

## **ВИРОБНИЦТВО, КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ, СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЛІКІВ**

УДК 543.544.5.068.7:543.454:615.07

Г. О. ФЕДОСЕНКО<sup>1</sup>, Ю. В. СКРИПИНЕЦЬ<sup>2</sup>, канд. хім. наук,

І. І. ЛЕОНЕНКО<sup>2</sup>, канд. хім. наук, А. В. ЄГОРОВА<sup>2</sup>, д-р хім. наук, доцент,

С. М. КАШУЦЬКИЙ<sup>1</sup>, В. П. АНТОНОВИЧ<sup>2</sup>, д-р хім. наук, проф.

<sup>1</sup> ТДВ «ІНТЕРХІМ», м. Одеса

<sup>2</sup> Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, м. Одеса

### **ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ГЛЮКОЗИ НА ПОВЕРХНЯХ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ОБЛАДНАННЯ МЕТОДАМИ ПОЛЯРИМЕТРІЇ ТА ВЕРХ**

**Ключові слова:** поляриметрия, ВЕРХ, глюкоза, очищення фармацевтичного обладнання

Очищення обладнання під час виробництва лікарських засобів є важливою вимогою належної виробничої практики (GMP). На одному і тому самому технологічному обладнанні, як правило, випускають низку різних лікарських засобів, що загрожує їх перехресною контамінацією, для запобігання якій необхідне виконання ефективного очищення обладнання з валідацією застосовуваних процедур для кожної одиниці обладнання [1–4]. Необхідно також науково обґрунтувати і встановити допустимі межі вмісту залишків активних фармацевтичних інгредієнтів (АФІ) на поверхні обладнання після очищення (критерії прийнятності чистоти) з урахуванням терапевтичної дози АФІ, токсичності, обсягу серії, площі поверхні використовуваного обладнання та ін [5, 6].

Глюкоза – моносахарид, що належить до групи альдогексоз. Глюкозу застосовують у медицині як поживну речовину та компонент кровозамісної та протишокової рідини, у харчовій промисловості та у виробництві лікарських препаратів.

Існує багато методів визначення глюкози. Так для її визначення в організмі людини запропоновано методи, які ґрунтуються на використанні ферментів глюкозооксидази та гексокінази з наступним фотометричним детектуванням. Найбільш селективний ферментативний метод визначення D-глюкози базується на окисненні β-D-глюкопіраноз у присутності глюкозооксидази в аеробних умовах до δ-глюконолактону та H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Для визначення глюкози у біологічних рідинах також використовують інфрачервону, раманівську спектроскопію, світлорозсіювання [7, 8]. Ці методики довготривалі та потребують застосування коштовного обладнання.

Кількісно глюкозу також визначають поляриметричним [9], спектрофотометричним [10, 11] та хроматографічними методами [12–14], які не були використані для визначення залишкових кількостей глюкози у разі контролю очищення фармацевтичного обладнання.

**Мета роботи** – вперше розробити прості та селективні методики визначення залишкових кількостей глюкози у змивах із поверхонь фармацевтичного обладнання після виробництва препарату, який містить цей АФІ, методами поляриметрії та ВЕРХ (високоєфективної рідинної хроматографії).

#### **Матеріали та методи дослідження**

Об'єктом дослідження була глюкоза, яка входить до складу препарату Регідрон (Оріон Корпорейшн, Фінляндія), порошок для орального розчину по 18,9 г у саше.

У роботі використовували субстанцію глюкози (фарм.), розчин аміаку розведений (за ДФУ [15]), дистильовану воду та воду для хроматографії.

Розчин для перевірки придатності (0,01 мг/мл) готували таким чином: точну навážку глюкози 1,000 г вміщували в мірну колбу ємністю 100,0 мл, додавали 70 мл

води, розчиняли та доводили об'єм до позначки тим самим розчинником. 0,1 мл одержаного розчину вміщували в мірну колбу ємністю 100,0 мл, доводили об'єм до позначки водою та перемішували.

У роботі використовували: сваби Alpha® Sampling Swab марки TX715; мембранні фільтри 0,20 мкм; Minisart RC 15, фірми «Sartorius», Германія.

Кут обертання площини поляризації випробовуваного розчину за температури  $20 \pm 0,5$  °C визначали на поляриметрі P8000 (Kguess, Німеччина).

Хроматографування здійснювали на рідинному хроматографі Agilent 1260 2D LC System (США) із рефрактометричним детектором (Infinity Series).

### Результати дослідження та обговорення

#### Поляриметричне визначення глюкози

Визначення вмісту глюкози здійснювали за градуовальним графіком. Лінійна залежність методу характеризує здатність отримувати аналітичний сигнал, прямо пропорційний вмісту визначаємої речовини у випробуваному зразку. Для кількісного визначення глюкози у змивах лінійність досліджували на модельних сумішах.

#### Градуовальний графік

Випробовувані розчини. У мірні колби об'ємом 100,0 мл вносять 0,05; 0,1; 0,5; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 і 1,2 г глюкози, розчиняють у 80 мл води за перемішування на магнітній мішалці протягом 15 хв і додають 0,1 мл розчину аміаку розведеного, витримують упродовж 30 хв і доводять об'єм розчину водою до 100,0 мл.

Встановлено лінійну залежність (рис. 1, а) для кількісного визначення глюкози, яка описується рівнянням (1):

$$\alpha = -0,01953 + 0,05273 \cdot x, \quad (1)$$

де  $x$  – вміст глюкози в розчині, г/100 мл;

$\alpha$  – кут обертання глюкози, в градусах.

Градуовальний графік є лінійним у діапазоні концентрацій глюкози 0,5–12,0 мг/мл, межа виявлення (МВ) становить 0,1 мг/мл.

$$МВ = 3,3 \sigma/S = 3,3 \cdot 0,00153/0,05273 = 0,1 \text{ мг/мл},$$

де  $\sigma$  – стандартне відхилення вільного члена;

$S$  – тангенс кута нахилу градуовальної прямої.

Межа виявлення глюкози – 2,0 мг/змив (тобто 2,0 мг на сваб, яким зроблено змив із поверхні 100,0 см<sup>2</sup>).

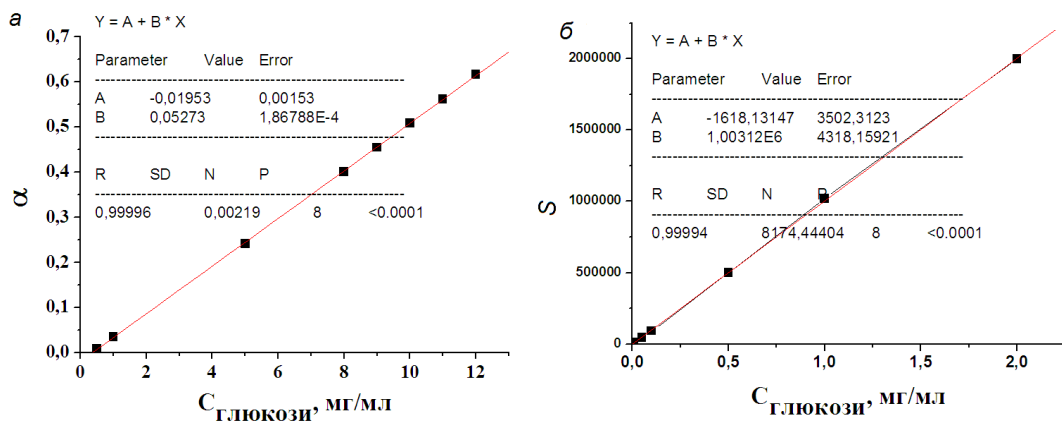


Рис. 1. Лінійна залежність кута обертання (а) та площі хроматографічного піка (б) від концентрації глюкози

*Методика.* Сваб зі змивом забруднення обладнання (площа змиву – 100,0 см<sup>2</sup>) вміщують у лабораторний стакан ємністю 25,0 мл, додають 20 мл води і проводять десорбцію протягом 10 хв. Отриманий розчин фільтрують через мембранний фільтр, додають 0,1 мл розчину аміаку розведеного, витримують протягом 30 хв і визначають кут обертання.

Компенсаційний розчин. 0,1 мл розчину аміаку розведеного доводять водою до 100,0 мл.

Розчини використовують свіжоприготованими.

Визначають нуль поляриметра з використанням компенсаційного розчину і кут обертання площини поляризації ( $\alpha$ ) випробовуваного розчину за температури  $20 \pm 0,5$  °С.

Вміст глюкози ( $X$ ) в міліграмах у змиві обчислюють за формулою (1):

$$X = C \cdot 20 ; \quad (1)$$

де  $C$  – концентрація глюкози, отримана за градуовальним графіком, мг/мл.

*Визначення глюкози методом ВЕРХ*

Визначення вмісту глюкози здійснюють за градуовальним графіком. Методика базується на зміні площі піка глюкози на хроматограмі залежно від її концентрації (за необхідності розчин проби розбавляють до концентрації, що лежить в інтервалі лінійності градуовального графіка).

*Градуовальний графік*

*Випробовувані розчини.* 1,0 г глюкози вміщують у мірну колбу ємністю 100,0 мл, додають 70 мл води для хроматографії Р, розчиняють і доводять об'єм до мітки тим самим розчинником (10 мг/мл).

У мірні колби об'ємом 100,0 мл вміщують 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 мл розчину глюкози і доводять водою для хроматографії Р до позначки, отримуючи розчини зі вмістом глюкози 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 і 2,0 мг/мл відповідно.

Хроматографують одержані розчини по 100 мкл за умов, зазначених у розділі «Методика». За одержаними результатами будують градуовальний графік, відкладаючи на осі абсцис значення концентрації глюкози (мг/мл), а по осі ординат – значення площ піків (рис. 1, б).

Лінійна залежність для хроматографічного визначення глюкози описується рівнянням (2):

$$S = - 1618,13 + 1003120 x, \quad (2)$$

де  $x$  – вміст глюкози в розчині, мг/мл;

$S$  – площа піка глюкози.

Градуовальний графік лінійний у діапазоні концентрацій глюкози 0,005–2,0 мг/мл, межа виявлення (МВ) становить 0,01 мг/мл.

$$МВ = 3,3 \sigma / S = 3,3 \cdot 3502,31 / 1003120 = 0,01 \text{ мг/мл},$$

де  $\sigma$  – стандартне відхилення вільного члена;

$S$  – тангенс кута нахилу градуовальної прямої.

Межа виявлення глюкози – 0,05 мг/змив (тобто 0,05 мг на сваб, яким зроблено змив із поверхні 100,0 см<sup>2</sup>).

Вміст глюкози ( $X$ ) в міліграмах в змиві розраховують за формулою (2):

$$X = C \cdot 5, \quad (2)$$

де  $C$  – концентрація глюкози, отримана за градуовальним графіком, мг/мл.

На рис. 2 наведено хроматограми рухомої фази, контрольного досліду (чистий сваб) і розчинів із концентраціями глюкози в інтервалі 0,005–2,0 мг/мл.

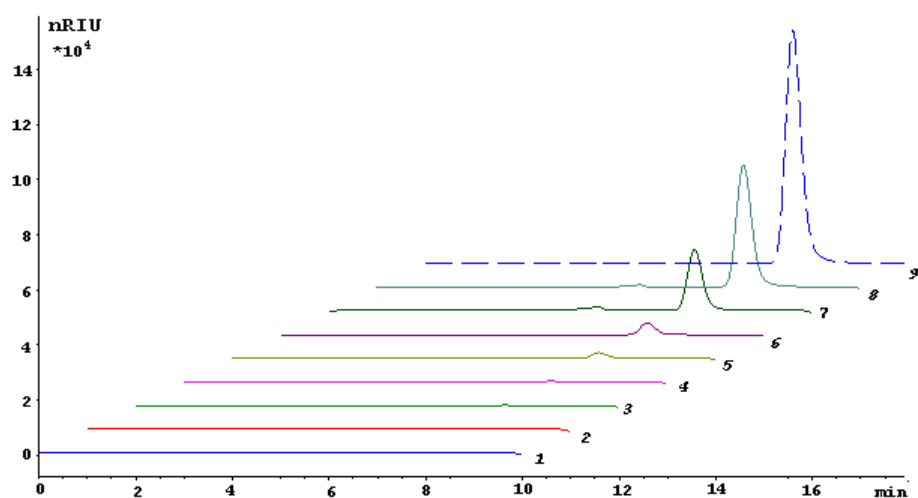


Рис. 2. Хроматограми рухомої фази (1), контрольного дослід (чистий сваб) (2), розчинів глюкози (3–9) з концентраціями від 0,005 мкг/мл до 2,0 мкг/мл

*Методика.* Сваб зі змивом забруднення обладнання (площа змиву – 100,0 см<sup>2</sup>) вміщують у лабораторний стакан ємністю 25,0 мл, додають 5 мл води і проводять десорбцію протягом 10 хв. Отриманий розчин фільтрують крізь мембранний фільтр.

Використовують розчин для перевірки придатності з концентрацією глюкози 0,01 мг/мл.

Розчини використовують свіжоприготовленими.

Хроматографування виконують за таких умов: колонка розміром 0,30 м x 7,8 мм, заповнена катіонообмінною смолою сильною (кальцієва форма) із розміром частинок 9 мкм; рухома фаза – вода для хроматографії; температура колонки – 80 °С; температура детектора – 40 °С; швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв; час хроматографування – 10 хв; об'єм інжекції – 100 мкл.

Хроматографічну систему вважають придатною, якщо співвідношення сигнал/шум (не враховують системний пік близько 4,5 хв) для піка глюкози і прилеглої піка з хроматограми розчину для перевірки придатності становить не менше 3.

Концентрацію глюкози (мг/мл) у досліджуваному розчині визначають за градувальним графіком.

*Визначення ступеня вилучення глюкози*

*Поляриметричне визначення*

У модельних дослідках робили змиви змоченим водою свабом із поверхні (100,0 см<sup>2</sup>), на яку штучно наносили 0,1 г глюкози, далі проводили витяг 20,0 мл води.

*Визначення методом ВЕРХ*

У модельних дослідках робили змиви змоченим водою свабом із поверхні (100,0 см<sup>2</sup>), на яку штучно наносили 2,5 мг глюкози (готували розчин з концентрацією 10 мг/мл і наносили 0,25 мл, підсушували), далі проводили витяг 5,0 мл води.

Далі концентрацію глюкози визначали в умовах, зазначених у відповідних методиках.

Було встановлено, що ступінь вилучення глюкози в кінцевий розчин становить 93,5–96,2% (для поляриметричної методики) та 91,5–95,7% (для методики ВЕРХ) (таблиця).

Результати аналізу, одержані двома методами, порівняли за допомогою статистичного критерію F-розподілу для величин вибіркової дисперсії і t-критерію Стьюдента для перевірки збіжності середніх значень.

## Ступінь вилучення глюкози з поверхні

№ проби	Ступінь вилучення глюкози, %					
	ВЕРХ			Поляриметрія		
	Знайдено	$X_{\text{cp}} \pm \Delta X$	$S_r, \%$	Введено	$X_{\text{cp}} \pm \Delta X$	$S_r, \%$
1	91,52			93,98		
2	93,49			93,54		
3	95,67	$93,66 \pm 2,14$	1,84	95,44	$95,01 \pm 1,48$	1,25
4	92,55			95,90		
5	95,08			96,21		

При порівнянні розрахованого за експериментальними даними значення F-критерію  $F_{\text{екс}} = \frac{S_{\text{max}}^2}{S_{\text{min}}^2} = 2,11$  із табличним значенням  $F_{\text{табл}} = 6,39$  можна зробити

висновок, що розбіжність між дисперсіями для двох наборів даних статистично незначуща з імовірністю  $P = 0,95$ . Значення t-критерію Стьюдента розраховували за

формулою:  $t_{\text{екс}} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{S_0} \cdot \sqrt{\frac{n}{2}}$ , де  $S_0 = \sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{2}}$ . Порівнюючи розрахований

за експериментальними даними t-критерій ( $t_{\text{екс}} = 1,44$ ) з табличним значенням  $t_{\text{табл}} = 2,37$ , можна зробити висновок, що розбіжність між середніми двох вибірок статистично незначуща. Таким чином, обидві вибірки належать одній і тій самій генеральній сукупності. Перевагою поляриметричного методу є простота виконання аналізу і невелика витрата реагентів, але метод ВЕРХ дає змогу отримувати більш низьку межу визначення (на порядок величини).

**В и с н о в о к**

Розроблено методики поляриметричного та ВЕРХ визначення залишкових кількостей глюкози у змивах із поверхонь фармацевтичного обладнання після виробництва. Запропоновані прості та експресні методики характеризуються задовільними метрологічними характеристиками. Ступінь вилучення глюкози з аплікаторів та поверхонь фармацевтичного обладнання становить більше 90%.

Розроблені методики можуть бути рекомендовані для визначення залишкових кількостей глюкози під час контролю якості очищення фармацевтичного обладнання на виробництві.

**Л И Т Е Р А Т У Р А**

1. PIC/S document PI006-2. Recommendations on Validation Master Plan, Installation und Operational Qualification. Non Sterile Process Validation, Cleaning Validation; July 2004.
2. U. S. Food and Drug Administration. Guide to inspections validation of cleaning processes; July 1993.
3. Гармонов С. Ю., Нурисламова Г. Р., Фатхуллин Р. Р., Горюнова С. М. Проблемы перекрестного загрязнения в химико-фармацевтическом производстве: стандартизация и унификация требований // Вестн. Казанского технол. ун-та. – 2006. – Т. 6. – С. 294–305.
4. Nassani M. Cleaning validation in the pharmaceutical industry // J. Validation Technol. – 2005. – V. 11, N 4. – P. 286–297.
5. Fourman G., Mullen M. Determining cleaning validation acceptance limits for pharmaceutical manufacturing operations // Pharm. Technol. – 1993. – V. 17, N 4. – P. 54.
6. McCormick P. Y., Cullen L. F. «Cleaning Validation», in Pharmaceutical Process Validation / Ed. by Berry I. R., Nash R. A. 2nd edition. – New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. – P. 319–349.

7. *Al-Gharabli S. I.* Determination of glucose concentration in aqueous solution using ATR-WT-IR technique // *Sensors*. – 2009. – V. 9. – P. 6254–6260.
8. *Герасименко В. Л.* Обзор методов определения глюкозы. – М.: Наука, 2005. – 356 с.
9. *Wan Q., Cote' G. L., Dixon J. B.* Dual-wavelength polarimetry for monitoring glucose in the presence of varying birefringence // *J. Biomed Optics*. – 2005. – V. 10, N 2. – P. 24–29.
10. *Ampon K., Wan Yunus W. Z., Salleh A. B.* A Spectrophotometric method for the determination of glucose with glucose oxidase using titanium (IV)-4-(2'-pyridylazo)resorcinol reagent pertanika // *J. Sci. Technol.* – 1994. – V. 2, N 1. – P. 47–53.
11. *Zaitoun M. A.* A kinetic-spectrophotometric method for the determination of glucose in solutions // *J. Analytical Chem.* – 2006. – V. 61, N 10. – p. 1010–1014.
12. *Odden J.* Determination of D-glucose in human blood serum using HPLC-PED // *Concordia College J. Analytical Chem.* – 2011. – V. 2. – P. 58–66.
13. *Rahman N. A.* Determination of glucose and fructose from glucose isomerization process by high-performance liquid chromatography with UV detection // *Modern Appl. Sci.* – 2008. – V. 2, N 4. – P. 151–154.
14. *Salman M., Alghamdi M. T., Bazaid S. A.* Determination of fructose, glucose and sucrose in taif grape using high performance liquid chromatography and analysis of mineral salts // *Arch. Appl. Sci. Res.* – 2011. – V. 3, N 6. – P. 488–496.
15. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – 556 с.

Надійшла до редакції 27. 08. 2015.

*А. А. Федосенко<sup>1</sup>, Ю. В. Скрипинец<sup>2</sup>, И. И. Леоненко<sup>2</sup>, А. В. Егорова<sup>2</sup>, С. Н. Кауцуцкий<sup>1</sup>, В. П. Антонович<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> ОДО «ИНТЕРХИМ», г. Одесса

<sup>2</sup> Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, г. Одесса

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ГЛЮКОЗЫ НА ПОВЕРХНОСТЯХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ МЕТОДАМИ ПОЛЯРИМЕТРИИ И ВЭЖХ

**Ключевые слова:** поляриметрия, ВЭЖХ, глюкоза, очистка, фармацевтическое оборудование

#### А Н Н О Т А Ц И Я

Очистка оборудования при производстве лекарственных средств является важнейшим требованием надлежащей производственной практики (GMP). На одном и том же технологическом оборудовании, как правило, выпускают ряд различных лекарственных средств, что может привести к их перекрестной контаминации, для предотвращения которой необходимо проведение эффективной очистки оборудования с валидацией применяемых процедур для каждой единицы оборудования. Необходимо также научно обосновать и установить допустимые пределы содержания остатков активных фармацевтических ингредиентов на поверхности оборудования после очистки (критерии приемлемости чистоты) с учетом терапевтической дозы активных фармацевтических ингредиентов, токсичности, объема серии, площади поверхности используемого оборудования.

Цель этой работы – разработка простых и селективных методик определения остаточных количеств глюкозы в смывах с поверхностей фармацевтического оборудования после производства препарата, который содержит этот активный фармацевтический ингредиент, методами поляриметрии и ВЭЖХ. Объектом исследования была глюкоза, которая входит в состав препарата Регидрон. В работе использовали: свабы Alpha® Sampling Swab марки TX715; мембранные фильтры 0,20 мкм; Minisart RC 15 фирмы «Sartorius», Германия. Разработаны методики поляриметрического и ВЭЖХ определения остаточных количеств глюкозы в смывах с поверхностей фармацевтического оборудования после производства препарата Регидрон.

Установлено, что степень извлечения глюкозы с аппликаторов и поверхностей фармацевтического оборудования составляет более 90%. Предложенные простые и экспрессные методики характеризуются удовлетворительными метрологическими характеристиками и могут быть рекомендованы для определения остаточных количеств глюкозы при контроле качества очистки фармацевтического оборудования при производстве.

*A. A. Fedosenko*<sup>1</sup>, *Yu. V. Scrypynets*<sup>2</sup>, *I. I. Leonenko*<sup>2</sup>, *A. V. Yegorova*<sup>2</sup>, *S. N. Kashutskyy*<sup>1</sup>,  
*V. P. Antonovich*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*ALC «INTERCHEM», Odesa*

<sup>2</sup>*Bogatsky Physico-Chemical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine, Odesa*

## DETERMINATION OF THE GLUCOSE RESIDUES ON PHARMACEUTICAL EQUIPMENT SURFACES BY BOTH METHODS: POLARIMETRY AND HPLC

**Key words:** polarimetry, HPLC, glucose, cleaning of pharmaceutical equipment

### ABSTRACT

Cleaning of equipment in the production of medicines is an important requirement of good manufacturing practice (GMP). As a rule, the same process equipment is used for the production of a number of different drugs that may result in cross-contamination. In order to prevent the contamination there is need in efficient cleaning of equipment used with the validation methods for each part of equipment. There is need as well to prove and establish acceptable residual limits of active pharmaceutical ingredients (API) on the surface of the equipment after purification (purity acceptance criteria) based on the therapeutic dose of API, toxicity, volume of series, the surface area of the used equipment.

The aim of this work is the development of the simple and selective polarimetry and HPLC methods for determining residual amounts of glucose in washings from surfaces of pharmaceutical equipment after production of the drug. The object of the research is glucose, which is a part of the drug Regidron, powder for oral solution of 18.9 g per sachet. The swab Alpha® Sampling Swab TX715; membrane filters 0.20 µm; Minisart RC 15 «Sartorius» (Germany) were used. The polarimetric and HPLC methods for determination of glucose residues in washings from surfaces of pharmaceutical equipment after production the Regidron were developed.

The recovery rates of glucose from swabs and pharmaceutical equipment surfaces are more than 90%. The proposed simple and rapid methods are characterized by satisfactory metrological characteristics and can be recommended to determine the residues of glucose in controlling the quality of cleaning pharmaceutical equipment.

*Електронна адреса для листування з авторами: yegorova@interchem.com.ua*