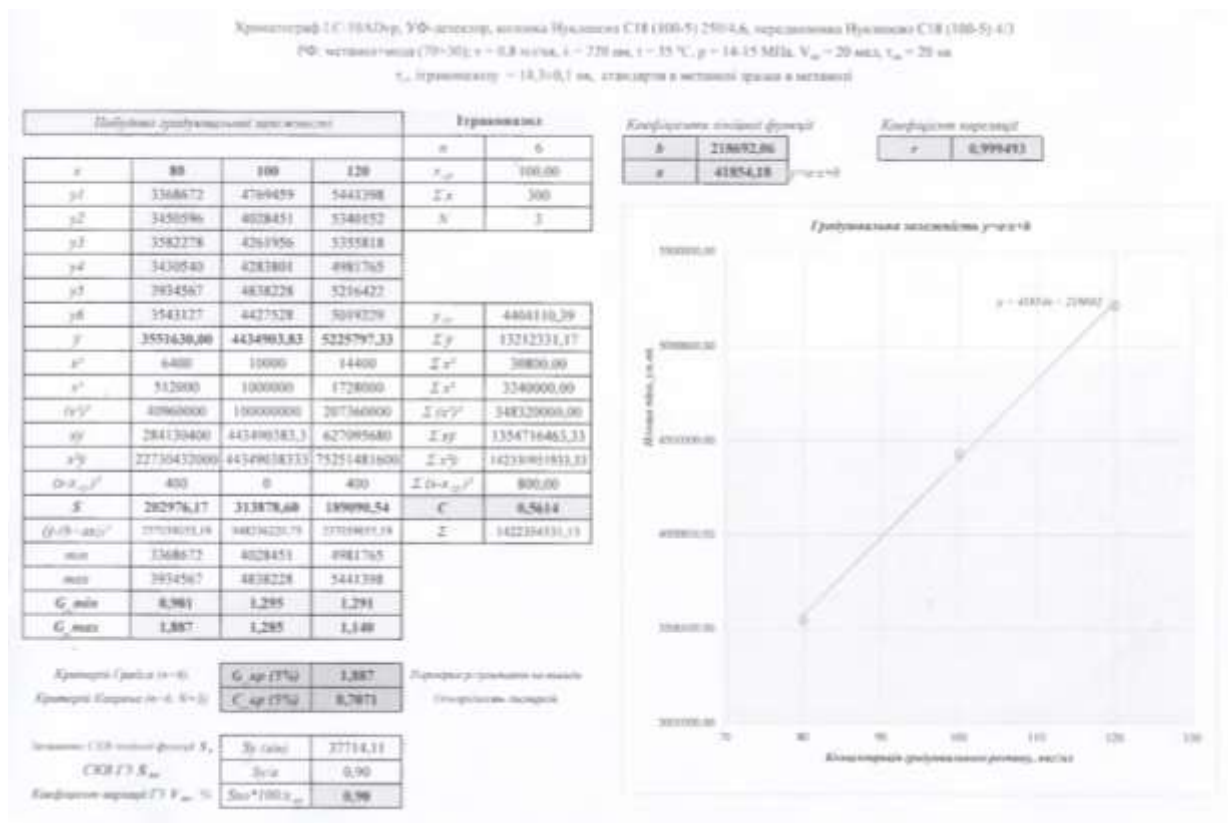


Рис 2. Градувальна залежність площі піку від концентрації стандартного розчину в нормалізованій системі координат.

Враховуючи вищезазначене (Рис.2), маємо висновки:

1. Перевірка результату на викіді становить 1,887.
2. Однорідність дисперсії становить 0,7071.
3. Залишкове СКВ лінійної функції становить 37714,11.
4. Коефіцієнт варіації $a/st100\%$ не перевищує 0,9.
5. Практична незначущість вільного члена a становить 2,5 %, що менше критерію 3,2 %, що задовольняє наші вимоги.
6. Лінійна функція описується рівнянням $y = 41854,18a + 218692,06$.
7. Коефіцієнт кореляції $R^2 = 0,9995$, що задовольняє вимогам ДФУ[17].

Таким чином, запропонована методика задовольняє всім розрахованим критеріям. Методика лінійна в досліджуваному діапазоні концентрацій 70-130 мкг/мл.

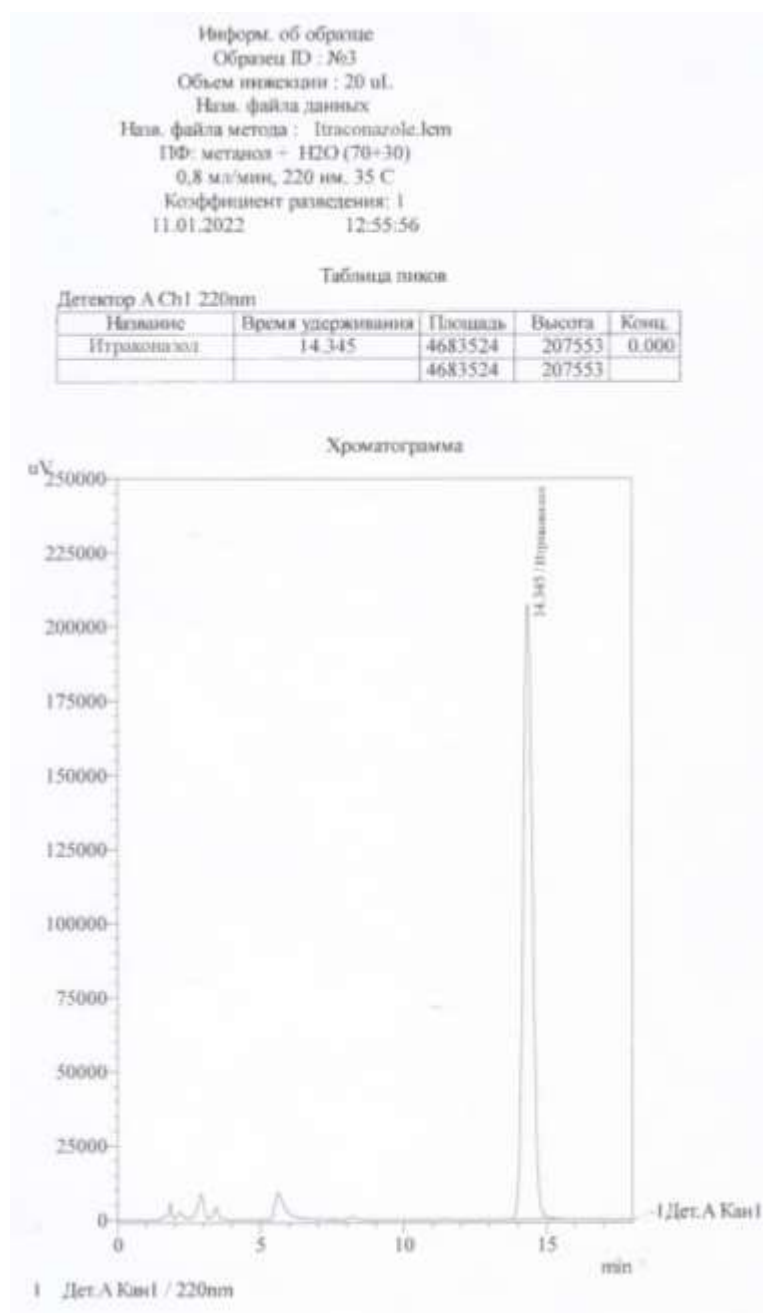
3.4. Визначення ітраконазолу у твердій лікарській формі.

Після побудови градуєвального графіку проводили визначення ітраконазолу у твердих лікарських формах методом ВЕРХ (методика описана у п.2.1.5.). Для цього, після процедури пробопідготовки (процедура пробопідготовки описана у п. 2.3.), відбирали на аналіз 10 мл приготованого розчину та розчиняли метанолом у колбі на 0,2 л.

Кількісне визначення проводили методом абсолютного калібрування (так, як описано у п.1.6), тобто за градуєвальним графіком (Рис.2) визначали концентрацію аналізованої речовини у випробовуваному розчині.

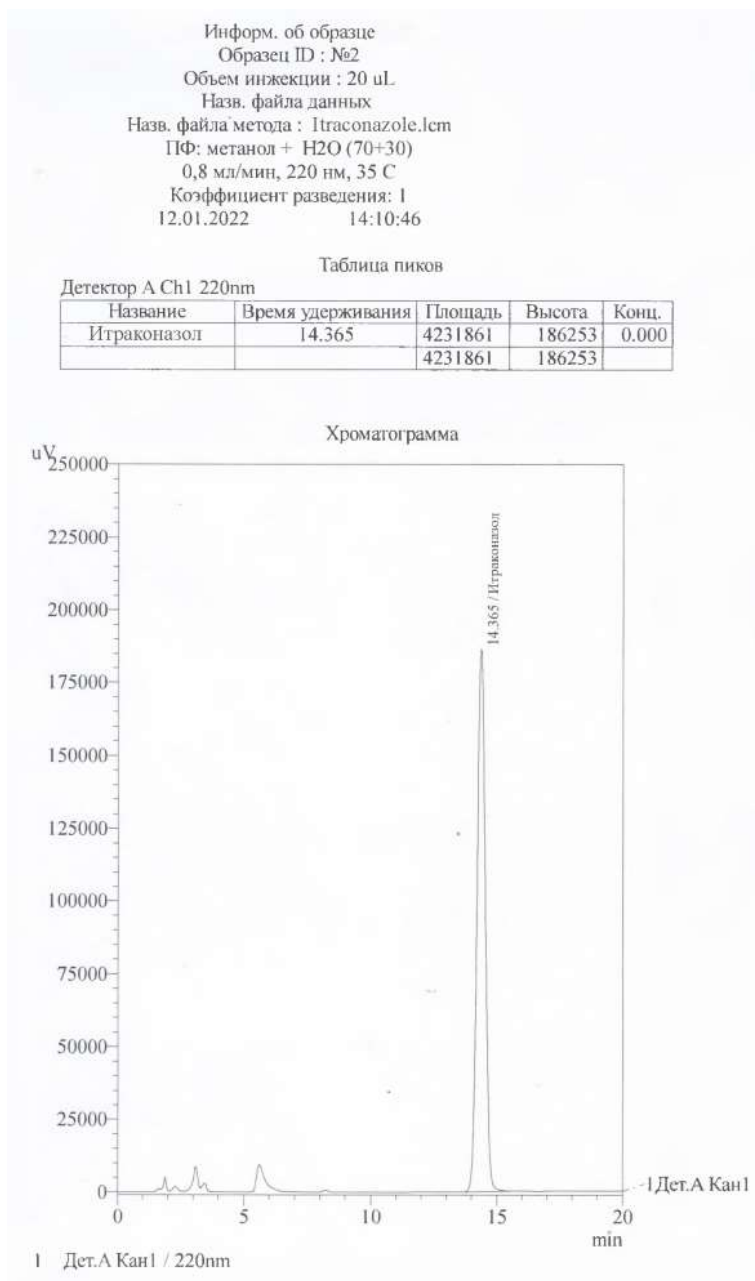
Зразок 1. Тверда лікарська форма Ітракон, маса наважки 100 мкг.

Висота піку, ум.од.	Площа піку, д.р., ум.од.	Вміст д.р., мкг
195120	4429445	101,23



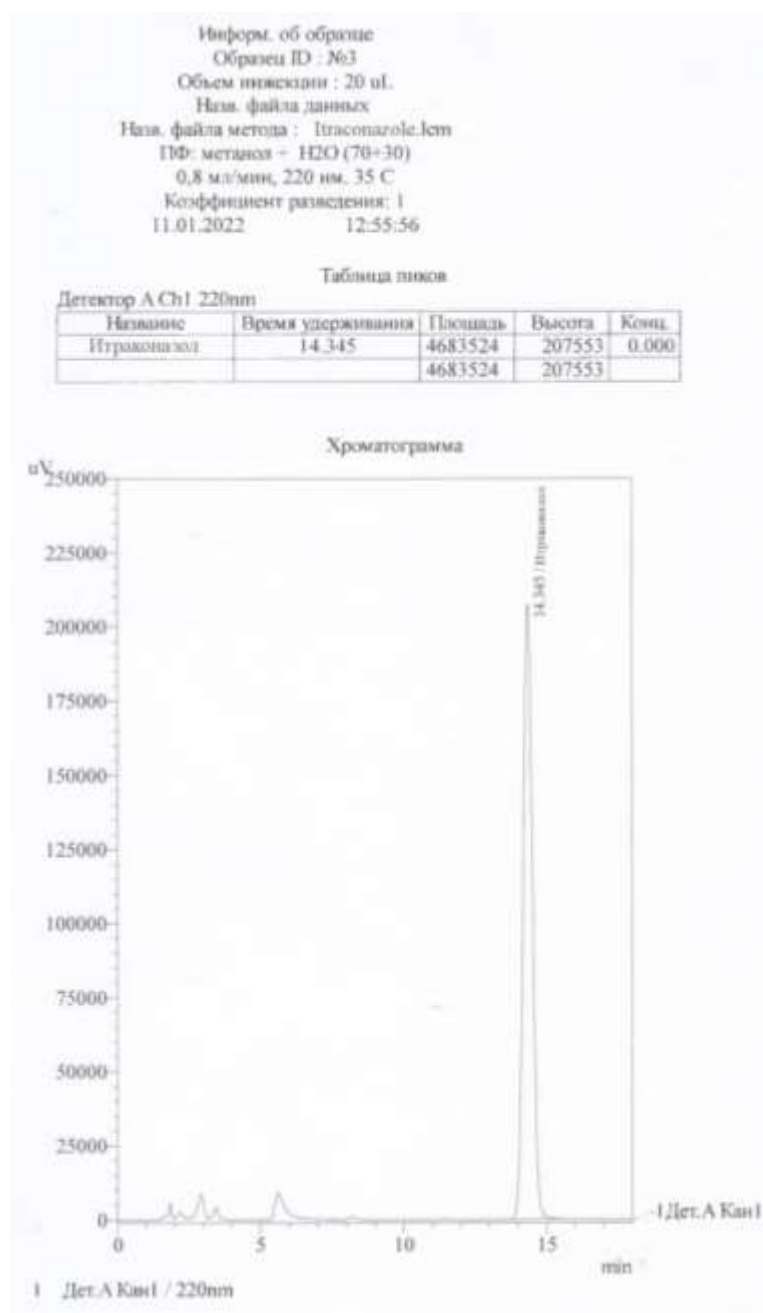
Зразок 2. Тверда лікарська форма Спораксол, маса наважки 100 мкг.

Висота піку, ум.од.	Площа піку, д.р., ум.од.	Вміст д.р., мкг
186253	4231861	101,34



Зразок 3. Тверда лікарська форма Ітрингар, маса наважки 100 мкг.

Висота піку, ум.од.	Площа піку, д.р., ум.од.	Вміст д.р., мкг
4683524	4683524	98,87



3.5. Валідація методики.

Валідацією є експертна оцінка і представлення документально оформлених доказів у відповідності з принципами належної виробничої практики, які з високим ступенем достовірності підтверджують, що будь-які методики, процеси, обладнання, продукція, дії або системи дійсно відповідають своєму призначенню і встановленим вимогам, а їх використання веде до очікуваних результатів[27]. Валідацією називають процес, який дозволяє з'ясувати підтвердження того, що аналітична методика, яка використовується для конкретного визначення підходить для передбачуваного використання.

3.5.1. Перевірка специфічності методики.

Специфічністю називають здатність визначати аналізовану речовину у присутності інших [28].

Оскільки методику ми розробляли безпосередньо на твердих лікарських формах, при перевірці нашої методики кількісного визначення ітраконазолу методом ВЕРХ на специфічність ми порівнювали результати, які були отримані в результаті проведення серії хроматографічних вимірювань з концентрацією діючої речовини ітраконазол, склад якої зазначено в інструкціях для медичного застосування.

Результати представлено у Таблиці 1.

Таблиця 1. Перевірка методики кількісного визначення ітраконазолу методом ВЕРХ на специфічність, Ітракон (зразок 1), Спораксол (зразок 2), Інтрингар (зразок 3).

№	Зразок 1		Зразок 2		Зразок 3	
	a	b	a	b	a	b
1	4429445	101,23	4231861	101,34	4683524	98,87
2	4511369	101,47	4333655	101,43	4562398	98,23
3	4432034	99,87	4556711	102,23	4621233	98,76
4	4533326	102,35	4198755	98,76	4825167	102,67
5	4412898	98,86	4485632	102,56	4425619	97,88
6	4457894	100,76	4538946	102,78	4765296	101,75

a – Площа піку діючої речовини, умовні одиниці

b – Вміст діючої речовини, мкг.

(Критерій Грабса ($n=6$), Критерій Кохрена ($n=6$, $N=3$), перевірка результатів на викиди 1,887, однорідність дисперсій 0,707, Коефіцієнт варіації $a/st100\%$ не перевищує 0,9).

3.5.2. Перевірка лінійності методики.

Лінійністю називають здатність запропонованої методики підтримувати пряму пропорційну залежність площі піку від концентрації досліджуваної речовини.

При побудові градувального графіку лінійність залежності площі піку від концентрації стандартних розчинів була продемонстрована на Рис.2.

3.5.3. Перевірка прецизійності методики.

Прецизійність, або точність аналітичної методики [29], як правило, характеризують дисперсією, стандартним відхиленням або відносним стандартним відхиленням для серії вимірювань. Поруч з прецизійністю дослідник вивчає робасність методики, тобто здатність запропонованих аналітичних дій не піддаватись різним впливам (зовнішнім та внутрішнім), які може контролювати дослідник. Робасність методики визначають за допомогою аналізу ідентичних зразків у різних лабораторних умовах (температура приміщення, різні реактиви та обладнання, виконання аналізу різними операторами аналітичних лабораторій тощо). У нашому випадку робасність перевірялась за допомогою іншого оператора. Нижче продемонстровано результати проведених досліджень:

Ітракон (зразок 1)

	Оператор 1	Оператор 2	Критерій
	Вміст діючої речовини, мкг		(різниця значень, %)
1	101,23	99,56	Не більше 2,0
2	101,47	103,12	Не більше 2,0
3	99,87	102,34	Не більше 2,0
4	102,35	101,68	Не більше 2,0
5	98,86	101,26	Не більше 2,0
6	100,76	101,65	Не більше 2,0

Спораксол (зразок 2)

	Оператор 1	Оператор 2	Критерій
	Вміст діючої речовини, мкг		(різниця значень, %)
1	101,34	98,22	Не більше 2,0
2	101,43	102,56	Не більше 2,0
3	102,23	103,13	Не більше 2,0
4	98,76	100,45	Не більше 2,0
5	102,56	102,98	Не більше 2,0
6	102,78	100,68	Не більше 2,0

Інтругар (зразок 3)

	Оператор 1	Оператор 2	Критерій
	Вміст діючої речовини, мкг		(різниця значень, %)
1	98,87	99,78	Не більше 2,0
2	98,23	101,42	Не більше 2,0
3	98,76	101,97	Не більше 2,0
4	102,67	100,89	Не більше 2,0
5	97,88	98,86	Не більше 2,0
6	101,75	99,97	Не більше 2,0

3.5.4. Перевірка правильності методики.

Правильність методики є критерієм, який характеризує відповідність отриманого значення відомим значенням (у нашому випадку масу визначуваної речовини ітраконазолу ми порівнюємо з масою діючої речовини ітраконазол у лікарських формах згідно з інструкціями для медичного застосування).

Висновок про правильність методики оцінюється після встановлення прецизійності, лінійності та специфічності [28-29].

Правильність виражають у відсотках знайденого значення від введеної кількості або як різниця між середнім і істинним значенням з урахуванням відповідних довірчих інтервалів [29]. Враховуючи вищезазначені результати, методику кількісного визначення ітраконазолу у твердих лікарських формах методом ВЕРХ можна вважати правильною.

3.6. Порівняльний аналіз методик кількісного визначення ітраконазолу.

Згідно з ДФУ та Європейською фармакопеею кількісно ітраконазол у субстанції визначають ацидометрично у неводному середовищі з визначенням точки еквівалентності потенціометричним методом. Потенціометричний метод визначення має достатньо недоліків:

- трудомісткість процесу;
- необхідність стандартизації робочого розчину перхлоратної кислоти;
- токсичність перхлоратної кислоти;
- стандартизація електродів визначення та порівняння;
- інертна атмосфера при проведенні титрування;
- необхідність використання певних заходів щодо захисту стандарту HClO_4 ;
- налаштування та стандартизація приладу, за допомогою якого проводять визначення точки еквівалентності.

В той же час високоефективна рідинна хроматографія дозволяє проводити найточніші екологічні, медичні, фармацевтичні дослідження. Завдяки суворого дотримання технологічних характеристик остаточні результати мають високий рівень автентичності, тому метод ВЕРХ, як альтернативний, можна використовувати для кількісного визначення ітраконазолу у твердих лікарських формах. Перевагами методу ВЕРХ можна вважати високу продуктивність, повну автоматизацію, автоматичну валідацію системи відповідно до вимог GLP/GMP або ISO, простоту у використанні та обробці результатів.

ВИСНОВКИ

- Проаналізовано літературні джерела щодо застосування ітраконазолу, фізико-хімічні та фармакологічні властивості, механізм дії та метаболізм ітраконазолу.
- У ДФУ та Європейській фармакопеї наведено методики кількісного визначення субстанції ітраконазол методом ацидиметричного титрування, визначення ітраконазолу методом ВЕРХ у твердих лікарських формах не знайдено.
- На основі проведених досліджень було встановлено кількісний вміст ітраконазолу у твердих лікарських формах Ітракон, Інтругал, Спораксол та запропоновано нову альтернативну методику кількісного визначення ітраконазолу методом високоефективної рідинної хроматографії. Запропонована методика дозволяє значно прискорити швидкість визначення ітраконазолу у лікарських формах, має більш високу точність.
- Проведено валідацію розробленої методики за специфічністю, лінійністю, прецизійністю та правильністю. Встановлено, що валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності згідно ДФУ, що свідчить про те, що дану методику можна використовувати для кількісного визначення ітраконазолу у твердих лікарських формах Ітракон, Інтругал, Спораксол.

Результати роботи були представлені на IV Науково-практичній конференції з міжнародною участю «PLANTA+. НАУКА, ПРАКТИКА ТА ОСВІТА» (Додаток 7).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Всесвітня організація охорони здоров'я <http://www.who.int/en>.
2. Довідник лікарських препаратів Компендіум [Електронний ресурс]. - Режим доступу: <https://compendium.com.ua/>
3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6089654/>
4. <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/3380/itrakonazol>
5. Широбоков В. П. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. закл. / Видання 3-є, перероблене і доповнене / [Широбоков В.П. Климнюк С.І., Понятовський В.А. та ін.]. – Вінниця: Нова Книга, 2021. – 920 с.
6. Широбоков В.П., Климнюк С.І. Мікробіологія, вірусологія та імунологія в запитаннях і відповідях: навч. посіб. / [Широбоков В.П. Климнюк С.І., Корнійчук О.П. та ін.]. – Тернопіль: ТДМУ, 2019. – 564 с.
7. Широбоков В.П., Климнюк С.І. Практична мікробіологія: навчальний посібник / [Климнюк С.І., Ситник І.О., Широбоков В.П. та ін.]. – Вінниця: Нова Книга, 2018. – 576 с.
8. Фармакологія за Рангом і Дейлом, пер.9-го англ.вид. у 2-х томах Т.1/Джеймс М.Рітер, Род Флавер, Грем Гендерсон, Юн Конг Лоук, Девід Мак К'юн, Гемфрі П Ранг; наук.ред.перекл. Ганна Зайченко, Микола Хайтович.- К. ВСВ "Медицина", 2021-588 с.
9. Фармакологія з основами патології / Колесник Ю.М., Чекман І.С., Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Нагорна О.О., Бухтіярова Н.В., Моргунцова С.А., Зайченко Г.В. : підручник. Вінниця: Нова книга, 2021. – 572 с.
10. Побічна дія ліків: підручник для студентів вищих навчальних закладів медичної освіти/Беленічев І.Ф., Горчакова Н.О., Бухтіярова Н.В., Самура Т.А., Бухтіярова Т.А., Нагорна О.О., Моргунцова С.А., Єгоров А.А., Риженко О.В., Тихоновський О.В. Запоріжський державний медичний Університет. Вінниця: Нова книга, 2021. – 360 с.

11. Фармакологія. Підручник для медичних і стоматологічного факультетів Вищих медичних навчальних закладів освіти. І.С.Чекман, В.М.Бобирьов, В.В.Кресюн, В.В.Годован, Н.О.Горчакова, Л.І.Казак, Т.В.Кава, Г.Ю.Островська Т.А.Петрова, Л.М.Рябушко Вінниця: Нова книга, 2020. – 472 с.
12. Довідник еквівалентності лікарських засобів Rx index Спеціалізоване медичне видання / за ред І.А. Зупанця, В.П. Черних 4 вид. Перероблене К.: Фармацевт практик- 2020. – 2033 с.
13. Pharmacology / [M. A. Clark, R. Finkel, J. A. Rey et al.]. – [7th ed.]. – Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins, 2018. – 638 p.
14. www.pharma-center.com.ua.веб-сайт ДЦФ МОЗ України [web-page] URL
15. Rudin CM, Brahmer JR, Juergens RA, Hann CL, Ettinger DS, Sebree R, Smith R, Aftab BT, Huang P, Liu JO (May 2013). "Phase 2 study of pemetrexed and itraconazole as second-line therapy for metastatic nonsquamous non-small-cell lung cancer". Journal of Thoracic Oncology 8 (5): 619–623.
16. Barone JA, Koh JG, Bierman RH, Colaizzi JL, Swanson KA, Gaffar MC, Moskovitz BL, Mechlinski W, Van de Velde V (1993). "Food interaction and steady-state pharmacokinetics of itraconazole capsules in healthy male volunteers". Antimicrob. Agents Chemother. 37 (4): 778–84.
17. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид. Харків, 2015. в 3 т. Т.1. 1128 с.European Pharmacopoeia. 7.0.– P. 2297 – 2299.
18. Аналітична хімія / В.В. Болотов, О.М. Свєчнікова, С.В. Колісник та ін. — Х., 2004; ДФУ. — Х., 2001.
19. Мала гірнича енциклопедія : у 3 т. / за ред. В. С. Білецького. — Д. : Східний видавничий дім, 2013. — Т. 3 : С — Я. — 644 с

20. Дей, Р., Андервуд, А. (1989). *Кількісна аналітична хімія*. (п'яте видання). PEARSON Prentice Hall.
21. Буссі Хуан. (2007). Високопродуктивна рідинна хроматографія. [PDF]. Отримано з: fing.edu.uy.
22. Вікіпедія. (2019). Високоефективна рідинна хроматографія. Відновлено з: en.wikipedia.org
23. Кларк Джим. (2007). Високоефективна рідинна хроматографія. Отримано з: chemguide.co.uk
24. Матвій Баркович. (05 грудня 2019 р.). Високоефективна рідинна хроматографія. Хімія LibreTexts. Відновлено з: chem.libretexts.org
25. Г.П. Томас. (15 квітня 2013 р.). Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) - методи, переваги та застосування. Отримано з: azom.com
26. Фармацевтична хімія: Підручник. Ред. П.О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008 – 560с.
27. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків : РІРЕГ, 2001. С.58 – 67. Доповнення 1. 2004. С. 2 – 4.
28. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц. О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.
29. Haynes W.M. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 94th Edition. CRC Press LLC, Boca Raton. 2013-2014. P. 3–90.

ДОДАТКИ

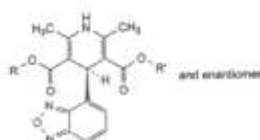
Додаток 1 Витяг з Європейської
Фармакопеї

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0

Itraconazole

01/2011:1335

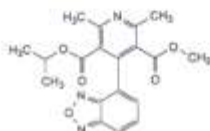
Other detectable impurities (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph *Substances for pharmaceutical use* (2034). It is therefore not necessary to identify these impurities for demonstration of compliance. See also 5.10. *Control of impurities in substances for pharmaceutical use*): C, E.



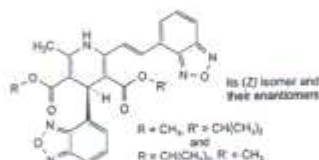
A. $R = C_2H_5$, $R' = CH_3$: ethyl methyl (4*RS*)-4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate.

B. $R = R' = CH(CH_3)_2$: bis(1-methylethyl) (4*RS*)-4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate.

C. $R = R' = CH_3$: dimethyl (4*RS*)-4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate.



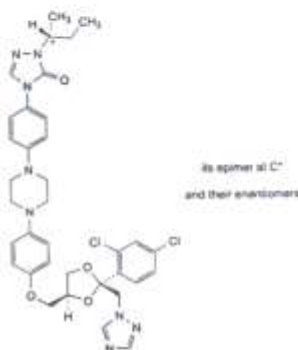
D. methyl 1-methylethyl 4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-2,6-dimethylpyridine-3,5-dicarboxylate.



E. methyl 1-methylethyl (4*RS*)-4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-2-[(*E,Z*)-2-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)ethenyl]-6-methyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate.

ITRACONAZOLE

Itraconazolum



$C_{28}H_{39}Cl_2N_5O_4$
[84625-6]-6]

M, 706

DEFINITION

4-[4-{4-[[*cis*-2-(2,4-Dichlorophenyl)-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazol-1-ylmethyl]-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazin-1-yl]phenyl]-2-[(1*RS*)-1-methylpropyl]-2,4-dihydro-3*H*-1,2,4-triazol-3-one.

Content: 99.0 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white or almost white powder.

Solubility: practically insoluble in water, freely soluble in methylene chloride, very slightly soluble in ethanol (96 per cent).

IDENTIFICATION

Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: itraconazole CRS.

TESTS

Solution S. Dissolve 2.0 g in methylene chloride *R* and dilute to 20.0 mL with the same solvent.

Appearance of solution. Solution S is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution R₄ or B₄ (2.2.2. Method II).

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29). Prepare the solutions immediately before use.

Test solution. Dissolve 0.100 g of the substance to be examined in methanolic hydrochloric acid *R* and dilute to 10.0 mL with the same solvent.

Reference solution (a). Dilute 1.0 mL of the test solution to 100.0 mL with methanolic hydrochloric acid *R*. Dilute 1.0 mL of this solution to 10.0 mL with methanolic hydrochloric acid *R*.

Reference solution (b). Dissolve 10 mg of itraconazole for system suitability CRS (containing impurities B, C, D, E, F and G) in 1.0 mL of methanolic hydrochloric acid *R*.

Column:

— *size*: $l = 0.10$ m, $\phi = 4.6$ mm;

— *stationary phase*: base-deactivated end-capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R (3 μ m or 3.5 μ m);

— *temperature*: 30 °C.

Monographs 14

Itraconazole

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.0

Mobile phase:

- mobile phase A: 27.2 g/L solution of tetrabutylammonium hydrogen sulfate R1;
- mobile phase B: acetonitrile R1;

Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)
0 - 2	80	20
2 - 22	80 → 50	20 → 50
22 - 27	50	50

Flow rate: 1.5 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 225 nm.

Injection: 10 µL.

Identification of impurities: use the chromatogram supplied with itraconazole for system suitability CRS and the chromatogram obtained with reference solution (b) to identify the peaks due to impurities B, C, D, E, F and G.

Relative retention with reference to itraconazole (retention time = about 14 min): impurity B = about 0.7; impurities C and D = about 0.8; impurity E = about 0.9; impurity F = about 1.05; impurity G = about 1.3.

System suitability: reference solution (b):

- peak-to-valley ratio: minimum 1.5, where H_p = height above the baseline of the peak due to impurity F and H_v = height above the baseline of the lowest point of the curve separating this peak from the peak due to itraconazole.

Limits:

- impurities B, G: for each impurity, not more than 3 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.3 per cent);
- impurity E: not more than twice the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.2 per cent);
- sum of impurities C and D: not more than 3 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.3 per cent);
- unspecified impurities: for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.10 per cent);
- total: not more than 8 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.8 per cent);
- disregard limit: 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.05 per cent).

Loss on drying (2.2.32): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C for 4 h.

Sulfated ash (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

Dissolve 0.300 g in 70 mL of a mixture of 1 volume of anhydrous acetic acid R and 7 volumes of methyl ethyl ketone R by vigorous stirring for at least 10 min. Titrate with 0.1 M perchloric acid, determining the end-point potentiometrically at the second point of inflexion (2.2.20).

1 mL of 0.1 M perchloric acid is equivalent to 35.3 mg of $C_{15}H_{21}Cl_2N_5O_4$.

STORAGE

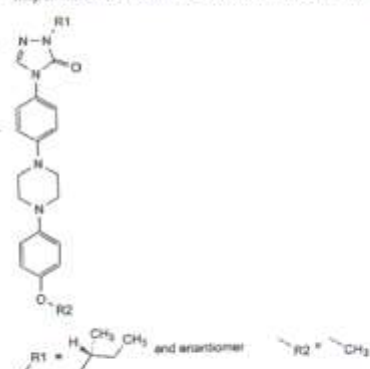
Protected from light.

IMPURITIES

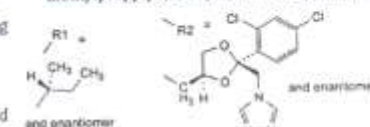
Specified impurities: B, C, D, E, G.

Other detectable impurities (the following substances would, if present at a sufficient level, be detected by one or other of the tests in the monograph. They are limited by the general

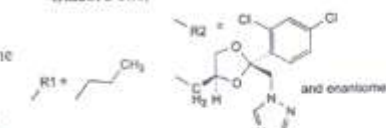
acceptance criterion for other/unspecified impurities and/or by the general monograph Substances for pharmaceutical use (2034). It is therefore not necessary to identify these impurities for demonstration of compliance. See also 5.10. Control of impurities in substances for pharmaceutical use; A, F.



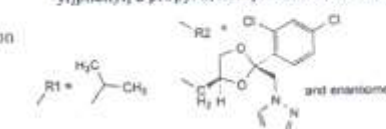
A. 4-[4-[4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]phenyl]-2-[(1R)-1-methylpropyl]-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one.



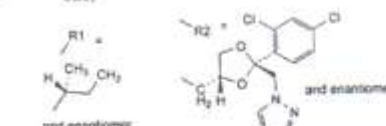
B. 4-[4-[4-[(1S)-1-methylpropyl]-2-[(1R)-1-methylpropyl]-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one, and enantiomer]



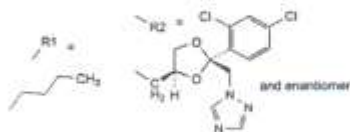
C. 4-[4-[4-[(1S)-1-methylpropyl]-2-[(1R)-1-methylpropyl]-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one, and enantiomer]



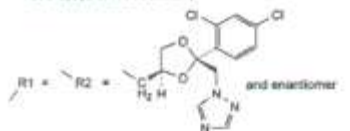
D. 4-[4-[4-[(1S)-1-methylpropyl]-2-[(1R)-1-methylpropyl]-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one, and enantiomer]



E. 4-[4-[4-[(1S)-1-methylpropyl]-2-[(1R)-1-methylpropyl]-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one, and enantiomer]



F. 2-butyl-4,4-bis[4-[[cis-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazin-1-yl]phenyl]-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one.

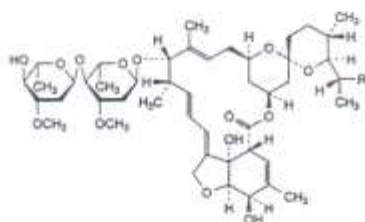


G. 4-[[4-[[4-[[cis-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl]piperazin-1-yl]phenyl]-2-[[cis-2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methyl]-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazol-3-one]

01/2008:1336
corrected 5.0

IVERMECTIN

Ivermectinum



Component	R	Molecular formula	M_r
H_2B_{16}	CH_2CH_3	$C_{48}H_{74}O_{14}$	875
H_2B_{18}	CH_3	$C_{47}H_{72}O_{14}$	861

Ivermectin B1a: [70161-11-4]
Ivermectin B1b: [70288-86-7]

DEFINITION

Mixture of (2aE,4E,5'S,6S,6'R,7S,8E,11R,13R,15S,17aR,20R,20aR,20bS)-7-[[2,6-dideoxy-4-O-(2,6-dideoxy-3-O-methyl- α -L-arabino-hexopyranosyl)-3-O-methyl- α -L-arabino-hexopyranosyl]oxy]-20,20b-dihydroxy-5',6,8,19-tetramethyl-6'-[[1(5)-1-methylpropyl]-3',4',5',6,6',7,10,11,14,15,17a,20,20a,20b-tetradecahydrospiro[11,15-methano-2H,13H,17H-furo[4,3,2-pq][2,6]benzodioxacyclooctadecene-13,2'(2H)pyran]-17-one (or 5-O-demethyl-22,23-dihydroivermectin A_{12}) (component H_2B_{16}) and (2aE,4E,5'S,6S,6'R,7S,8E,11R,13R,15S,17aR,20R,20aR,20bS)-7-[[2,6-dideoxy-4-O-(2,6-dideoxy-3-O-methyl- α -L-arabino-hexopyranosyl)-3-O-methyl- α -L-arabino-hexopyranosyl]oxy]-20,20b-dihydroxy-5',6,8,19-tetramethyl-6'-[[1-methylethyl]-3',4',5',6,6',7,10,11,14,15,17a,20,20a,20b-tetradecahydrospiro[11,15-methano-2H,13H,17H-furo[4,3,2-pq][2,6]benzodioxacyclooctadecene-13,2'(2H)pyran]-17-one (or 5-O-demethyl-25-de(1-methylpropyl)-25-(1-methylethyl)-22,23-dihydroivermectin A_{12}) (component H_2B_{18}).

Semi-synthetic product derived from a fermentation product.
Content:

- ivermectin ($H_2B_{16} + H_2B_{18}$): 95.0 per cent to 102.0 per cent (anhydrous substance),

- ratio $H_2B_{16}/(H_2B_{16} + H_2B_{18})$ (areas by liquid chromatography): minimum 90.0 per cent.

CHARACTERS

Appearance: white or yellowish-white, crystalline powder, slightly hygroscopic.
Solubility: practically insoluble in water, freely soluble in methylene chloride, soluble in alcohol.

IDENTIFICATION

A. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: ivermectin CRS.

B. Examine the chromatograms obtained in the assay.

Results: the retention times and sizes of the 2 principal peaks in the chromatogram obtained with the test solution are similar to those of the 2 principal peaks in the chromatogram obtained with reference solution (a).

TESTS

Appearance of solution. The solution is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution BY, (2.2.2, Method II).

Dissolve 1.0 g in 50 mL of toluene R.

Specific optical rotation (2.2.7): -17 to -20 (anhydrous substance).

Dissolve 0.250 g in methanol R and dilute to 10.0 mL with the same solvent.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).

Test solution. Dissolve 40.0 mg of the substance to be examined in methanol R and dilute to 50.0 mL with the same solvent.

Reference solution (a). Dissolve 40.0 mg of ivermectin CRS in methanol R and dilute to 50.0 mL with the same solvent.

Reference solution (b). Dilute 1.0 mL of reference solution (a) to 100.0 mL with methanol R.

Reference solution (c). Dilute 5.0 mL of reference solution (b) to 100.0 mL with methanol R.

Column:

- size: $l = 0.25$ m, $\phi = 4.6$ mm,
- stationary phase: octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 μ m).

Mobile phase: water R, methanol R, acetonitrile R (15:34:51 V/V/V).

Flow rate: 1 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 254 nm.

Injection: 20 μ L.

System suitability:

- resolution: minimum of 3.0 between the first peak (component H_2B_{16}) and the second peak (component H_2B_{18}) in the chromatogram obtained with reference solution (a),
- signal-to-noise ratio: minimum of 10 for the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c),
- symmetry factor: maximum of 2.5 for the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a).

Limits:

- impurity with a relative retention of 1.3 to 1.5 with reference to the principal peak: not more than 2.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (2.5 per cent),
- any other impurity (apart from the 2 principal peaks): not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (1 per cent),
- total: not more than 5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (5 per cent),
- disregard limit: area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (0.05 per cent).

Додаток 2.

Тверді лікарські форми, які були використані у дослідженні.



Додаток 3

Хроматограф рідинний Shimadzu LC-10ADvp, зав. № C20964330924CS,
свідоцтво про калібрування № 3991 від 05.07.2019 ТОВ «МЕТРОЛОДЖІ
СЕРВІС».



Додаток 4.

Хроматограма стандартного розчину
(концентрація ітраконазолу 80 мкг/мл).

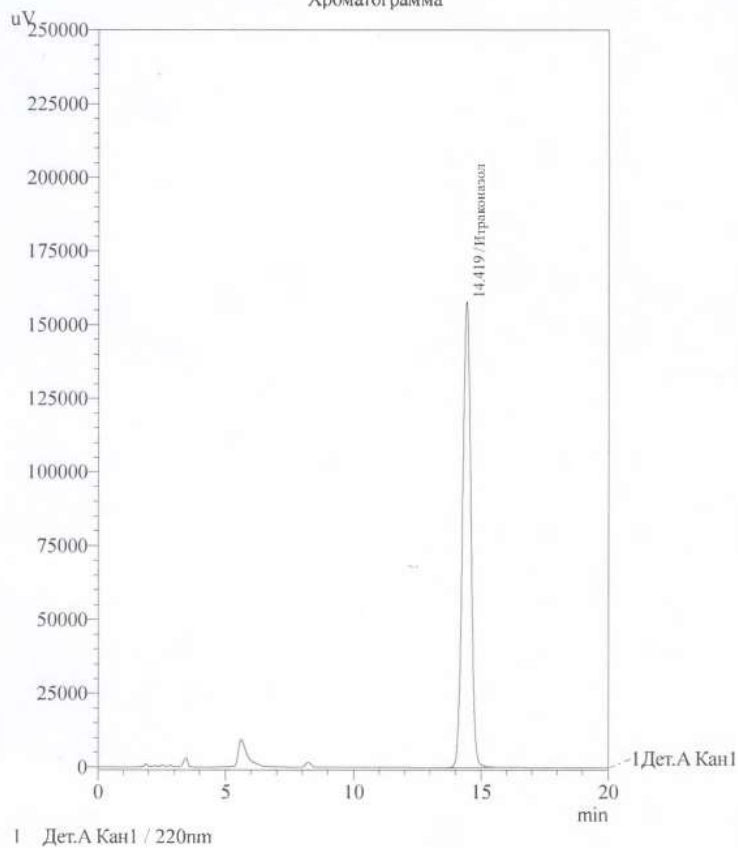
Информ. об образце
Образец ID : 80 мкг/мл
Объем инъекции : 20 μ L
Назв. файла данных
Назв. файла метода : Itraconazole.lcm
ПФ: метанол + H₂O (70+30)
0,8 мл/мин, 220 нм, 35 С
Коэффициент разведения: 1
12.01.2022 11:34:54

Таблица пиков

Детектор A Ch1 220nm

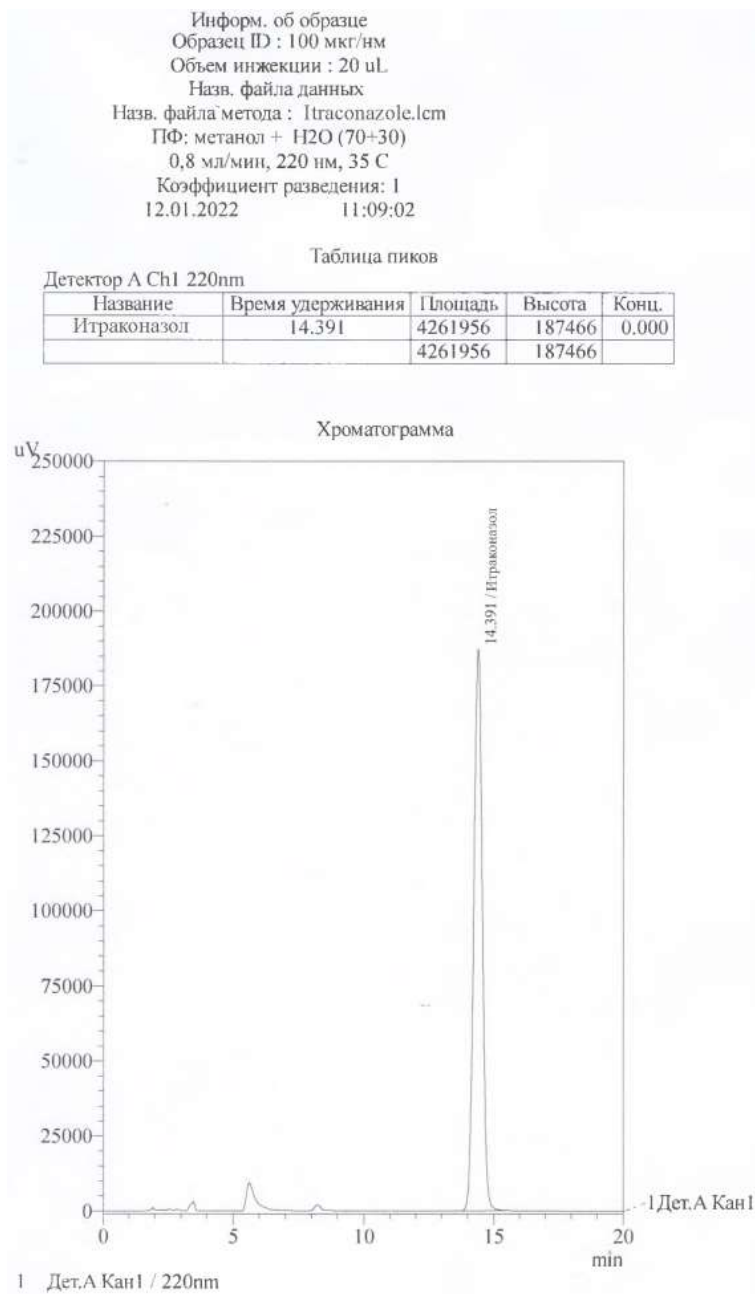
Название	Время удерживания	Площадь	Высота	Конц.
Итраконазол	14.419	3582278	158195	0.000
		3582278	158195	

Хроматограмма



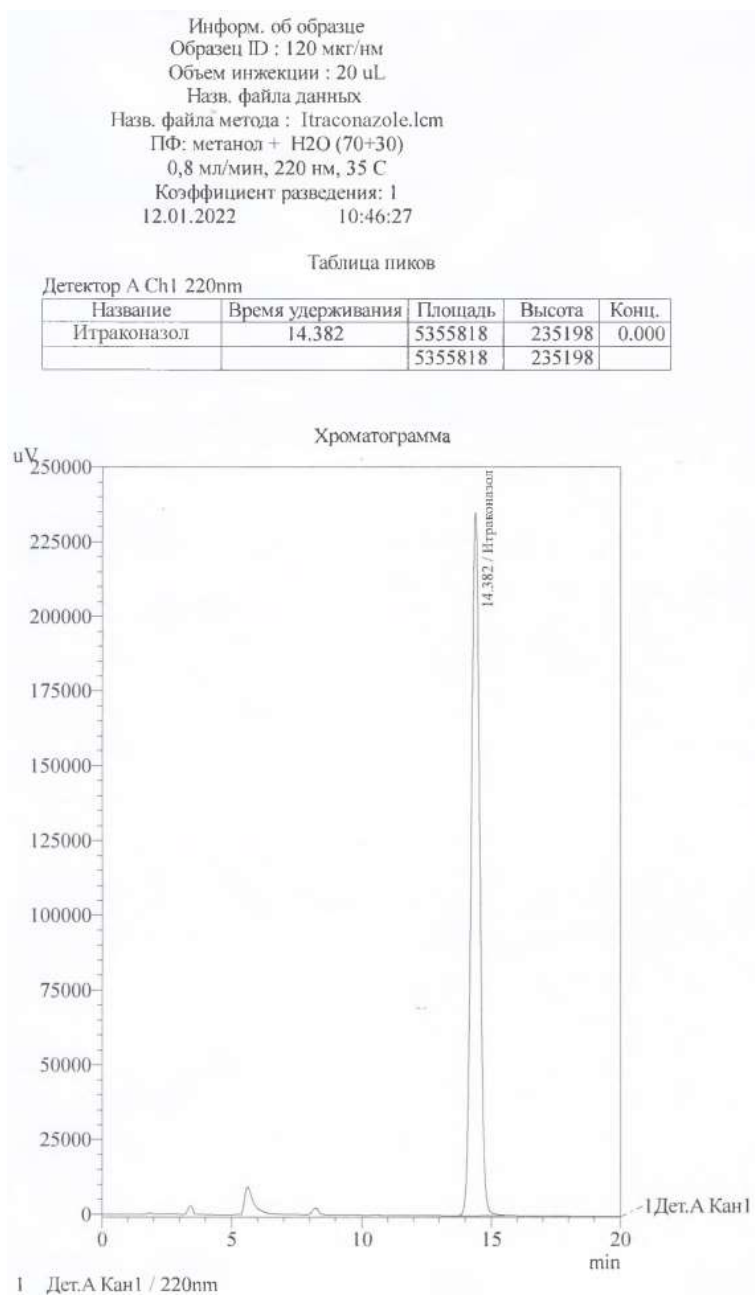
Додаток 5.

Хроматограма стандартного розчину
(концентрація ітраконазолу 100 мкг/мл).



Додаток 6.

Хроматограма стандартного розчину
(концентрація ітраконазолу 120 мкг/мл).



Додаток 7.

