

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ім. О.В. БОГАТСЬКОГО

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ФЕДОСЕНКО ГАННА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 543.4: 543.544.5.068.7:615.07

ДИСЕРТАЦІЯ
ХРОМАТОГРАФІЧНІ ТА ОПТИЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ ДЛЯ
ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ДЕЯКИХ ЛІКАРСЬКИХ
ПРЕПАРАТІВ ПІСЛЯ ОЧИЩЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО
ОБЛАДНАННЯ

02.00.02 – аналітична хімія

10 – Природничі науки

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії (кандидата наук)
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 - Г. О. Федосенко

Науковий керівник Єгорова Алла Володимирівна, доктор хімічних наук, професор

Одеса – 2018

АНОТАЦІЯ

Федосенко Г. О. Хроматографічні та оптичні методи аналізу для визначення залишкових кількостей деяких лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 02.00.02 – аналітична хімія. – Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса, 2018.

Дисертаційна робота присвячена розробці хроматографічних та оптичних методик аналізу для визначення залишкових кількостей деяких лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання.

Валідація аналітичних методик контролю залишкових кількостей препарату на обладнанні після процесу очищення, так само як і валідація будь-якої іншої методики, ґрунтується на встановленні вимог до її невизначеності. З'ясовано, що основою для вироблення критеріїв повинна стати межа кількісного визначення методики (МКВ) та розробка методики контролю якості очищення повинна включати, насамперед, вибір методу аналізу, чутливість якого дозволяє достовірно вести кількісне визначення аналіту в зразку змиву при вмісті, що не перевищує гранично допустиму концентрацію (ГДК).

Методами математичної статистики з урахуванням вимог належної виробничої практики (GMP) вперше був розроблений теоретичний підхід для визначення основної метрологічної характеристики аналітичних методик контролю якості очищення обладнання – максимально допустимої невизначеності результату вимірювання. Встановлено критерії для перевірки лінійності методик. На прикладі активного фармацевтичного інгредієнту (АФІ) деквалінію хлориду за методом «найгіршого випадку» запропановані критерії прийнятності (максимальна невизначеність методики, лінійність градувального графіка, межа кількісного визначення, прецизійність та відтворюваність) валідації аналітичної методики контролю якості очищення обладнання та визначення рівня забруднення.

Приготування випробовуваних розчинів, визначення ступеня вилучення та

обробку результатів для розроблених методик проводили за наведеними уніфікованим прописами та формулами. Концентрації аналітів визначали за градувальними графіками. Для розроблених методик встановлені їх аналітичні (діапазон лінійності методики, МКВ, ГДК), валідаційні характеристики та їх критерії прийнятності, а також ступені вилучення аналітів.

Розроблено та валідовано методики спектрофотометричного визначення залишкових кількостей АФІ (тилорону, L-5-гідрокситриптофану, колагену, бензобіталу) на поверхнях фармацевтичного обладнання при виробництві відповідних лікарських препаратів. Визначення тилорону, L-5-гідрокситриптофану, бензобіталу проводили в УФ-області спектру. Визначення колагену запропановано проводити колориметричним методом Лоурі. У лужному середовищі іони Cu^{2+} утворюють комплекс з пептидними зв'язками, переходячи в Cu^+ . Одновалентні іони міді реагують з реактивом Фоліна (фосфомолібденова кислота з фенолом), утворюючи нестабільний продукт, що переходить у молібденову синь з максимумом адсорбції при 750 нм. Збільшення адсорбції при 750 нм пропорційно концентрації білка. Метод дуже чутливий до наявності в розчині сторонніх відновлювачей. Встановлено, що компоненти плацебо не заважають визначенню білку.

Для люмінесцентного визначення залишкових кількостей АФІ (розувастатину кальцію, флупіртину малеату, абіратерону ацетату, ривастигміну гідротартрату) на поверхнях фармацевтичного обладнання вивчено вплив на інтенсивність люмінесценції різних розчинників. Встановлено, що максимальна інтенсивність люмінесценції розувастатину кальцію спостерігається у метанолі, флупіртину малеату – у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти, абіратерону ацетату – у етанолі.

Розроблено та валідовано методику поляриметричного визначення залишкових кількостей АФІ глюкози на поверхнях фармацевтичного обладнання при виробництві лікарського препарату РЕГІСОЛ, порошок для орального розчину по 18,9 г у саше.

Вперше застосовано атомно-емісійну спектрометрію з індуктивно зв'язаною плазмою для визначення мікрокількостей калію та натрію при виробництві

багатокомпонентного засобу РЕГІСОЛ® НЕО, який містить натрію хлорид, калію хлорид, натрію цитрат.

Після оптимізації умов аналізу (тип сорбенту, геометрія колонки, температура колонки, склад елюенту, діапазон концентрацій органічного модифікатора у рухомій фазі, довжина хвилі та ін.) запропоновані нові методики визначення залишків силденафілу цитрату, фенспіриду гідрохлориду, клонідину гідрохлориду, левана, розувастатину кальцію, ривастигміну гідротартрату, даклатасвіру дигідрохлориду, фенібуту методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Для розроблених методик встановлені показники придатності хроматографічних систем (фактор симетрії піку, число теоретичних тарілок, відносне стандартне відхилення часу утримування та площі піку) при визначенні вивчених препаратів. Оцінка ключових показників придатності хроматографічної системи виявила перспективу їх використання для контролю залишкових кількостей АФІ в змивах з технологічного обладнання фармацевтичного виробництва.

На відміну від відомого способу визначення амінокислот за допомогою методу ВЕРХ з попередньою процедурою їх предколоночної дериватизації з використанням *o*-фталевого альдегіду в якості дериватизуючого агенту, який потребує використання другого компоненту – сульфурвмісного нуклеофілу та автосамплеру приладу, який дозволяє проводити дериватизацію в автоматичному режимі внесення, розведення і змішування та спеціальну колонку Zorbax Eclipse AAA, що приводить до високої вартості аналізу, нами вперше розроблено та валідовано методику визначення залишкових кількостей L-валіну, L-лейцину та L-ізолейцину в змивах після очищення фармацевтичного обладнання методом обернено-фазової ВЕРХ з УФ-детектуванням з використанням для предколоночної дериватизації ди-трет-бутилдикарбонату, що застосовується в органічному синтезі для захисту аміногруп.

Високоефективна тонкошарова хроматографія застосована для визначення залишкових кількостей сухого екстракту листя гінкго білоба (за вмістом кверцетину) на поверхнях фармацевтичного обладнання. Метод реалізован завдяки використанню фосфорної кислоти, яка перешкоджає

комплексоутворюванню кверцетину з силікатом цинку (II) (компонентом флуоресцентного індикатора хроматографічної пластинки).

Для ВЕРХ визначення залишкових кількостей ряду ЛП вперше були оптимізовані хроматографічні умови при використанні доступних рухомих фаз на сорбентах типу С8 і С18. Показано, що аналітичні та валідаційні характеристики розроблених методик (діапазон лінійності методики, МКВ, ГДК) відповідають критеріям прийнятності визначення залишкових кількостей АФІ в змивах після очищення фармацевтичного обладнання. Для кожного препарату встановлено коефіцієнт ступеня вилучення (%).

Для деяких АФІ розроблено два методи: для визначення глюкози – поляриметричний та ВЕРХ, розувастатину кальцію та ривастигміну гідротартрату – люмінесцентний та ВЕРХ. Для порівняння двох методів застосували статистичний критерій *F*-розподілу, який дозволяє порівнювати величини вибірових дисперсій двох рядів спостережень, та *t*-критерій Стьюдента для перевірки збіжності середніх значень вимірювань. Отримані дані вказують на задовільну збіжність та відтворюваність результатів, отриманих двома різними методами. Перевагою люмінесцентного та поляриметричного методу є простота виконання аналізу та невелика витрата реагентів, але ВЕРХ метод дозволяє отримувати більш низьку межу виявлення.

Згідно з вимогами GMP показана можливість експресного внутрішньовиробничого контролю очищення фармацевтичного обладнання при виробництві лікарських препаратів. Методики визначення левана, флупіртину малеату, розувастатину кальцію, фенібуту та парацетамолу впроваджені у практику роботи фармацевтичного підприємства ТДВ «ІНТЕРХІМ». Проведено визначення залишкових кількостей деяких АФІ на поверхнях обладнання підприємства ТДВ «ІНТЕРХІМ». Отримані результати підтвердили задовільну якість очищення.

Ключові слова: хроматографічні методи аналізу, оптичні методи аналізу, залишкові кількості лікарських препаратів, валідація, очищення фармацевтичного обладнання

SUMMARY

Fedosenko G.O. Chromatographic and optical methods of analysis for the residual amounts determination of some drugs after the cleaning of pharmaceutical equipment. – As a manuscript.

The thesis for the candidate's degree of chemical sciences (Ph.D.) by the specialty 02.00.02 – analytical chemistry (102 – Chemistry). – A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of NAS of Ukraine, Odessa, 2018.

The thesis is devoted to the development of chromatographic and optical methods of analysis for determination of the residual quantities of some drugs after cleaning of pharmaceutical equipment.

Validation of analytical methods for residual amounts control of the drug on the equipment after the cleaning process, as well as the validation of any other method, is based on establishing requirements for its uncertainty. It has been established that the basic for the development of criteria should be the limit of quantification of the method (LOQ) and the development of a method for quality control of cleaning should include, first of all, the selection of the method of analysis, which sensitivity allows exact quantitative determination of the analyte in the rinse with content not exceeding maximum permissible concentration (MPC).

For the first time, the theoretical approach for determination of the main metrological characteristic of analytical methods for quality control of the cleaning of equipment, the maximum permissible measurement error, has been developed by the method of mathematical statistics taking into account the requirements of Good Manufacturing Practice (GMP).

The criteria for checking the linearity of the methods have been established. On the example of the active pharmaceutical ingredient (API), dequalinium chloride, according to the "worst case" method, the acceptance criteria (maximal uncertainty of the method, linearity of the calibration curve, limit of quantification, precision and reproducibility) of the validation of the analytical method for quality control of the cleaning of equipment and determination of contamination level have been proposed.

Preparation of test solutions, determination of the recovery and processing of the

results for the developed methods were carried out using the unified prescripts and formulas. Concentrations of analytes were determined by calibration curves. For developed methods, the analytical (range of linearity of the method, LOQ, MPC), validation characteristics, their acceptance criteria and recovery have been established.

The methods of spectrophotometric determination of residual amounts of APIs (tilorone, L-5-hydroxytryptophane, collagen, benzobital) on the surfaces of pharmaceutical equipment in the manufacture of the appropriate drugs have been developed and validated. Determination of tilorone, L-5-hydroxytryptophane, benzobital was carried out in the UV region of the spectrum.

The determination of collagen was proposed by Lowry's colorimetric method. In alkaline medium, Cu^{2+} ions form a complex with peptide bonds, passing to Cu^+ . Copper ions (I) react with a Folin's reagent (phosphomolybdic acid with phenol) to form an unstable product that converts to molybdenum blue with a maximum adsorption at 750 nm. An increasing of adsorption at 750 nm is proportional to the protein concentration. The method is very sensitive to the presence in the solution of interfering reducing agents. It has been established that the placebo components do not interfere for the determination of protein.

Influence on the luminescence intensity of various solvents has been studied for fluorescence determination of residual amounts of APIs (rosuvastatin calcium, flupirtine maleate, abiraterone acetate, rivastigmine hydrotartrate) on the surfaces of pharmaceutical equipment. It has been established that the maximum luminescence intensity of rosuvastatin calcium is observed in methanol, flupirtine maleate – in 0.1 M hydrochloric acid solution, abiraterone acetate – in ethanol.

The method of polarimetric determination of residual amounts of API glucose on the surfaces of pharmaceutical equipment in the manufacture of the drug Regisol, a powder for oral solution of 18,9 g in a sachet, has been developed and validated.

For the first time atomic emission spectrometry with inductively coupled plasma was used for the determination of potassium and sodium microquantities in the production of a multicomponent drug REGISOL[®] NEO containing sodium chloride, potassium chloride, sodium citrate.

After optimization of the analysis conditions (type of sorbent, column geometry, column temperature, eluent composition, range of concentrations of organic modifier in mobile phase, wavelength, etc.), new methods of determination of residues of sildenafil citrate, fenspiride hydrochloride, clonidine hydrochloride, levan, calcium rosuvastatin, rivastigmine hydrotartrate, daklatasvir dihydrochloride, phenybut by high performance liquid chromatography (HPLC) have been proposed. For developed methods, characteristics of the chromatographic systems suitability (peak symmetry factor, number of theoretical plates, relative standard deviation of retention time and peak area) were determined for determining the studied drugs. The estimation of the main characteristics of the chromatographic system suitability identified the perspective of using to control the residual amounts of APIs in rinse from technological equipment of pharmaceutical production.

In contrast to the known method for determining amino acids using the HPLC method with the preliminary procedure for precolumn derivatization using *o*-phthalic aldehyde as a derivatization agent, which requires the use of a second component – sulfur-containing nucleophile and an autosampler of the device that allows derivatization in the automatic mode of introduction, dilution and mixing and special column Zorbax Eclipse AAA, which leads to high cost of analysis, we for the first time developed and validated the method of determination of residual amounts of L-valine, L-leucine and L-isoleucine in rinse after cleaning of pharmaceutical equipment by reversed-phase HPLC with UV detection using for precolumn derivatization di-*tert*-butyldicarbonate which used in organic synthesis for the protection of amino groups.

High-performance thin-layer chromatography has been used to determine the residual amounts of dry extract of ginkgo biloba leaves (by quercetin content) on the surfaces of pharmaceutical equipment. The method is realized due to the use of phosphoric acid, which prevents complexation of quercetin with zinc silicate (II) (a component of a fluorescence indicator of a chromatographic plate).

For HPLC determination of residual amounts of some drugs chromatographic conditions was first optimized by using available mobile phases on sorbents type C8 and C18. It is shown that the analytical and validation characteristics of the developed

methods (range of linearity of the method, LOQ, MPC) correspond to the acceptance criteria of the determination of residual amounts of APIs in rinse after cleaning of pharmaceutical equipment. For each drug, the recovery (%) has been established.

For some APIs two methods have been developed: for glucose determination – polarimetric and HPLC, calcium rosuvastatin and rivastigmine hydrotartrate – luminescent and HPLC. To compare two methods, the statistical criterion of the *F*-distribution was used, which allows comparing the values of the sample variances of the two series of observations, and the Student's *t*-criterion to verify the convergence of the mean values of the measurements. The obtained data indicate satisfactory repeatability and reproducibility of the results obtained by two different methods. The advantage of the luminescence and polarimetric method is the simplicity of the analysis and the low consumption of reagents, but the HPLC method allows lower detection limit.

According to the requirements of GMP, the possibility of express intra-industry control of cleaning of pharmaceutical equipment in the manufacture of drugs has been shown. Methods of the determination of levana, flupirtine maleate, rosuvastatin calcium, phenybut and paracetamol have been introduced into the practice of the pharmaceutical company SLC "INTERCHEM". Determination of residual amounts of some APIs on the surfaces of equipment of SLC "INTERCHEM" company has been carried out. The results confirmed the satisfactory quality of cleaning.

Keywords: chromatographic methods of analysis, optical methods of analysis, residual quantities of drugs, validation, cleaning of the pharmaceutical equipment.

Список публікацій здобувача:

1. Валидация методики ВЭЖХ определения остаточных количеств клофелина гидрохлорида с поверхностей фармоборудования / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Е. О. Витюкова, С. Н. Кашуцкий, Г. В. Мальцев // Вісник Одеського націон. ун-ту. Хімія. – 2014 – Т. 19, вип. 3(51). – С. 40 – 51.
2. Валидация методик контроля качества очистки фармацевтического оборудования / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев,

В. П. Антонович // Аналитика и контроль. – 2015. – Т. 19, № 4. – С. 387 – 395.

3. Определение остаточных количеств сухого экстракта листьев гинкго билоба на поверхностях фармацевтического оборудования методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, С. Н. Кашуцкий, В. П. Антонович // Methods and objects of chem. anal. – 2015. – Vol. 10, № 4. – P. 183 – 188.

4. Визначення залишкових кількостей глюкози на поверхнях фармообладнання методами поляриметрії та ВЕРХ / **Г. О. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, І. І. Леоненко, А. В. Єгорова, С. М. Кашуцький, В. П. Антонович // Фармацевтичний журнал. – 2015. – № 5 – С. 83 – 89.

5. Определение остаточных количеств розувастатина кальция на поверхностях фармацевтического оборудования методами ВЭЖХ и люминесценции / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, И. И. Леоненко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Журн. анал. химии – 2016. – Т. 71, № 1. – С. 129 – 135.

6. Определение остаточных количеств ривастигмина гидротартрата на поверхностях фармооборудования методами ВЭЖХ и люминесценции / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, И. И. Леоненко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Вісник Одеського націон. ун-ту. Хімія. – 2017 – Т. 22, вип. 1(61). – С. 67 – 78.

7. ВЭЖХ определение L-валина, L-лейцина и L-изолейцина с использованием предколонной дериватизации ди-трет-бутилдикарбонатом / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, С. Н. Кашуцкий, В. П. Антонович // Methods and objects of chem. anal. – 2017. – Vol. 12, № 2. – P. 91 – 98.

8. Пат. 108176 Україна МПК G01N33/15, G01N33/50 Спосіб кількісного визначення кверцетину / Єгорова А. В., **Федосенко Г. О.**, Мальцев Г. В., Кашуцький С. М., Антонович В. П.; заявник та патентовласник Одеса, ФХІ ім. О.В. Богатьського НАН України, – № u 2015 12228; заявл. 10.12.2015; опубл. 11.07.2016, Бюл. № 13.

9. Пат. 120119 Україна МПК G01N30/00, G01N30/02, G01N33/15, Спосіб кількісного визначення амінокислот / Єгорова А. В., **Федосенко Г. О.**,

Мальцев Г. В., Кашуцький С. М., Антонович В. П.; заявник та патентовласник Одеса, ФХІ ім. О.В. Богатьського НАН України, – № U 2017 03754; заявл. 18.04.2017; опубл. 25.10.2017, Бюл. № 20.

10. Валідація люмінесцентної методики визначення флупіртину малеату в змивах з поверхні фармообладнання / І. І. Леоненко, Ю. В. Скрипинець, Г. В. Анельчик, А. В. Єгорова, **Г. О. Федосенко** // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції. – Київ, 9 – 12 червня, 2014. – С. 187.

11. Определение левана методом ВЭЖХ в смывах с поверхностей фармооборудования / Е. О. Витюкова, А. В. Егорова, О. Д. Войтюк, **А. А. Федосенко** // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції. – Київ, 9 – 12 червня, 2014. – С. 193.

12. **Федосенко А. А.** Валидация методики ВЭЖХ определения остаточных количеств клофелина гидрохлорида с поверхностей фармооборудования / **А. А. Федосенко**, Е. О. Витюкова, Г. В. Мальцев // Тези доповідей VII Всеукраїнської наукової конференції студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2015» – Харків, 20 – 22 квітня, 2015. – С. 100 – 101.

13. Определение остаточных количеств розувастатина кальция на поверхностях фармооборудования методами ВЭЖХ и люминесценции / **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, И. И. Леоненко, Г. В. Мальцев // Теоретическая и экспериментальная химия глазами молодежи – 2015. Тезисы докладов Международной научной конференции, посвященной 70-летию Победы в Великой Отечественной войне. Иркутск, 18 – 22 мая, 2015. – С. 105 – 106.

14. Luminescence method for determination of abiraterone acetate residues on the surface of manufacturing equipment / **G. Fedosenko**, I. Leonenko, Yu. Scrypynets, A. Yegorova // Abstracts and programme of 7th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry. – Varna, Bulgaria, 10 – 15 september, 2015. – P. 103.

15. Валидация методик контроля качества очистки фармацевтического оборудования / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції – Київ, 7 – 9 жовтня, 2015. – С. 142 – 143.

16. Валидация методики определения остаточных количеств цинхокаина гидрохлорида методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Управління якістю в фармації: збірник наукових робіт X Науково-практичної конференції – Харків, 20 травня, 2016. – С. 170 – 173.

17. Валидация методик высокочувствительного определения остаточных количеств ряда лекарственных препаратов на поверхностях фармацевтического оборудования / **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинец, И. И. Леоненко, А. В. Анельчик // Тезисы докладов XVII Конференции молодых учёных и студентов-химиков южного региона Украины с международным участием. – Одесса, 28 – 30 апреля, 2015. – С. 28.

18. Контроль очистки поверхностей фармоборудования при производстве многокомпонентных препаратов / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинец, И. И. Леоненко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції – Київ, 18 – 22 жовтня, 2016. – С. 93 – 94.

19. Валидация ВЭЖХ и люминесцентной методик определения остаточных количеств ривастигмина гидротартрата на поверхностях фармоборудования / **А. А. Федосенко**, А. В. Егорова, Ю. В. Скрипинец, И. И. Леоненко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Тези доповідей IX Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання». – Харків, 18 – 20 квітня, 2017. – С. 83 – 84.

20. Determination of fenspiride hydrochloride residues on pharmaceutical manufacturing equipment surfaces by HPLC method / **G. Fedosenko**, A. Yegorova, Yu. Scrypynets, I. Leonenko, E. Vitukova // Abstracts of IXth International conference in chemistry Kyiv-Toulouse – Kyiv-Toulouse, 4 – 9 June, 2017. – P. 246.

21. Валідація АЕС-ІЗП методики визначення калію та натрію в змивах з поверхонь фармобладнання / А. В. Єгорова, **Г. О. Федосенко**, І. П. Гончаренко, В. П. Антонович // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції – Київ, 18 – 21 жовтня, 2017. – С. 164 – 165.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ		2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ		15
ВСТУП		16
РОЗДІЛ 1	ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ ПІСЛЯ ОЧИЩЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ОБЛАДНАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	21
1.1.	Сучасні вимоги до очищення фармацевтичного обладнання	21
1.2.	Неспецифічні методи	28
1.3	Спектроскопічні методи	30
1.4	Хроматографічні методи	32
1.5	Висновки до розділу 1	35
РОЗДІЛ 2	РЕАКТИВИ ТА АПАРАТУРА	40
2.1	Вихідні сполуки та матеріали	40
2.2	Апаратура та обладнання	40
РОЗДІЛ 3	ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ОБЛАДНАННЯ	42
3.1	Розробка підходів до встановлення критеріїв прийнятності для валідації аналітичної методики контролю якості очищення обладнання (теоретична частина)	42
3.2	Визначення допустимого рівня забруднення за методом «найгіршого випадку»	62
3.3	Висновки до розділу 3	68
РОЗДІЛ 4	МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ДЕЯКИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ ПІСЛЯ ОЧИЩЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ОБЛАДНАННЯ	69

4.1	Оптичні методики аналізу	70
4.1.1	Спектрофотометричне визначення тілорону, L-5-гідрокситриптофану, колагену, бензобіталу	70
4.1.2	Люмінесцентне визначення розувастатину кальцію, флупіртину малеату, абіратерону ацетату, ривастигміну гідротартрату	76
4.1.3	Поляриметричне визначення глюкози	84
4.1.4	АЕС-ІЗП методика визначення залишкових кількостей калію та натрію	86
4.2	Хроматографічні методики аналізу	89
4.2.1	ВЕРХ визначення деяких АФІ після виробництва однокомпонентних препаратів	90
4.2.2	ВЕРХ визначення деяких АФІ після виробництва багатоконпонентних препаратів	104
4.2.3	ВЕТШХ визначення сухого екстракту листя гінкго білоба (по кверцетину)	130
4.3	Висновки до розділу 4	136
	ВИСНОВКИ	138
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	140
	ДОДАТОК 1 Акти впровадження	155
	ДОДАТОК 2 Список публікацій здобувача	160
	ДОДАТОК 3 Таблиці	164

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

- АА – абіратерону ацетат
- АЕС-ІЗП – атомно-емісійна спектрометрія з індуктивно зв'язаною плазмою
- АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт
- ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія
- ВЕТШХ – високоефективна тонкошарова хроматографія
- ГДК (x_{crit}) – гранично допустима концентрація (мкг/мл)
- ДХ – деквалінію хлорид
- ЛП – лікарський препарат
- МВ – межа виявлення
- МКВ – межа кількісного визначення
- РГ – ривастигміну гідротартрат
- РК – розувастатин кальцію
- РСЗ – робочий стандартний зразок
- РФ – рухома фаза
- ТДВ – товариство з додатковою відповідальністю
- ФМ – флупіртину малеат
- ЦГ – цинхокаїну гідрохлорид
- GMP – Good Manufacturing Practice (GMP) (належна виробнича практика)
- MACO* (X_{crit}) – гранично допустима кількість маси залишків попереднього продукту в пробі (в змиві з площі S_l , мкг/сваб)

ВСТУП

Актуальність теми

При виробництві ліків найважливішою вимогою належної виробничої практики (GMP) є очищення обладнання, яка проводиться для запобігання його перехресної контамінації при переході від одного лікарського препарату (ЛП) до іншого. Валідація аналітичної методики контролю залишкових кількостей препарату на обладнанні після процесу очищення, так само як і валідація будь-якої іншої методики аналізу, ґрунтується на встановленні її основної метрологічної характеристики – максимально допустимої невизначеності результату вимірювання $max(\Delta_x)$. При валідації методик контролю якості ЛП максимально допустима невизначеність результатів вимірювання встановлюється на підставі нормативного допуску вмісту активного фармацевтичного інгредієнту (АФІ) в препараті. Величина $max(\Delta_x)$ служить основою розрахунку критеріїв прийнятності, перш за все, лінійності градування. При валідації методик контролю залишкових кількостей ЛП після очищення фармацевтичного обладнання такий підхід неприйнятний, оскільки в кожному конкретному випадку необхідно попередньо встановлювати єдиний норматив – це деяке критичне значення залишків препарату X_{crit} на одиниці площі поверхні обладнання (найчастіше це – максимально допустимий вміст залишків попереднього препарату, що знаходиться на 100 см^2 поверхні фармацевтичного обладнання). Контроль якості очищення обладнання зводиться до того, щоб виявити та кількісно визначити масу препарату на певній одиниці поверхні обладнання. Умовою якісної очистки є вимога того, щоб знайдена, за допомогою даної методики, кількість препарату, не перевищувала значення X_{crit} , яке залежить від багатьох параметрів (площі поверхні обладнання, терапевтичної добової дози попереднього препарату, найменшого розміру серії подальшого препарату та т.п.) та дуже сильно варіюється від препарату до препарату. Для визначення залишкових кількостей АФІ у фармацевтичній промисловості необхідні методи, що характеризуються селективністю по відношенню до аналіту та домішкам – продуктам деградації, що виникають у технологічному процесі та при відмиванні,

а також високою чутливістю. До таких методів, як правило, відносяться високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), люмінесценція та УФ-спектроскопія.

Суттєво, що методичну базу визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання в Україні тільки починають створювати. У зв'язку з цим актуальність даної роботи полягає у науковому обґрунтуванні та створенні нових методик контролю чистоти обладнання фармацевтичного виробництва, системному дослідженні їх хіміко-аналітичних та метрологічних параметрів, науковому обґрунтуванні підходів до валідації методик визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання, що дозволить забезпечити конкурентну спроможність фармацевтичної продукції вітчизняних виробників. Обґрунтований вибір методик аналізу дозволить оптимізувати систему контролю якості фармацевтичного підприємства, досягти економічної ефективності використання контрольної-вимірювальної апаратури.

Зв'язок роботи з науковими темами, програмами, планами

Дисертаційна робота виконана у відділі аналітичної хімії та фізико-хімії координаційних сполук Фізико-хімічного інституту ім. О. В. Богатського НАН України у відповідності з відомчими темами «Біоаналітичне застосування люмінесцентних зондів на основі нових комплексних сполук лантанідів» (2013 – 2014 рр., номер держ. реєстрації 0113U000198); «Розробка, методичне та метрологічне обґрунтування способів контролю якості дозованих лікарських форм флупіртину малеату та розувастатину кальцію» (2015 – 2016 рр., номер держ. реєстрації 0115U001061); «Розробка та валідація методик визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання» (2017 – 2018 рр., номер держ. реєстрації 0217U000101).

Мета і завдання дослідження

Мета роботи полягала у розробці теоретичного підходу до валідації методик визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання, а також у створенні комплексу високочутливих,

специфічних та експресних способів хімічного контролю чистоти обладнання фармацевтичного виробництва на прикладі ряду лікарських препаратів при використанні хроматографічних та оптичних методів аналізу.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

– розробити підходи до валідації методик визначення залишкових кількостей лікарських препаратів (ЛП) при очищенні фармообладнання;

– розробити способи специфічної пробопідготовки для визначення аналітів при контролі якості очищення фармообладнання;

– розробити хроматографічні та оптичні методики аналізу для одно- та багатокомпонентних лікарських засобів, встановити фактори, що забезпечують чутливість та специфічність визначень аналітів в змивах з технологічного обладнання;

– встановити метрологічні характеристики розроблених методик для підтвердження їх відповідності встановленим критеріям та визначити сфери їх практичного застосування.

Об'єкт дослідження – контроль якості очищення фармацевтичного обладнання.

Предмет дослідження – теоретичні підходи встановлення критеріїв очищення фармацевтичного обладнання, розробка та валідація методик визначення залишкових кількостей деяких АФІ для контролю чистоти фармацевтичного обладнання.

Методи дослідження – ВЕРХ, вискоефективна тонкошарова хроматографія (ВЕТШХ), люмінесценція, спектрофотометрія, атомно-емісійна спектрометрія з індуктивно-зв'язаною плазмою (АЕС-ІЗП) та поляриметрія.

Наукова новизна одержаних результатів

Методами математичної статистики з урахуванням вимог GMP розроблені підходи до валідації методик визначення залишкових кількостей ЛП при очищенні фармацевтичного обладнання та показана можливість їх практичного використання при розробці різних методик (хроматографічних, оптичних)

визначення компонентів при виробництві одно- та багатокomпонентних лікарських засобів.

Розроблено та валідовано хроматографічні та оптичні методики визначення залишкових кількостей деяких АФІ на поверхнях фармацевтичного обладнання. Встановлено, що в разі багатокomпонентних лікарських засобів визначення залишкових кількостей АФІ в змивах після очищення фармацевтичного обладнання необхідно проводити по мажорним та важкорозчинним АФІ.

Вперше запропановано для ВЕРХ кількісного визначення амінокислот (L-валіну, L-лейцину та L-ізолейцину) застосування предколоночної дериватизації з реагентом, який широко використовується в органічному синтезі для захисту аміногруп – ди-трет-бутилдикарбонатом.

Вперше запропоновано методику визначення залишкових кількостей рослинної сировини – сухого екстракту листя гінкго білоба (за вмістом кверцетину) методом ВЕТШХ в змивах при очищенні фармацевтичного обладнання. Виявлено, що монотонна зміна інтенсивності абсорбції в залежності від часу перебування кверцетину на поверхні сорбенту пов'язана з його взаємодією з флуоресцентним індикатором UF 254 – силікатом цинку (II). Доведено позитивний вплив фосфорної кислоти, яка перешкоджає комплексоутворюванню, що сприяє стабільності аналітичного сигналу.

Практичне значення одержаних результатів

Розроблені експресні та високочутливі методики хроматографічного (ВЕРХ, ВЕТШХ) та оптичного (спектрофотометричного, люмінесцентного, поляриметричного, АЕС-ІЗП) визначення ряду ЛП в змивах з технологічного обладнання. Методики визначення левана, флупіртину малеату, розувастатину кальцію, фенібуту та парацетамолу впроваджені у практику роботи фармацевтичного підприємства ТДВ «ІНТЕРХІМ» (м. Одеса) (додаток 1).

Особистий внесок здобувача

Аналіз літературних даних, основний об'єм експериментальних досліджень та обробка одержаних результатів виконані безпосередньо автором. Встановлення мети та завдань дослідження, аналіз отриманих результатів, а також

формулювання загальних висновків проведено спільно з науковим керівником.

Автор вдячний за допомогу у виконанні експериментальної частини роботи співробітникам НДАЛ (ТДВ «ІНТЕРХІМ») – Сухоставській Н. М. (використання ВЕРХ з рефрактометричним детектором), Гончаренко І. П. (застосування атомно-емісійного спектрометра з індуктивно-зв'язаною плазмою), к.х.н. Ю. В. Скрипинець (люмінесцентні дослідження). Автор висловлює щире подяку д.х.н., професору В. П. Антоновичу (Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України) та Г. В. Мальцеву (ТДВ «ІНТЕРХІМ») за корисні рекомендації та критичні зауваження.

Апробація результатів дисертації

Основні матеріали дисертаційної роботи доповідалися на Київській конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції (Київ, 2014, 2015, 2016 та 2017), Всеукраїнській науковій конференції студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання» (Харків, 2015 та 2017), Международной научной конференции «Теоретическая и экспериментальная химия глазами молодежи – 2015» (Иркутск, Россия, 2015), 7th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (Varna, Bulgaria, 2015), X Науково-практичній конференції «Управління якістю в фармації» (Харків, 2016), XVII Конференции молодых учёных и студентов-химиков южного региона Украины с международным участием (Одесса, 2015), IXth International conference in chemistry Kyiv-Toulouse (Kyiv, 2017).

Публікації

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 7 статей у фахових періодичних наукових виданнях, 12 тез доповідей у збірниках матеріалів наукових конференцій. Отримано 2 патенти України на корисні моделі.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота складається з вступу, 4 розділів, висновків, списку цитованої літератури, що нараховує 128 найменувань, містить 46 рисунків, 12 таблиць та 3 додатки. Загальний обсяг дисертації складає 168 сторінки машинописного тексту.

РОЗДІЛ 1 ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ ПІСЛЯ ОЧИЩЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ОБЛАДНАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Сучасні вимоги до очищення фармацевтичного обладнання

Сучасне виробництво лікарських препаратів, а також контроль якості отриманої продукції, визначається вимогами, зазначеними у «Good Manufacturing Practice for Medicinal Products (GMP)» (належна виробнича практика) [1, 2]. Обов'язковою умовою забезпечення якості лікарських препаратів є їх виробництво згідно з правилами GMP. Вимоги належної виробничої практики в різних країнах мають свою специфіку, однак всі вони описують загальні принципи, виконання яких дозволяє організувати виробництво згідно з правилами GMP. Одною із найважливіших вимог належної виробничої практики є очищення обладнання. В першу чергу це зумовлено ризиком виникнення контамінації (перекрехреного забруднення) вихідної сировини, напівпродукту, готової продукції та інших матеріалів [3].

Розробка принципів очищення фармацевтичного обладнання пройшла довгий путь [4], починаючи з перших настанов FDA (Food and Drug Administration, Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів), опублікованих у 1991 році [5 – 7]. Ці документи в подальшому були розширені та перевидані [8 – 12].

Лікарські препарати (ЛП) можуть бути забруднені іншими активними фармацевтичними субстанціями, миючими або дезінфікуючими засобами, мікроорганізмами, частинками пилу, мастильними матеріалами, допоміжними речовинами, проміжною продукцією та ін. До того ж, у багатьох випадках у виробництві різноманітних препаратів використовується одне й те ж саме обладнання. Тому для запобігання контамінації кожного наступного препарату попереднім дуже важливим є проведення ефективної процедури очищення обладнання з обов'язковою оцінкою ступеня його чистоти [13].

Контамінація виражається кількістю залишків у середовищі, на обладнанні або матеріалі. Контамінація зазвичай виражається як концентрація (число, об'єм)

залишків на певній площі (площинна контамінація) або у певному об'ємі (об'ємна контамінація) [14].

З такої точки зору чистота розуміється, як відсутність залишків у середовищі, на обладнанні або матеріалі. На практиці, однак, дуже складно довести "відсутність" (за окремими винятками), тому визначення чистоти звучить, як низька ступінь контамінації, яка нижче певної граничної концентрації залишків (так званий, критерій прийнятності) [15]. Таке поняття "чистоти" має певну перевагу – її можна досягти практично та оцінити.

Залежно від природи залишків розрізняють такі типи контамінації: фізична (механічна); хімічна; біологічна. Залежно від способу розсіювання залишків по поверхні обладнання розрізняють рівномірне та нерівномірне забруднення [16].

Більшість процедур очищення спрямовано на видалення лікарських (активних) речовин з поверхні обладнання, пристосувань та оснащення. В дійсності контамінація може бути викликана різними типами залишків [17].

Активні речовини. З урахуванням впливу на пацієнта мають бути видалені з поверхонь (або матеріалів) в першу чергу. В разі наявності декількох активних речовин потрібна відсутність кожного з них.

Продукти розпаду. Продукти розпаду, які чинять активну дію на пацієнта та можуть утворюватися у ході технологічного процесу або від контакту з миючими засобами, необхідно також видалити в першу чергу.

Допоміжні речовини. Наповнювачі, ароматизатори, барвники та т.п., а також продукти їх розпаду, необхідно надійно усувати.

Частки. Процедури очищення мають забезпечувати видалення також нерозчинних часток. Мається на увазі, насамперед, пил, волокна, які призводять до явних дефектів лікарських препаратів.

Технічні засоби. Мастильні матеріали, масла, жири, які використовуються для правильної роботи та техобслуговування обладнання, також можуть бути джерелом контамінації. На практиці рекомендується по можливості використовувати харчові мастильні матеріали.

Миючі засоби. Миючі засоби, які використовуються для мийки, слід обов'язково перевіряти на їх наявність у воді останнього ополіскування. Для

виробничих цілей необхідно обов'язково знати склад миючого засобу та основну увагу приділяти проблемним компонентам.

Дезінфікуючі засоби. Дезінфікуючі засоби з антимікробним ефектом мають бути видалені з усіх поверхонь після впливу останніх на мікроорганізми.

Мікроорганізми. Наявність мікроорганізмів призводить до проблем, насамперед, у стерильному виробництві, а також у виробництві пероральних препаратів. Тому їх необхідно видаляти завжди та послідовно.

Пірогени. Речовини, які викликають підвищення температури тіла у вищих організмів, та виникають під впливом мікроорганізмів (наприклад, ендотоксини) або хімічних процесів. Їх необхідно видаляти в першу чергу на виробництві парентеральних стерильних лікарських препаратів.

Допустимі межі для залишків на поверхні обладнання.

Встановлення допустимих меж залишків на поверхні обладнання після проведеного очищення – вирішальний елемент якісної програми валідації процесу очищення. Існує різниця між критерієм прийнятності та межею для залишків на поверхні обладнання. Критерій прийнятності означає критерій для прийняття рішення з чистоти обладнання та залежить від таких аспектів, як:

- межі залишків на поверхні обладнання;
- загальна площа обладнання, з якої проводився пробовідбір;
- спосіб пробовідбору;
- спосіб приготування проби;
- умови аналітичного методу.

Межею для залишків на поверхні обладнання, яку ще можна допустити після проведення очищення без впливу на якість подальшого продукту, є розраховане (теоретичне) значення максимально допустимої кількості залишків на поверхні обладнання (*MASO*, maximum allowable carryover – максимально допустиме перенесення, мкг/сваб) або гранично допустима концентрація (ГДК, мкг/мл) [18, 19].

У протоколі з валідації процесу очищення необхідно вказувати як допустимі межі для залишків, так і конкретні критерії прийнятності.

Передбачається, що допустимі межі та критерії прийнятності будуть:

- практичними та адекватними для фактичного очищення;
- перевіряємими за допомогою засобів виявлення;
- досяжними за допомогою аналітичних методів;
- науково обґрунтованими.

Дуже важливо, щоб межі для очищення обирались на підставі наукових та логічних обґрунтувань. Наукове обґрунтування чисельного значення фактичної межі має бути логічним, повним та зрозумілим [20]. Підприємство само повинно встановлювати допустимі межі вмісту залишків продуктів (критерії прийнятності), взявши до уваги речовини, які використовуються та їх терапевтичну дозу. Їх значення мають бути обґрунтованими, досяжними та мають піддаватися перевірці [21, 22].

До установлення меж може бути застосований будь-який з наступних підходів:

- проведення валідації очищення для кожного з препаратів, що випускається;
- групування препаратів та вибір препарату, який представляє «найгірший випадок»;
- групування препаратів по групах ризику (наприклад, легкокорозивні препарати, препарати з подібною активністю, високотоксичні препарати, а також препарати, які важко виявити).

Згідно з рекомендаціями PIC/S [23] допустима кількість залишків препарату повинна відповідати наступним критеріям:

- в максимальній добовій дозі препарату може міститись не більше 0,1 % середньої терапевтичної дози будь-якого виготовленого перед ним препарату;
- в препараті не має міститись більше ніж 10 ppm (particle per million) будь-якого іншого препарату;
- після завершення процедур очищення на обладнанні не має бути видимих слідів.

Необхідно визначити концентрацію, при якій стають видимими найбільш активні інгредієнти, за допомогою проведення досліджень при відомому забрудненні. Межа вмісту для певних інгредієнтів, які є алергенами (пеніциліни,

цефалоспорини) або сильнодіючими речовинами (деякі стероїди та цитотоксини), має бути нижче межі виявлення, встановленого за допомогою найсучасніших аналітичних методів [24].

Процеси очищення можуть запобігти серйозним наслідкам перехресної контамінації продукції, але їх ефективність повинна бути перевірена за допомогою валідації [25, 26].

Валідацію очищення обладнання доцільно починати з розробки валідаційних майстер-планів очищення, які встановлюють політику та основні вимоги до об'єму та порядку проведення валідації очищення, змісту, оформленню, утвердження, зберігання, контролю за змінами валідаційної документації, врахування аналізів ризиків, розподілу відповідальностей та функціональних обов'язків, термінами проведення супутньої або повторної валідації та т.д., тим самим дозволяючи підприємствам раціонально планувати ресурси, час та собівартість робіт з валідації очищення [27, 28].

Процес валідації очищення обладнання починається після закінчення розробки циклу очищення. Даний процес, згідно з правилами GMP, включає розробку протоколів, які демонструють ефективність процедур очищення обладнання та застосовуваних засобів для чищення. Вибір адекватного підходу до валідації очищення суттєво залежить від розмірів, складності та функціонування системи очищення. Незалежно від складності системи можна визначити загальну схему проведення валідації: після проведення тестів, аналізи отриманих зразків порівнюють з заздалегідь позначеними допустимими межами вмісту забруднюючих речовин. Основною метою при підготовці до проведення валідації є вибір методів відбору проб та аналітичних методів [29 – 31].

Для валідації процесу очищення вважається критичним моментом перевірка методу пробовідбору в поєднанні з обраним аналітичним методом для того, щоб перевірити правильність отриманих результатів [32, 33]. Вибір методу відбору проб залежить від характеру забруднення, допустимої кількості забруднення та конструкції обладнання [34].

Відбір проб необхідно проводити після закінчення процесу очищення та

сушки обладнання протягом часу, зазначеного в протоколі валідації. При цьому обладнання має бути перевірене на наявність залишків активних фармацевтичних субстанцій, допоміжних речовин, миючих засобів [35 – 37]. Спочатку слід провести візуальну перевірку обладнання на наявність видимих залишків.

Прямий відбір проб з поверхні (метод мазків) використовується для оцінки якості очищення тих поверхонь обладнання, з якими може контактувати продукт. Цей метод рекомендується використовувати для обладнання, яке має нерівні поверхні або яке не дає змоги отримати зразки методом змиву (млини, таблетпрес, гомогенізатори). Проби слід відбирати не менш ніж з п'яти ділянок за допомогою трафарету, який має стандартний розмір, та аплікатора (сваба), змоченого розчинником для розглянутих активних речовин [38]. Після цього вміст аплікатора екстрагують та визначають кількісний рівень активної речовини в рідині. Далі необхідно розрахувати загальну кількість залишків, які є на поверхні. Цей кінцевий рівень забруднення повинен задовольняти критеріям прийнятості, встановленим раніше при проведенні експериментальних досліджень. Попередньо слід визначити також придатність матеріалу аплікатора та середовища, які використовуються для відбору проб. Вибір матеріалу аплікатора може вплинути на можливість точного відбору проби. Тому в експериментальних дослідженнях слід встановлювати, яка кількість активної речовини переходить з аплікатора у середовище для відбору проб та/або розчинник. Важливо також переконатися, що середовище для відбору проб та/або розчинник готові до використання (зовнішній вигляд, строк придатності та ін.) [39].

Метод змивів (аналіз останніх промивних вод – final rinse) зручний для оцінки ефективності очищення систем, до яких немає прямого доступу, або частин обладнання, які не можна знімати. Використання цього методу дозволяє проводити відбір проб з великої площі поверхні, а також для систем, які очищаються на місці. При використанні цього методу очищене та висушене обладнання промивають невеликою кількістю води очищеної або води для ін'єкцій. Рідину для відбору проб слід обирати, виходячи з розчинності активної речовини та її придатності для подальшого аналізу. Далі необхідно відібрати та

оцінити проби рідини на вміст залишків активних речовин (в мг/мл), а потім розрахувати загальну кількість залишків, що містяться в змивах та порівняти отримані результати з критеріями прийнятості. Суттєвими труднощами при використанні даного методу є можливість отримання значного розведення, тому кількісний вміст активної речовини не завжди можна буде визначити наявним аналітичним методом. Тому слід використовувати обмежений загальній об'єм рідини, яка використовується для змиву, або концентрувати пробу нагріванням чи за допомогою вакуумного сушіння з урахуванням стабільності залишків. На думку співробітників FDA [7], переважним є прямий метод відбору проб з поверхні обладнання.

Однак, часто використання кожного з вказаних вище методів окремо не забезпечують необхідної надійності результатів. Для надійної оцінки рівномірності розподілу залишків на поверхні обладнання необхідно проаналізувати проби, отримані методом мазків з поверхонь, у поєднанні з пробамі, отриманими методом змивів. Для отримання достовірних результатів ефективності очищення обладнання можливо провести аналіз останнього конденсату пари, яка використовується для обробки обладнання, що забезпечує досягнення важкодоступних ділянок. Крім того, можливо використання методу «плацебо», який полягає у виробництві серій плацебо на очищеному обладнанні у звичайних виробничих умовах з подальшим дослідженням їх на наявність забруднень [40].

Важливим питанням є оцінка ефективності процедур очищення щодо видалення залишків миючих засобів. Миючі засоби не входять до складу продукту. Вони призначені тільки для полегшення проведення очищення обладнання та не мають залишатися на обладнанні після останнього ополіскування, тому потрібно встановити допустимі межі вмісту миючого засобу після очищення, для чого необхідно знати їх склад. В ідеальному випадку залишки миючих засобів не повинні бути виявлені. Під час проведення валідації процесу очищення необхідно враховувати здатність миючого засобу до розпаду [24].

1.2 Неспецифічні методи

Складний вміст аналізованих матриць (особливо при низькому вмісті ЛП) вимагає використання виборчих та чутливих методів їх визначення. В той же час не менш значущою є вимога високої продуктивності, надійності та можливості отримання великого обсягу аналітичної інформації при проведенні аналізу в виробничих умовах [13]. Вибір аналітичного методу для визначення чистоти обладнання необхідно розглядати в комбінації з методом відбору проб та допустимими межами прийнятості з чистоти обладнання. В усіх випадках метод, який використовується, необхідно валідувати [41]. Методи відрізняються між собою за способом виконання, підготовки проби та власне аналізом.

Розрізняють неспецифічні та специфічні (вибіркові) аналітичні методи:

- неспецифічні методи – визначення загального органічного вуглецю, рН-метрія, кондуктометрія;
- специфічні методи – хроматографічні (ВЕТШХ, ВЕРХ, ГРХ), атомно-абсорбційні, спектральні методи (спектрофотометрія, флуоресценція), капілярний електрофорез [42].

Неспецифічні методи дозволяють визначати вміст суми залишків, в той час коли специфічні методи дозволяють визначати аналіт в присутності інших забруднювачів. Неспецифічні методи можна використовувати на ранніх стадіях виробництва (in-bulk). Специфічні аналітичні методи затребувані, як правило, для валідації процесу очищення обладнання з виробництва готових лікарських форм та для цілей рутинного моніторингу.

Аналітичні методи мають переваги й недоліки, а їх вибір залежить від багатьох факторів (аналітів, обладнання, процедури очищення).

Візуальний контроль. Раніше візуальний огляд був основним методом оцінки чистоти поверхонь та використовувався для некритичних поверхонь. Поняття «візуально чистий» відвідає приблизно рівню забруднення 4 мкг/см² [36]. Згідно з правилами GMP потрібне проведення візуального контролю обладнання на чистоту безпосередньо перед використанням. Візуальний контроль являє собою комбінацію відбору проб та аналізу, коли спостерігач проводить

безпосереднє визначення чистоти виробничого обладнання змивних вод у розсіяному денному світлі [43] (таблиця 1.1). Візуальний контроль виробничого обладнання можна зробити суворішим за рахунок використання освітлення поверхні обладнання ультрафіолетовим світлом, що ефективно для виявлення тих залишків, які під його впливом флуоресціюють [44]. Для контролю часток на внутрішній поверхні обладнання можна використовувати:

- перегляд в ультрафіолетовому світлі;
- перегляд під похило-падаючим білим світлом високої інтенсивності;
- відлік та вимір розміру часток за допомогою оптичного мікроскопу.

Також засобом для посилення оптичного контролю є використання барвника (зазвичай у формі аерозолю), який утворює з певними залишками (наприклад, протеїнами) кольорові комплекси, а останні, в свою чергу, легше піддаються виявленню, ніж просто залишки.

Серед методів, які не поребують відбору проб та використовуються для контролю якості очищення обладнання, застосовуються методи *термогравіметрії* [45] та *ІЧ – спектроскопії* з користанням для детектування аналізатора Block Engineering's LaserScan™ Analyzer [46, 47].

Потенціометричний метод може служити в якості чутливого тесту з очищення:

- у випадку залишків кислого чи лужного характеру проводять вимірювання рН;
- у випадку залишків солей проводять вимірювання за допомогою іон-селективних електродів [48].

До великої переваги даного прямого методу слід віднести той факт, що він не потребує пробовідбору, а показання можна отримувати після прямого занурення зонда рН-метра в розчин зразка. Зонди для вимірювання рН можна використовувати «on-line» для різноманітного виробничого обладнання та систем водопідготовки. Так як комерційним детергентам притаманні сильно кислі або лужні властивості, таке просте вимірювання служить у якості додаткового підтвердження того, що детергент по закінченню процесу очищення був

видалений [49].

Кондуктометрия (вимірювання електропровідності) чутлива до наявності іонів будь-якої природи та використовується для оцінки рівня забруднення речовинами іоної природи [50, 51], широко застосовується в методі «очищення на місці» (Cleaning-in-place, СІР – метод очищення внутрішніх поверхонь обладнання або технологічної системи в цілому, без розбирання), який передбачає видалення залишків миючих засобів.

Метод визначення загального органічного вуглецю (ЗОВ) (ТОС – total organic carbon) працює за принципом каталітичного окиснення присутнього вуглецю та вимірювання вуглекислого газу, який утворився, з подальшою реєстрацією ІЧ-детектором на аналізаторі ТОС. Одним із шляхів додатку методу ЗОВ для валідації процесу очищення є передумова, що всі знайдені залишки відносяться до компоненту-забруднику [52, 53].

Даний метод широко використовується для визначення контролю перекрестного забруднення фармацевтичного обладнання у виробництві лікарських препаратів [54 – 59] та дає змогу виявляти органічні забруднення у винятково малих концентраціях, до рівня *ppt*, але дає загальну картину забруднення.

Добрі результати оцінки рівня забруднення дає комбінація трьох методів: потенціометричного визначення рН, кондуктометрії та методу ЗОВ. Існують аналізатори, які показують електропровідність води та рівень ЗОВ одночасно.

1.3 Спектроскопічні методи

Важливо, щоб аналітичний метод був достатньо специфічним та чутливим, а також сумісним з допустимими межами для контролю перекрестного забруднення готової продукції та виробничого обладнання. Таким вимогам задовольняють спектроскопічні та хроматографічні методи аналізу, які все ширше застосовуються в аналітичній практиці контролю процесів хіміко-фармацевтичного виробництва.

Методи атомно-абсорбційної та атомно-емісійної спектроскопії (ААС та АЕС) широко застосовуються для визначення залишкових кількостей АФІ на

поверхнях фармацевтичного обладнання, їм властива висока селективність та низькі межі виявлення, простота пробопідготовки [60, 61].

Відома методика непрямого визначення цисплатину методом ААС в змивних водах [60], яка базується на реакції взаємодії цисплатину з діетилдитіокарбаматом (ДДТК) з утворенням комплексу Pt-ДДТК, з наступним визначенням концентрації платини. В роботі [61] запропонована методика визначення літію методом атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язною плазмою (АЕС-ІЗП).

Для визначення залишкових кількостей АФІ на поверхнях фармацевтичного обладнання також використовують спектрометрію іонної рухливості (СІР) (Ion Mobility Spectrometry – IMS). Іонізована молекула будь-якої речовини володіє строго визначеною рухливістю в слабкому електричному полі. Для іонізації молекул можуть застосовуватися радіоактивні ізотопи, ультрафіолетове або лазерне випромінювання, коронний розряд, поверхнева іонізація. Різні типи іонів досягають детектора за різний час та формують іонний спектр досліджуваної речовини. Цей метод характеризується високою чутливістю та експресністю [62 – 64].

ЛП завдяки наявності у своїй структурі хромофорів (конденсовані ароматичні, гетероциклічні фрагменти), здатні інтенсивно поглинати УФ-випромінювання. Для підвищення продуктивності рутинного визначення залишкових кількостей АФІ на поверхнях фармацевтичного обладнання застосовують спектрофотометричний аналіз, заснований на власному поглинанні в УФ-області спектру [65 – 70].

У роботі [66] продемонстрована можливість визначення залишкових кількостей диклофенаку натрію методом УФ-спектрометрії. Визначення ведеться за довжини хвилі 267 нм. Методика характеризується низькою межею виявлення, яка становить 0,014715 мг/мл та високим коефіцієнтом вилучення – 94,58 %.

ЛП здатні проявляти власну флуоресценцію або можуть бути перетворені у речовини, продукти яких проявляють флуоресценцію, для подальшого аналізу, тому для їх визначення на поверхнях перспективно використовувати люмінесцентний [71] та хемілюмінесцентний методи [72], які достатньо

експресні та високочутливі (табл. 1.1).

Новий діодний датчик (*light-emitting diode, LED*) створює випромінювання при пропусканні через нього електричного струму, представлений в якості аналітичної методології для онлайн-перевірки очищення у фармацевтичній промисловості. Цей датчик відрізняється можливістю динамічного управління як довжиною хвилі збудження, так і параметрами виявлення (емісії), що дозволяє його застосовувати для швидкого визначення залишків препаратів. Ця особливість робить його ідеальною альтернативою звичайній аналітичній методології та дозволяє значно скоротити час аналізу, що дуже важливо для процесів очищення [71].

В якості хемілюмінесцентної системи для визначення цефметазолу запропонована система на основі люмінолу [72].

1.4 Хроматографічні методи

Головними причинами, стримуючими широке застосування ВЕРХ в рутинній практиці, є наступні:

- відносно висока складність та вартість обладнання для ВЕРХ, для правильної експлуатації якого необхідні висококваліфіковані оператори;
- необхідність використання великих об'ємів спеціально очищених та, отже, дорогих розчинників для рухомих фаз.

Іноді використовують газову хроматографію (ГХ) та високоефективну тонкошарову хроматографію (ВЕТШХ).

Метод газової хроматографії широко застосовується у контролі якості ЛП для визначення залишкових кількостей органічних розчинників, але можна його використовувати для визначення залишкових кількостей речовин на поверхнях фармацевтичного обладнання. Запропоновані методики газової хроматографії з використанням полум'яно-іонізаційного детектора для визначення залишкових кількостей ізопропанолу, що використовується в якості миючого агента при очищенні обладнання [73], та метенамін гіпурату (з використанням у якості внутрішнього стандарту *n*-крезолу) [74] на поверхнях фармацевтичного обладнання. Визначення проводять з використанням капілярних колонок.

Високоєфективна тонкошарова хроматографія ВЕТШХ також застосується для визначення ЛП на поверхнях фармацевтичного обладнання. Сучасні технічні рішення для ВЕТШХ ставлять цей метод в один ряд з ВЕРХ. У ВЕТШХ використовуються високоєфективні пластини. Для нанесення проби на пластину використовується автоматичний аплікатор. У більшості випадків в ВЕТШХ застосовується скануючий спектрофотометричний УФ-детектор. Валідація очищення із застосуванням ВЕТШХ-аналізу може бути проведена з необхідною точністю. Метод простий та швидкий. Результати, отримані з використанням методу кількісної денситометрії, точні й достовірні [75, 76].

Широко застосовують рідинну хроматографію з мас-спектрометричним детектуванням (РХ-МС/МС) [77, 78], ВЕРХ с флуоресцентним [79], кондуктометричним [80, 81] та спектрофотометричним [82 – 117] детекторами. Ряд методичних деталей (суміші розчинників, рН середовища, довжина хвиль поглинання) наведені в таблиці 1.2.

Розроблено чутливий та селективний спосіб визначення ряду цефалоспоринових антибіотиків з використанням комплексу рідинного хроматографа – тандемного мас-спектрометра. Перевага даної методики, порівняно з відомими раніше, полягає в застосуванні суттєво менших кількостей органічних екстрагентів. Поєднання ВЕРХ з МС/МС при атмосферному тиску дозволило досягти кращої чутливості та селективності [78].

Здатність ЛП поглинати в УФ-діапазоні дозволяє використовувати для їх визначення обернено-фазову ВЕРХ з спектрофотометричним детектором.

У разі, якщо очищення обладнання проводилось за допомогою різноманітних миючих агентів, необхідно також проводити визначення залишкових кількостей детергентів, які були використані. Методом іонної хроматографії в роботі [81] показана можливість визначення лужного детергента СІР-100, заснована на визначенні його компонента – етилендіамінтетраоцтової кислоти.

Високоєфективний рідинний хроматограф з чутливим діодно-матричним детектором застосовували в роботі [92] для визначення залишкових кількостей набуметону. Визначення проводили з використанням хроматографічної колонки

Phenomenex Luna C18 4,6 мм×250 мм, з розміром часток 5 μm. Визначення проводили за довжини хвилі 230 нм. Межа виявлення складає 0,05 мкг/мл.

У роботі [85] описана методика визначення залишкових кількостей дигоксину на поверхнях фармацевтичного обладнання з використанням ВЕРХ з УФ-детектором. Визначення проводили на хроматографічній колонці, яка містить сорбент, модифікований октадецилсилільними групами, в якості рухомої фази виступала суміш ацетонітрил:вода (28:72, об/об). Детектування проводили за довжини хвилі 220 нм. Межа виявлення – 0,010 мкг/мл.

У роботі [90] описана методика визначення двох компонентів – кліндаміцину фосфату та третиноїну. Визначення проводили методом обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії з використанням хроматографічної колонки Hupersil BDS C18 4,6 мм×150 мм, з розміром часток 5 μm. Методика передбачає використання градієнтного режиму, тобто різне співвідношення двох рухомих фаз у часі. Рухома фаза А – суміш триетиламінового буферу з рН 3,0 з тетрагідрофураном (95:5, об/об), рухома фаза Б – ацетонітрил. Детектування проводили за довжини хвилі 210 нм – для кліндаміцину фосфату та 356 нм – для третиноїну, з межами виявлення 0,63 мкг/мл та 0,013 мкг/мл, відповідно.

Методом обернено-фазової високоефективної хроматографії в роботі [96] описана методика визначення одночасно двох компонентів – парацетамолу та диклофенаку калію. Визначення проводили з використанням хроматографічної колонки Hibar C18 4,6 мм×250 мм, з розміром часток 5 μm, в якості рухомої фази був використаний фосфатний буфер рН 3,0 та ацетонітрил (30:70 об/об). Час виходу парацетамолу в даних умовах складає 3,1 хв, а для диклофенаку калію – 7,4 хв. Детектування проводили за довжини хвилі 275 нм.

Відомо застосування ВЕРХ для визначення декількох АФІ після виробництва багатокомпонентних препаратів, наприклад, що містять ацетамінофен, кофеїн та кодеїну фосфат [79], піриметамін та сульфадоксин [83], кліндаміцин фосфат та третиноїн [90], парацетамол та диклофенак калію [96].

Різноманітні варіанти хроматографії широко застосовні для визначення залишкових кількостей АФІ на поверхнях фармацевтичного обладнання, тому що

мають високу селективність, експресність та низькі межі виявлення, просту пробопідготовку та можливість визначення декількох аналітів з одного розчину за єдиною методикою.

1.5 Висновки до розділу 1

Систематизовані та проаналізовані літературні дані о методах визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання. Показані можливості застосування для цих цілей ряду неспецифічних та специфічних аналітичних методів.

Аналіз публікацій останніх років дозволяє констатувати високу актуальність досліджень з розробки нових селективних та високочутливих методик визначення лікарських препаратів для їх контролю після очищення фармацевтичного обладнання, а також вказує на відсутність обґрунтованих критеріїв валідації аналітичних методик очищення фармацевтичного обладнання та методик очищення після виробництва багатокomпонентних препаратів.

Доцільним та перспективним є вивчення можливості визначення ряду лікарських препаратів (при виробництві одно- та багатокomпонентних лікарських форм) з використанням хроматографічних та оптичних методів аналізу та встановлення критеріїв валідації методик визначення залишкових кількостей ЛП після очищення фармацевтичного обладнання.

Таблиця 1.1

Методи визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання

Лікарський препарат	Метод	Умови експерименту	Інтервал концентрацій	МВ	Літ.
1	2	3	4	5	6
Хлордіазепоксид	Візуальний	Розсіяне денне світло	-	-	[43]
Кофеїн, рутин	Візуальний	УФ-світло	-	-	[44]
Хлорид-іон	Потенціометрія	Іоноселективний електрод	-		[48]
Детергенти	Потенціометрія	Вимірювання рН	10 – 1000 мкг/мл	-	[49]
	Кондуктометрія	-			
Дезинфікуючий засіб	Кондуктометрія	-	-	1 ppm	[50]
АФІ Пфайзер	ІЧ-спектрометрія	2000 – 1200 см ⁻¹	4 – 21 мкг/см ²	4 мкг/см ²	[47]
Цефрадин	ЗОВ	ТОС аналізатор	30 – 600 нг/мл	315 мкг/мл	[55]
Аторвастатин	ЗОВ	ТОС аналізатор	7300 – 83800 мкг	4,19 мкг	[54]
Цефтриаксон	ЗОВ	ТОС аналізатор	1 – 9 ppb	0.01 ppb	[59]
Вакцина проти менінгокока А	ЗОВ	ТОС аналізатор	-	< 500 ppb	[57]
Полісорбат 20	ЗОВ	ТОС аналізатор	0,25 – 5 ppm	-	[56]
Цисплатин	ААС	Pt-ДДТК, екстрагент-дихлорметан	0,5 – 20 ppb	0,5 ppb	[60]
Літій	АЕС-ІЗП	$\lambda = 670,8$ нм	0,2 – 20 ppb	0,1 ppb	[61]
Діацетил мідекаміцин	СІР	-	0,04 – 4,5 мкг/мл	0,012 мкг/мл	[63]
Таларозол	СІР	-	-	43 нг/мл	[64]
Глюкоза	СФ	антроновий реактив, $\lambda = 625$ нм	-	5 мкг/мл	[65]
Диклофенак натрію	СФ	$\lambda = 267$ нм	0,5 – 3,0 мкг/мл	0,015 мкг/мл	[66]
Аторвастатин	СФ	$\lambda = 246$ нм	5,0 – 25 мкг/мл	0,419 мкг/мл	[54]
Рибоксин	СФ	$\lambda = 249$ нм	0,5 – 10,0 ppm	-	[67]
Ципрофлоксацин	СФ	$\lambda = 276$ нм	2,0 – 10,0 мкг/мл	0,514 мкг/мл	[68]
Валсартан	СФ	$\lambda = 233$ нм	1,0 – 10,0 мкг/мл	0,2 мкг/мл	[69]
Офлоксацин	СФ	$\lambda = 318$ нм	1,0 – 13,0 мкг/мл	-	[70]
Цефметазол	Хемілюмінесценція	люмінол	0,3 – 1,5 нг/мл	0,06 нг/мл	[72]

1	2	3	4	5	6
Ізопропанол (2-пропанол)	ГХ	Капілярна колонка, 4,9 мл\мин; 200°C (температура введення проб); 280°C (температура детектора)	2,8 – 110,7 мкг/мл	1,1 мкг/мл	[73]
Метенамін гіпурат	ГХ	Капілярна колонка Supelcowax®-10	-	5,0 мкг/мл	[74]
Цефалоспоринові антибіотики	ВЕРХ -MS/MS	0,1 % мурашина кислота: ацетонітрил (10:90)	-	10 фг	[78]
Ацетамінофен Кофеїн	ВЕРХ	$\lambda = 210$ нм	0,11–26,29 мкг/мл 0,02–3,75 мкг/мл	0,233 мкг/мл 0,083 мкг/мл	[79]
Кодеїн фосфат	ВЕРХ (флуориметричний детектор)	$\lambda_{збуд} = 245$ нм $\lambda_{ем} = 345$ нм	0,01 – 2,23 мкг/мл	0,016 мкг/мл	
Докузат натрію	ВЕРХ (кондуктометричний детектор)	-	1 – 10 ppm	-	[80]
Лужний детергент СІР -100 (визначають ЕДТА)	ВЕРХ (кондуктометричний детектор)	-	-	0,13 ppm	[81]
Диклофенак натрію	ВЕРХ	метанол : вода (40:60) рН 3,5; $\lambda = 218$ нм	2 – 10 мкг/мл	0,175 мкг/мл	[82]
Приметамін Сульфадоксин	ВЕРХ	метанол : вода рН 3,0 (35:65) $\lambda = 270$ нм	0,042 – 4,02 мкг/мл 0,040 – 4,06 мкг/мл	0,042 мкг/мл 0,040 мкг/мл	[83]
Дигоксин	ВЕРХ	вода : ацетонітрил (70:30) $\lambda = 218$ нм	0,025 – 05 ppm	0,01 ppm	[84]
	ВЕРХ	ацетонітрил: вода (28:72); $\lambda = 220$ нм	1,05 – 12.5мкг/мл	0,010 мкг/мл	[85]
Мелоксикам	ВЕРХ	0,2% розчин амонію фосфату рН 7,0 : метанол (63:37); $\lambda = 254$ нм	0,11 – 88 мкг/мл	0,11 мкг/мл	[85]
Вінпоцетин	ВЕРХ	0,2 М розчин амонію ацетату : ацетонітрил (70:30), $\lambda = 280$ нм	0,002 – 0,05 %	0,0005 %	[87]

1	2	3	4	5	6
Антрациклін	ВЕРХ	0,37% розчин лауріл сульфату: метанол:ацетонітрил (54:16:30); рН 2,5; $\lambda = 254$ нм	0,155 – 194 мкг/мл	0,047 мкг/мл	[88]
Кліндаміцин фосфат Третиноїн	ВЕРХ	$\lambda = 210$ нм $\lambda = 356$ нм ; рН 3,0	1,9 – 30,5 мкг/мл 0,04 – 30,2 мкг/мл	0,63 мкг/мл 0,013 мкг/мл	[90]
Набуметон	ВЕРХ	метанол:ацетонітрил:вода (55:30:15); $\lambda = 254$ нм	0,1 – 4,56 мкг/мл	0,16 мкг/мл	[92]
Іринотекану гідрохлорид	ВЕРХ	0,02 М калію фосфат рН 3,5 : метанол: ацетонітрил (60:20:20); $\lambda = 220$ нм	0,024 – 0,143 мкг/мл	0,008 мкг/мл	[93]
Цефдинір	ВЕРХ	ацетонітрил: фосфатний буферний розчин (85:15); $\lambda = 254$ нм	14,5 – 74,5 мкг/мл	0,7 мкг/мл	[94]
Олмесартану методоксоміл	ВЕРХ	ацетонітрил: метанол: буферний розчин (28:13:58); $\lambda = 258$ нм	0,557 – 5,62 мкг/мл	0,07 мкг/мл	[95]
Парацетамол Диклофенак калію	ВЕРХ	ацетонітрил: розчин калію гідрофосфату (30:70); рН 3,0; $\lambda = 275$ нм	10,0 – 60 мкг/мл 1,0 – 6,0 мкг/мл	0,1 нг/мл 1,0 нг/мл	[96]
Тирофібан	ВЕРХ	ацетонітрил: розчин амонію ацетату рН 6,0 (1,36 г/л) (29:71) $\lambda = 227$ нм	1,0 – 2,9 мкг/мл	0,04 мкг/мл	[97]
Ацетилсаліцилова кислота	ВЕРХ	вода: ацетонітрил: фосфорна кислота (779:220:1); $\lambda = 226$ нм	0,2 – 20,0 мкг/мл	0,07 мкг/мл	[98]
Верапаміл	ВЕРХ	метанол: вода: триетиламін (70:30:02); $\lambda = 278$ нм	1,7 – 50,0 мкг/мл	0,09 мкг/мл	[99]
Офлоксацин	ВЕРХ	0,024 % розчин лаурілсульфат натрію: ацетонітрил : оцтова кислота (500:480:20); $\lambda = 294$ нм	2,0 – 2000 нг/мл	0,55 нг/мл	[100]
Лацидипін	ВЕРХ	ацетонітрил: 0,05 М розчин амонію ацетату (88:12); $\lambda = 282$ нм	0,5 – 100 мкг/400 см ²	0,1 мкг/400 см ²	[101]
Амлодипін	ВЕРХ	ацетонітрил:метанол: триетиламін рН 3,0 (15:35:5); $\lambda = 278$ нм	0,39 – 1,56 мкг/мл	0,02 мкг/мл	[102]

1	2	3	4	5	6
Рутин	ВЕРХ	ацетонітрил: метанол: буферний розчин рН 4,0 (15:10:75); $\lambda = 354$ нм	0,0829 – 1,2435 мкг/мл	0,0075 мкг/мл	[103]
Цефтриаксон натрію	ВЕРХ	ацетонітрил: вода: буферний розчин рН 7: буферний розчин рН 5 (39:55:5,5:0,5); $\lambda = 254$ нм	1,15 – 6,92 мкг/мл	0,05 мкг/мл	[104]
Фенітоїн натрію	ВЕРХ	фосфатний буферний розчин рН 3,5; $\lambda = 254$ нм	2,0 – 10,0 мкг/мл	0,176 мкг/мл	[105]
Клобетазолу пропіонату	ВЕРХ	ацетонітрил: вода (75:25); $\lambda = 240$ нм	0,07 – 30 мкг/мл	0,024 мкг/мл	[106]
Праміпексол дигідрохлорид	ВЕРХ	фосфатний буферний розчин рН 6,0 : ацетонітрил : метанол (75:15:10); $\lambda = 260$ нм	0,004 – 0,04 мкг/мл	0,001 мкг/мл	[108]
Валганцикловіру гідрохлорид	ВЕРХ	2,5 % триетиламін рН 3,0 : метанол (93:7, %); $\lambda = 254$ нм	0,031 – 2,0 мкг/мл	0,08 мкг/мл	[107]
Азатіоприн	ВЕРХ	метанол: вода: оцтова кислота (20:80:1); $\lambda = 280$ нм	2,0 – 22,0 мкг/мл	0,29 мкг/мл	[109]
Тербінафін гідрохлорид	ВЕРХ	0,1% розчин триетиламіну: ацетонітрил (15:85); $\lambda = 224$ нм	0,02 – 20,0 мкг/мл	0,007 мкг/мл	[110]
Дулоксетину гідрохлорид	ВЕРХ	0,01 М калію дигірофосфат, рН 3: ацетонітрил (60:40); $\lambda = 230$ нм	0,05 – 5,0 мкг/мл	0,006 мкг/мл	[111]
Дієногест Естрадіол Етинілестрадіол Фінастерид Гестоден Левоноргестрел Норетистерон ацетат	ВЕРХ	ацетонітрил: вода (48:52, об/об) $\lambda = 220$ нм	0,12 – 4,55 мкг/мл 0,05 – 8,00 мкг/мл 0,05 – 1,51 мкг/мл 0,10 – 2,03 мкг/мл 0,15 – 1,04 мкг/мл 0,30 – 1,00 мкг/мл 0,35 – 8,00 мкг/мл	0,06 мкг/мл 0,02 мкг/мл 0,02 мкг/мл 0,05 мкг/мл 0,07 мкг/мл 0,15 мкг/мл 0,20 мкг/мл	[112]
Ранітидину гідрохлорид	ВЕРХ	метанол: вода (50:50); $\lambda = 320$ нм	20 – 10 000 нг/мл	2 нг/мл	[113]
Суматриптану сукцинат	ВЕРХ	0,05 М амонію дигірофосфат: ацетонітрил (84:16); $\lambda = 228$ нм	0,05 – 25,0 мкг/мл	0,012 мкг/мл	[114]

РОЗДІЛ 2

РЕАКТИВИ ТА АПАРАТУРА

2.1. Вихідні сполуки та матеріали

Для приготування рухомих фаз, розчинів порівняння випробовуваних АФІ та змивів застосовували метанол, ацетонітрил (кваліфікації для ВЕРХ, MERCK), воду для хроматографії та бідистильовану. В роботі використовували реактиви кваліфікації не нижче ч.д.а.

Пластини TLC Silica gel 60 F254 фірми MERCK.

Мікрошприц HAMILTON 1702N місткістю 100 мкл (США).

Сваби Alpha® Sampling Swab марки TX715 (Techwipe).

Отримані розчини фільтрували через мембранний фільтр (0,20 мкм; Minisart RC 25, «Sartorius», Німеччина).

2.2. Апаратура та обладнання

Спектри люмінесценції та збудження реєстрували за допомогою спектрофлуориметра Cary Eclipse «Varian» (Австралія) з подвійними джерелами світла (ксенонова лампа 150-W суцільного спектра та імпульсна лампа). Всі вимірювання проводили при кімнатній температурі (21 – 23°C). Технічні характеристики Cary Eclipse "Varian": ширина імпульсу 2 мкс; оптика Шварцшильда; оптичний діапазон збудження: 200 – 900 нм; оптичний діапазон емісії: 200 – 900 нм; спектральна ширина щілин: 1,5; 2,5; 5; 10 та 20 нм; максимальна швидкість сканування: 24000 нм/хв.

Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі UV-2401 PC "Shimadzu" (Японія), спектральний діапазон вимірювань від 190 нм до 900 нм, точність: $\pm 0,003$ А (поглинання).

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі Agilent 1260 Infinity 2D LC System (США) з рефрактометричним детектором, УФ- та діодно-матричним детектором, а також мас-спектрометричним детектором (6530 Accurate Mass Q-TOF, Agilent Technologies, США, джерело іонізації – електроспрей (ESI)).

Кут обертання площини поляризації розчину при температурі

($20 \pm 0,5$) °C визначали на поляриметрі P8000 (Krüss, Німеччина).

У методі ВЕТШХ на лінію старту хроматографічної пластинки розчини наносили за допомогою напівавтоматичного аплікатора Linomat 5 (CAMAG, Швейцарія), хроматографічне розділення проводили у вертикальній камері (CAMAG, Швейцарія) та сканування здійснювали на хроматоденситометрі серії TLC SCANNER 4, фірми CAMAG, Швейцарія.

Вимірювання інтенсивності ліній калію (натрію) проводили на атомно-емісійному спектрометрі з індуктивно-зв'язаною плазмою (ICAP 7400 DUO; Thermo Fisher Scientific Inc, США).

Для побудови градувальних графіків використовували програму Origin 7.5; Microcal software (2009, OriginLab).

Значення рН розчинів вимірювали за допомогою рН-метра серії Seven Easy фірми Mettler Toledo, Китай (діапазон вимірювань рН від 0,00 до 14,00; відносна похибка вимірювань $\pm 0,01$ од. рН) зі скляним електродом, калібрування якого проводили за допомогою стандартних буферних розчинів.

Точні наважки речовин брали за допомогою аналітичних ваг AUX 220 (Shimadzu) ($220 \text{ г} \pm 0,005 \text{ г}$).

Очищену воду для хроматографії отримували з використанням системи очищення води Arium® pro UV/UF фірми Sartorius.

При пробопідготовці використовували магнітні мішалки типу ARE (VELP Scientifica, Італія) з підігрівом.

РОЗДІЛ 3

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОЧИЩЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ОБЛАДНАННЯ

3.1 Розробка підходів до встановлення критеріїв прийнятності для валідації аналітичної методики контролю якості очищення обладнання (теоретична частина)

Кількісні випробування

Критерії прийнятності невизначеності аналітичної методики

Валідація аналітичних методик контролю залишкових кількостей препарату на обладнанні після процесу очищення, так само як і валідація будь-якої іншої методики, ґрунтується на встановленні вимог до її невизначеності. Однак, якщо для методик контролю якості (МКЯ) лікарських препаратів (субстанцій та готових лікарських форм) питання валідації методик досить докладно обговорені у відповідній літературі [118, 119], то для МКЯ очищення фармообладнання подібна інформація вкрай мізерна.

Головною відмінністю контролю якості лікарських засобів від контролю якості очищення фармообладнання є те, що для аналізу ЛП номінальні значення вмісту та допуски вже наперед задані, що і дозволяє в кінцевому підсумку розробити стандартизовані підходи до валідації та встановити стандартні критерії прийнятності. Завдання контролю якості очищення фармообладнання зводиться до того, щоб виявити та кількісно визначити масу препарату на деякій одиниці поверхні обладнання. Основною вимогою до якості очищення є вимога того, щоб знайдене за допомогою даної методики кількість препарату не перевищувало деякого критичного значення *MASO*, яке в свою чергу залежить від багатьох параметрів (в тому числі від площі поверхні обладнання) та дуже сильно варіюється від препарату до препарату.

У цьому випадку завдання нагадує з одного боку випробування на однорідність вмісту діючої речовини в дозованій одиниці, а з іншого – контроль домішок. Відмінність від цих випробувань у тому, що в разі

визначення однорідності вмісту є можливість досліджувати досить велику кількість дозованих одиниць, а в разі контролю домішок завжди зазначений відсоток вмісту домішок від номінальної кількості АФІ. Однак, зі змісту поставленого завдання очевидно, що опорним пунктом для вироблення критеріїв повинна стати межа кількісного визначення методики (МКВ). При цьому найзручніше скористатися наступним прийомом.

Нехай проводиться вимірювання, при якому кожній концентрації аналіту x_i ставиться у відповідність відгук детектора (або аналітичний сигнал) y_i . При певному варіюванні концентрації аналіту ми отримуємо відповідне варіювання значень аналітичного сигналу. Далі приймається, що між величинами x та y існує деяка залежність. Оскільки в аналітичній практиці, як правило, використовується лінійне детектування, то відгук детектора налаштовується таким чином, щоб між величинами x та y зберігалася лінійна залежність:

$$y = \alpha + \beta \cdot x \quad 1$$

Наприклад, в разі спектрофотометричних вимірювань, при певних умовах, в розчинах виконується закон Бугера-Ламберта-Бера: оптична густина за даної довжини хвилі прямо пропорційна концентрації аналіту в розчині:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot C, \quad 2$$

де A_λ – оптична густина розчину, ε_λ та C – молярний коефіцієнт поглинання та концентрація аналіту.

Вираз (2) співпадає з виразом (1) за умови рівності нулю коефіцієнта $\alpha = 0$.

При вирішенні задачі про взаємозв'язок величин x та y зазвичай використовують регресійний аналіз [120]. У застосуванні до лінійної залежності висновки загальної теорії можна звести до наступного.

Існує *генеральна* математична модель (1) залежності величини y від x , що однозначно визначається генеральними параметрами α та β , оцінками яких є такі величини a та b , що звертають в мінімум суму квадратів відхилень

(метод найменших квадратів):

$$\sum_{i=1}^{i=n} [y_i - (a + b \cdot x_i)]^2 \rightarrow \min, \quad 3$$

при цьому лінійна функція $Y = a + b \cdot x$ (лінія регресії) є вибірковою оцінкою генеральної математичної моделі (1). Точність лінії регресії при цьому характеризується:

– залишковим стандартним відхиленням s_e :

$$s_e = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} [y_i - (a + b \cdot x_i)]^2}{n - 2}}, \quad 4$$

– стандартним відхиленням s_b для оцінки кутового коефіцієнта b :

$$s_b = \frac{s_e}{\sqrt{(n - 1) \cdot s_x^2}}, \quad 5$$

– стандартним відхиленням s_a для оцінки вільного члена a :

$$s_a = \frac{s_e}{\sqrt{n}} \sqrt{1 + \frac{n \cdot \bar{x}^2}{(n - 1) \cdot s_x^2}}, \quad 6$$

– довірчим інтервалом Δ_y аналітичного сигналу y_k , передбаченого лінією регресії, для цього значення $x = x_k$ вмісту аналіту:

$$\Delta_y = t(P, f) \cdot \frac{s_e}{\sqrt{n}} \cdot \sqrt{1 + \frac{n \cdot (x_k - \bar{x})^2}{(n - 1) \cdot s_x^2}}, \quad 7$$

– коефіцієнтом детермінації (або мірою визначеності) R^2 , показує яка частка варіації аналітичного сигналу пояснюється зміною вмісту аналіту при обраної генеральної моделі:

$$R^2 = 1 - \frac{(n - 2)}{(n - 1)} \cdot \frac{s_e^2}{s_y^2}, \quad 8$$

де

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \text{– стандартне відхилення для діапазону вмісту}$$

аналіту,

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (y_i - \bar{y})^2}{n-1}} \quad - \text{ стандартне відхилення для аналітичних}$$

сигналів,

$t(P, f)$ – двобічний квантиль розподілу Стюдента, для довірчої ймовірності P та ступенів свободи $f = n - 2$.

Межею кількісного визначення методики (МКВ, x_{LQD}), що розраховується з градуювального графіка, називають величину, яка є десятикратним відношенням стандартного відхилення оцінки вільного члена градуювальної залежності до її кутового коефіцієнта [118]:

$$x_{LQD} = \frac{10 \cdot s_a}{b}. \quad 9$$

З огляду на вираз (6), отримаємо:

$$x_{LQD} = \frac{10 \cdot s_e}{b \cdot \sqrt{n}} \cdot \sqrt{1 + \frac{n \cdot \bar{x}^2}{(n-1) \cdot s_x^2}}. \quad 10$$

Вміст аналіту x_k , дасть прогноз для значення аналітичного сигналу y_k , що лежить в інтервалі $y_k = a + b \cdot x_k \pm \Delta_y$, де Δ_y визначається формулою (7). Тоді, аналітичний сигнал y_k дасть прогноз для вмісту аналіту x_k з довірчим інтервалом Δ_x :

$$\Delta_x = \frac{\Delta_y}{b} = t(P, f) \cdot \frac{s_e}{b \cdot \sqrt{n}} \cdot \sqrt{1 + \frac{n \cdot (x_k - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2}}. \quad 11$$

Комбінація виразів (10) та (11) дає залежність невизначеності вмісту аналіту Δ_x від МКВ:

$$\Delta_x = t(P, f) \cdot \frac{x_{LQD}}{10} \cdot \sqrt{\frac{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_k - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot \bar{x}^2}}. \quad 12$$

Ми формулюємо вимоги до МКВ наступним чином [121]: *межа кількісного визначення є достатньою для аналізу за даною методикою та*

незначимо впливає на прийняття рішення про якість, якщо вона в свою чергу є незначною у порівнянні з граничним вмістом аналіту. Відповідно до принципу незначущості, для цього достатньо, щоб МКВ не перевищувала 32% граничного значення вмісту аналіту x_{crit} , тобто

$$\begin{aligned} \max(x_{LQD}) &= 0.32 \cdot x_{crit} \text{ або у відносних одиницях} \\ \max(X_{LQD})\% &= \frac{\max(x_{LQD})}{x_{crit}} \cdot 100\% = 32\% \end{aligned} \quad 13$$

Таким чином, з виразів (12) та (13), отримуємо остаточний вираз для відносної максимально допустимої невизначеності методики:

$$\max(\Delta_x)\% = 3.2 \cdot t(P, f) \cdot \sqrt{\frac{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_{crit} - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot \bar{x}^2}}. \quad 14$$

З отриманого виразу випливає, що $\max(\Delta_x)\%$ буде визначається тільки лише кількістю точок для побудови градуовальної залежності n , стандартним відхиленням для діапазону вмісту аналіту s_x , а також абсолютною різницею $|x_{crit} - \bar{x}|$ між граничним вмістом та центром діапазону вмісту аналіту. Якщо граничний вміст аналіту x_{crit} вибрати таким чином, щоб ця величина була в центрі діапазону визначення методики, то вираз для $\max(\Delta_x)\%$ дещо спрощується:

$$\max(\Delta_x)\% = 3.2 \cdot t(P, f) \cdot \sqrt{\frac{(n-1) \cdot s_x^2}{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot \bar{x}^2}}. \quad 15$$

Вимога до чутливості методу

Контроль якості очищення обладнання зводиться до того, щоб виявити та кількісно визначити масу препарату на певній одиниці поверхні обладнання. Для визначення залишкових кількостей АФІ після очищення обладнання необхідні методи, що характеризуються високою чутливістю та селективністю по відношенню до аналіту та домішкам – продуктам деградації, що виникають в технологічному процесі та при відмиванні. Розробка методики контролю якості очищення повинна включати,

насамперед, *вибір методу аналізу*, чутливість якого дозволяє достовірно вести кількісне визначення аналіту в зразку змиву при вмісті, що не перевищує гранично допустиму концентрацію (ГДК). Це безпосередньо пов'язано з умовою до якості очищення – вимогою того, щоб знайдене за допомогою даного методу кількість препарату не перевищувала значення *МАСО*.

Методика контролю очищення повинна дозволити кількісно визначати мінімальну концентрацію аналіту (x_{min}). Необхідно відзначити, що така величина не є межею виявлення методики (МВ), по суті це – найменша точка діапазону для побудови градуовального графіка залежності сигналу детектора від концентрації аналіту. Для вирішення питання про прийнятність величини x_{min} , необхідно провести порівняння x_{min} з критичною концентрацією аналіту (x_{crit}), яка встановлюється відповідно до *МАСО* на змив з контрольованої поверхні. Необхідне рішення про придатність запропонованої методики аналізу для вирішення поставленого завдання. Для цього повинен бути встановлений критерій прийнятності співвідношення цих величин. Недостатньо прийняти, що x_{min} має бути менше x_{crit} , необхідно встановити кількісну характеристику співвідношення цих двох величин, що незначимо впливає на прийняття рішення про якість.

Використовуючи співвідношення між *МВ* та *МКВ* ($МВ = 0,33 \cdot МКВ$), з умови (13) можна записати умову для *МВ* (x_{LD}):

$$x_{LD} \leq 0.11 \cdot x_{crit} \quad . \quad 16$$

Якщо в свою чергу для x_{min} поставити умову

$$x_{min} \leq \max(x_{LD}) \approx 0.1 \cdot x_{crit} \quad , \quad 17$$

то отримаємо вимогу до мінімальної точки діапазону концентрацій аналіту:

$$\frac{x_{min}}{x_{crit}} \cdot 100 \% = X_{min} (\%) \leq 10 \% \quad 18$$

Умова (18) є критерієм прийнятності методу, використовуваного для

контролю якості очищення обладнання, який дозволяє проводити кількісне визначення залишку забруднення поверхні, якщо його чутливість становить не більше 10 % від ГДК.

Для подальшого вибору критеріїв прийнятності зручно зробити перенормування координати x таким чином, що нормований вміст аналіту приймається за 100% та знаходиться в центрі діапазону. Для методик кількісного визначення мінімально достатнім є використання $n = 9$ точок, розподілених рівномірно з кроком d , для методик контролю супровідних домішок ДФУ допускає достатнім 5 концентрацій [118]. Звертається увага на те, що це достатньо для розрахунку МКВ, однак для розрахунку характеристик правильності та точності доцільно проводити дослідження на 9 концентраціях. У будь-якому випадку, виходячи з логіки побудови розрахунку величини $\max(\Delta_x)$ %, діапазон досліджуваних концентрацій необхідно вибрати таким чином, щоб його нижня межа була менше МКВ. Однак вибір діапазону може залежати також від інших завдань у поєднанні з практичною зручністю приготування розчинів. Дуже часто є необхідність дослідити область концентрацій поблизу МВ методу. З огляду на умову (18) доцільно вибрати нижню межу діапазону близько 10 % від номінальної кількості вмісту аналіту. При цьому можливо використовувати діапазони як з рівним кроком, так і з нерівномірною зміною концентрації аналіту. Нами було досліджено п'ять випадків діапазонів концентрацій з рівномірним кроком для побудови градууювального графіка: $n = 5, 7, 9, 11$ та 13 . У таблиці 3.1 представлені результати розрахунку стандартного відхилення для кожного з таких діапазонів та відповідної граничної невизначеності результату вимірювання.

Таким чином, повна невизначеність результату визначення залишку препарату на поверхні фармообладнання (Δ_x), у відсотках, виражена як двобічний відносний інтервал для рівня довірчої ймовірності 95 %, не повинна перевищувати вказані значення для заданих діапазонів застосування методики.

Таблиця 3.1

Рекомендовані діапазони концентрацій для побудови градуовального графіка методик очищення обладнання з рівномірним кроком та відповідні значення граничної невизначеності

кількість точок, n	крок, $d, \%$	Діапазон концентрацій аналіту відносно ГДК, %	$s_x, \%$	$\max(\Delta_x), \%$
5	45	10; 55; 100; 145; 190	71,15	5,5
7	30	10; 40; 70; 100; 130; 160; 190	64,81	4,2
9	22.5	10; 32.5; 55; 77.5; 100; 122.5; 145; 167.5 190	61,62	3,8
11	18	10; 28; 46; 64; 82; 100; 118; 136; 154; 172; 190	59,70	3,6
13	15	10; 25; 40; 55; 70; 85; 100; 115; 130; 145; 160; 175; 190	58,42	3,4

Вимоги до валідаційних характеристик

Нормалізовані координати

Для стандартизації критеріїв прийнятності в аналізі систематичних складових похибки вимірювання виникає необхідність нормалізації обох координат. Для проведення такої процедури перенормування ми розглянули два підходи: *зовнішню та внутрішню нормалізацію*.

Зовнішня нормалізація передбачає, що одна точка вимірювання приймається за стандарт (x_{st}, y_{st}) та відносно неї здійснюється відлік усіх інших точок. Нормалізовані таким способом координати матимуть вигляд:

$$X_i = \frac{x_i}{x_{st}} \cdot 100 \%, \text{ та } Y_i = \frac{y_i}{y_{st}} \cdot 100 \%. \quad 19$$

Однак, приписавши випадковим величинам фіксовані значення, ми тим самим жертвуємо кількістю ступенів свободи, зменшивши її на одиницю (тобто в цьому випадку ми зобов'язані проводити всі розрахунки для ступенів свободи $f = n - 3$), або збільшити кількість експериментів на одиницю, з тим, що б зберегти кількість ступенів свободи $f = n - 2$, але виключивши при цьому одну точку вимірювання з розрахунків. Слід зазначити, що такий підхід привабливий тим, що діапазон вмісту аналіту наочно показує зміну

концентрацій щодо номіналу.

Внутрішня нормалізація заснована на тому, що оцінки параметрів лінійної регресії, розраховані за методом найменших квадратів (3), мають таку властивість, що сума всіх залишків регресії звертається в нуль [122]:

$$\sum_{i=1}^{i=n} [y_i - (a + b \cdot x_i)] = 0. \quad 20$$

З цього слідує взаємозв'язок між середніми значеннями координат:

$$\bar{y} = a + b \cdot \bar{x}. \quad 21$$

Співвідношення (21) дозволяє зробити *внутрішнє перенормування* координат щодо середніх, що дозволяє зберегти при цьому кількість ступенів свободи $f = n - 2$. При цьому нормалізовані координати визначаються наступним чином:

$$X_i = \frac{x_i}{\bar{x}} \cdot 100\%, \text{ та } Y_i = \frac{y_i}{\bar{y}} \cdot 100\%. \quad 22$$

У цьому випадку, однак, виникає необхідність «відстежити» номінал та втрачається згадана вище наочність, яка насправді виявляється у вигляді цілочисленій кратності зміни концентрації аналіту. Тим не менше, використання внутрішньої нормалізації представляється нам найбільш обґрунтованим, оскільки дозволяє використовувати увесь масив даних експерименту та не порушує при цьому послідовність побудови висновків теорії.

Не важко помітити, що гранично допустима невизначеність методики, розрахована за формулами (14, 15) залишається незмінною, як при зовнішній, так і при внутрішній нормалізації.

Лінійність

Для перевірки лінійності градувальних графік будують в нормалізованих координатах, параметри регресії обчислюють методом найменших квадратів (МНК):

$$Y_i = a + b \cdot X_i,$$

де: a – вільний член лінійної регресії (відрізок, що відсікається на осі

ординат);

b – кутовий коефіцієнт лінійної регресії (тангенс кута нахилу прямої до осі абсцис).

Вимоги до вільного члена

Критерій статистичної незначущості. Вільний член α у рівнянні (1) генеральної лінійної залежності є адитивною складовою систематичної похибки та може бути завжди виключений простим перенормуванням (налаштування детектора). Однак його оцінка a може бути відмінна від нуля (як правило, так і буває в багатьох випадках). Важливо при цьому: значимо або незначимо оцінка вільного члена відрізняється від нуля. У статистичній

теорії регресивного аналізу доводиться, що величина $\frac{|a - \alpha|}{s_a}$ слідує

розподілу Стюдента з $n - 2$ ступенями свободи. Оскільки завжди можна домогтися того, щоб $\alpha = 0$, то умова *статистичної незначущості* вільного члена буде виконуватися, якщо значення його оцінки a не перевищить свого довірчого інтервалу (Δ_a):

$$|a| \leq \Delta_a = t(95\%, f = n - 2) \cdot S_a, \quad 23$$

де: S_a – стандартне відхилення вільного члена регресії;

t – двобічний квантиль Стюдента для довірчої ймовірності 95% та числа ступенів свободи $f = n - 2$.

Критерій практичної значущості. Якщо критерій (23) не виконується, використовують критерій практичної незначущості для вільного члена. Стандартне відхилення вільного члена пов'язано з МКВ методики виразом (9). Оскільки в нормалізованих координатах кутовий коефіцієнт b має значення близьке до одиниці, а також, з огляду на вимогу, що МКВ не повинна перевищувати 32 %, до вільного члена пред'являють таку вимогу практичної незначущості:

$$|a| \leq \max(\Delta_a \%) = 3.2 \cdot t(95\%, f = n - 2), \quad 24$$

де: 3,2 – максимальне значення стандартного відхилення вільного члена

лінійної регресії (%);

t – односторонній квантиль Стюдента для довірчої ймовірності 95 % та числа ступенів свободи $f = n - 2$.

Невиконання умови (23) означає, що з ймовірністю 95 % є підстави вважати відмінною від нуля адитивну складову систематичної похибки результату вимірювання аналітичного сигналу. Умова (24) означає, що наявність такої похибки незначимо впливає на прийняття рішення про результат вимірювання для даного діапазону концентрацій.

Вимоги до кутового коефіцієнта

Кутовий коефіцієнт лінійної регресії є фактором відгуку детектора. Для нормалізованих координат його генеральне (теоретичне) значення дорівнює одиниці. Відхилення від одиниці його оцінки b , отриманої з даних вибірки по МНК, характеризує мультиплікативну складову систематичної похибки вимірювання. Умова статистичної незначущості відхилення кутового коефіцієнта від одиниці буде виконуватися, якщо його абсолютне відхилення від одиниці не перевершить його довірчий інтервал (Δ_b):

$$|1 - b| \leq \Delta_b = t(95\%, f = n - 2) \cdot S_b, \quad 25$$

де: S_b – стандартне відхилення кутового коефіцієнта;

t – двобічний квантиль Стюдента для довірчої ймовірності 95 % та числа ступенів свободи $f = n - 2$.

Вимоги до залишкового стандартного відхилення

Довірчий інтервал для передбачення вмісту аналіту Δ_x визначається формулою (11). Якщо прийняти, що для нього в точці $x_k = x_{crit}$ виконується умова:

$$\Delta_x = t(P, f) \cdot \frac{s_e}{b \cdot \sqrt{n}} \cdot \sqrt{1 + \frac{n \cdot (x_{crit} - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2}} \leq \max(\Delta_x),$$

то отримуємо умову для залишкової дисперсії:

$$s_e^2 \leq \left(\frac{b \cdot s_x \cdot \max(\Delta_x)}{t(P, f)} \right)^2 \cdot \frac{n \cdot (n-1)}{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_{crit} - \bar{x})^2}. \quad 26$$

де: s_e – залишкове стандартне відхилення лінійної регресії.

Якщо умова (25) для кутового коефіцієнта виконується, то в нормалізованій системі координат значення кутового коефіцієнта b близьке до одиниці та можна прийняти, що $s_e/b \approx s_e$. Тоді, залишкове стандартне відхилення точок від лінії регресії може вважатися прийнятним, якщо для нього дотримуються наступні вимоги:

$$s_e \leq \frac{s_x \cdot \max(\Delta_x)}{t(P, f)} \cdot \sqrt{\frac{n \cdot (n-1)}{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_{crit} - \bar{x})^2}}. \quad 27$$

Якщо при побудові градууювального графіка гранична концентрація знаходиться в центрі діапазону, тобто $x_{crit} = \bar{x}$, то вираз для максимального s_e спрощується:

$$s_e \leq \frac{\max(\Delta_x)}{t(P, f)} \cdot \sqrt{n}. \quad 28$$

Вимоги до коефіцієнта кореляції

Квадрат коефіцієнта лінійної кореляції (тобто міра визначеності) показує, яка частка варіації відгуку аналітичного сигналу пояснюється варіацією фактора (в даному випадку кількістю речовини) при заданій математичній моделі залежності (в нашому випадку лінійної). Саме та частка варіації, яка лінійною моделлю не пояснюється, буде робити внесок до похибки вимірювання. Звідси простежується зв'язок між характеристикою апроксимації (тобто коефіцієнтом кореляції або мірою визначеності) та невизначеністю результатів вимірювання. Коефіцієнт лінійної кореляції r між двома величинами x та y визначається формулою:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{(n-1) \cdot s_x \cdot s_y} = b \cdot \frac{s_x}{s_y}, \quad 29$$

де b – оцінка параметра кутового коефіцієнта, визначена методом найменших квадратів. У разі лінійної регресійної моделі квадрат коефіцієнта кореляції

тотожно дорівнює мірі визначеності або коефіцієнта детермінації (8) [123]:

$$r^2 \equiv R^2 = 1 - \frac{(n-2)}{(n-1)} \cdot \frac{s_e^2}{s_y^2}. \quad 30$$

Максимально допустиме значення для залишкової дисперсії s_e^2 визначається виразом (26). Встановимо тепер нижню межу для вибіркової дисперсії аналітичного сигналу s_y^2 . За визначенням коефіцієнта кореляції (29):

$$r^2 = b^2 \cdot \frac{s_x^2}{s_y^2} \leq 1,$$

звідки слідує умова для нижньої межі s_y^2 :

$$s_y^2 \geq b^2 \cdot s_x^2. \quad 31$$

Комбінуючи вирази (26), (30) та (31), отримаємо умову для мінімально допустимого значення коефіцієнта кореляції градуовального графіка для діапазону, в якому валідуються методика:

$$r \geq r_{min} = \sqrt{1 - \frac{n \cdot (n-2) \cdot \max(\Delta_x)^2}{t^2(P, f) \cdot ((n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_{crit} - \bar{x})^2)}}. \quad 32$$

У разі діапазонів концентрацій, для яких номінальна концентрація співпадає з центром діапазону, формула для розрахунку граничного коефіцієнта кореляції спрощується:

$$r_{min} = \sqrt{1 - \frac{n \cdot (n-2)}{(n-1)} \cdot \left(\frac{\max(\Delta_x)}{t(P, f) \cdot s_x} \right)^2}, \quad 33$$

де: n – кількість точок для побудови градуовального графіка;

s_x – стандартне відхилення діапазону застосування методики, що валідуються;

$t(P, f)$ – двобічний квантиль Стюдента для довірчої ймовірності $P = 95\%$ та числа ступенів свободи $f = n - 2$.

Градуовальний графік визнається задовільним для визначення залишкової кількості препарату на поверхні обладнання, якщо коефіцієнт кореляції регресійної лінії не менше граничного значення, розрахованого за

формулою (32). Критичні точки коефіцієнта кореляції для рекомендованих діапазонів застосування методики наведені в таблиці 3.2.

Правильність та прецизійність

Правильність методики аналізу зазвичай підтверджується методом «введено-знайдено» шляхом доказу практичної незначущості систематичної складової невизначеності (Δ_R), тобто відхилення результату вимірювання від свого математичного очікування (100 %). У разі методик контролю якості очищення обладнання величина, отримана методом «введено-знайдено», є ступінь вилучення речовини (k) з модельної поверхні, яка допускає варіювання в широких межах (від 50 % до 100 %) та являє собою характеристику методики в частині пробопідготовки. Систематична похибка ступеня вилучення може бути визнана практично незначною, якщо виконується умова незначущості цієї систематичної складової в порівнянні з максимально допустимою невизначеністю аналізу:

$$\Delta_R \% = |100 - k| \leq 0.32 \cdot \max(\Delta_x). \quad 34$$

Якщо вимога (34) практичної незначущості відхилення ступеня вилучення виконується, то врахування величини k в кінцевій аналітичній операції не потрібно. В іншому випадку, при розрахунку результату необхідно враховувати ступінь вилучення речовини з поверхні. Максимально допустимі значення відхилення ступеня вилучення від 100 % ($\max(\Delta_R)$) наведені в таблиці 3.2.

Для підтвердження прецизійності методики контролю якості очищення обладнання досить показати, що відносний однобічний довірчий інтервал для середнього значення ступеня вилучення (Δ_k) з модельної поверхні, отриманий з m випробувань в діапазоні застосування методики, що валідується, не перевищує граничну невизначеність методики на рівні значущості 5 %. Тобто методика визнається прецизійною, якщо виконується вимога:

$$\Delta_k = t(95\%, m-1) \cdot \frac{S_k}{\sqrt{m}} \leq \max(\Delta_x), \quad 35$$

де: S_k – стандартне відхилення, розраховане для ступеня вилучення;

$t(95\%, m-1)$ – однобічний квантиль Стюдента для довірчої ймовірності $P = 95\%$ та числа ступенів свободи $f = m - 1$.

Таблиця 3.2

Результати розрахунку максимально допустимої невизначеності результату визначення та критичних значень для параметрів лінійності, прецизійності та правильності для зазначених діапазонів застосування методики та кількості точок градуювального графіка

кількість точок, n	крок діапазону $d\%$ $X_{min} = 10\%$	$\max(\Delta_x),$ %	$\max(\Delta_R),$ %	$\max(S_e),$ %	r_{min}	$\max a ,$ %
5	45	5,5	1,75	3,84	0,99891	7,53
7	30	4,2	1,35	4,36	0,99812	6,45
9	22,5	3,8	1,22	4,82	0,99732	6,06
11	18	3,6	1,15	5,25	0,99651	5,87
13	15	3,4	1,10	5,65	0,99571	5,75

Відтворюваність

Відтворюваність методики контролю якості очищення обладнання підтверджується при визначенні ступеня вилучення (k) з модельної поверхні в умовах вивчення правильності та прецизійності. Для цього проводять порівняння результатів визначення, отриманих в різні дні одним аналітиком, на одному приладі (внутрішньолабораторна відтворюваність). Всі результати повинні належати однієї й тієї ж генеральній сукупності. Перевірку рекомендується проводити методом дисперсійного аналізу [124]. Отримане значення F -критерію для m випробувань протягом g днів не повинно перевищувати табличного значення для довірчої ймовірності 95% та $g - 1$ ступенів свободи чисельника та $m \cdot (g - 1)$ ступенів свободи знаменника.

Межа виявлення (МВ) та межа кількісного визначення (МКВ)

МВ и МКВ можуть бути розраховані при вивченні лінійності зі

стандартного відхилення вільного члена та кутового коефіцієнта:

$$MB = \frac{10 \cdot S_a}{3 \cdot b}, \quad MKB = \frac{10 \cdot S_a}{b}$$

Межа кількісного визначення є достатньою для аналізу за даною методикою та незначимо впливає на прийняття рішення про якість, якщо вона в свою чергу є незначною у порівнянні з граничним вмістом аналіту. Відповідно до принципу незначущості для цього достатньо, щоб відносне значення МКВ не перевищувало 32 %:

$$MKB \leq \max(MKB) = 32 \% \quad 36$$

Критерії прийнятності придатності системи по збіжності результатів повторних інжекцій для хроматографічних методик

Для перевірки збіжності паралельних інжекції ДФУ [118] рекомендує розраховувати *відносне стандартне відхилення* – RSD паралельних вимірювань та порівнювати їх з максимальним RSD_{max} . Розрахунок максимального RSD заснований при цьому на статистиці розподілу Стьюдента. При практичному використанні такого критерію це не завжди є зручним. Дійсно, при оперативному контролі простіше та швидше розрахувати розмах між паралельними вимірами, ніж обчислити стандартне відхилення. Для вивчення збіжності при невеликій кількості вимірів зручними є критерії, засновані на порядкових статистиках [125]. Одним з таких критеріїв є *критерій стьюдентизованого розмаху*. Статистика критерію визначається відношенням розмаху випробуваної вибірки до контрольного стандартного відхилення [126]. В якості контролю в нашому випадку виступає максимальне нормалізоване залишкове стандартне відхилення (26). Якщо виконується умова (23) незначущості вільного члена регресії, то цілком допустимо застосування методу зовнішнього стандарту при виконанні інших вимог до лінійності. У цьому випадку в якості стандарту повинна бути обрана концентрація аналіту, відповідна номінального значення ($x_{st} \approx x_{crit}$). Нехай далі з m паралельних вимірювань

(інжекції) отримані y_i значень аналітичних сигналів (площ піків на хроматограмі) для номінальної концентрації аналіту. Тоді вимога придатності системи по збіжності результатів повторних інжекції зводиться до встановлення максимально допустимого розмаху W_{max} нормалізованих значень аналітичних сигналів (площ піків), отриманих з m паралельних вимірювань (інжекції). Використовуючи статистику стьюдентизованого розмаху, отримаємо умову для збіжності результатів паралельних інжекцій:

$$W = \frac{y_{max} - y_{min}}{\bar{y}} \cdot 100 \% \leq W_{max} = q(P, m, f) \cdot \max(S_e), \quad 37$$

де: y_{max} , y_{min} – відповідно максимальне та мінімальне значення аналітичного сигналу, отримані з m паралельних вимірювань;

\bar{y} – середнє значення аналітичного сигналу, отримане з m паралельних вимірювань;

$\max(S_e)$ – максимально допустиме відносне стандартне відхилення градувального графіка, розраховане за формулою (26).

$q(P, m, f)$ – квантиль розподілу стьюдентизованого розмаху для довірчої ймовірності P , числа паралельних вимірювань m та числа ступенів свободи для залишкового стандартного відхилення $f = n - 2$.

При виборі довірчої ймовірності P в аналітичній хімії прийнятний рівень значущості $\alpha = 5 \%$. Але в даному випадку мова йде не про подання результату аналізу, а про прийняття рішення: визнати або не визнати деяку вибірку об'ємом m такою, що дозволила б представити результат аналізу з необхідною для аналітичної хімії достовірністю. Суть проблеми полягає в тому, що всі розглянуті варіанти відносяться до малочисельних вибірок, а зі зменшенням обсягу експериментальних даних зростає ймовірність того, що дослідник, зробивши висновок про належність даної вибірки до деякої генеральної сукупності, зробить при цьому статистичну *похибку першого роду*. Така ймовірність при дослідженні малих вибірок повинна бути врахована, а не задана як апіорна. У зв'язку з цим, нами розглянуто питання

про обґрунтування вибору рівня значущості для критерію прийняття статистичної гіпотези про однорідність вибірки.

При вирішенні цього завдання ми виходили з того очевидного факту, що критичними значеннями будуть екстремальні результати вимірювань, тобто мінімальні та максимальні відліки. Цілком природньо при цьому уявити вибірку у вигляді *варіаційного ряду*, тобто розташувати відліки по зростанню, інакше кажучи, перейти до *порядкової статистики*. Критичні межі такого ряду, тобто допустимі значення екстремальних значень відліків, ми будемо називати *межами цензурування*. Слід відразу зазначити, що такий підхід багато в чому визначає вибір критерію, який може бути заснований саме на порядкових статистиках. Обраний нами критерій стьюдентизованого розмаху є одним з таких критеріїв.

Виходячи з поставленого завдання, слідує, що межі цензурування вибірки повинні залежати від її обсягу та, призначаючи ту чи іншу межу, необхідно оцінити рівень значущості $\alpha = 100 - P$, тобто ймовірність відсікти якусь частину відліків, що належать до оброблюваної вибірки. Цей рівень значущості може бути обраний на підставі наступних міркувань. Кількість m експериментальних відліків розбивають область визначення на $m + 1$ інтервалів та між крайніми членами варіаційного ряду укладено $m - 1$ інтервалів. Якщо призначити межі цензурування так, щоб відстань між ними співпадала з відстанню між крайніми точками, то найменша похибка у визначенні координати центру розподілу буде призводити до того, що одна з крайніх точок буде надаватися за межею цензурування, тобто призначення

меж з довірчою ймовірністю $P = \frac{m-1}{m+1} \cdot 100 \%$ забезпечить завжди відсікання

якоїсь однієї точки вибірки (зліва чи справа). Якщо ж поставити умову, що межі цензурування повинні в середньому відсікати менше однієї точки вибірки, то в цьому випадку ймовірність такої події буде дорівнювати

$P = \frac{m}{m+1} \cdot 100 \%$ та шуканий рівень значущості буде дорівнювати [127]:

$$\alpha = 100 - P = \frac{1}{m+1} \cdot 100\% . \quad 38$$

Використовуючи критичні точки стьюдентизованого розмаху, нами розраховані максимально допустимі значення відносного розмаху аналітичних сигналів (площ піків), отриманих з m паралельних вимірювань для рівнів значущості з урахуванням обсягу вибірки. Результати наведені в таблиці 3.3.

Таким чином, хроматографічна система може вважатися придатною для аналізу, якщо відносний розмах результатів вимірювань аналітичних сигналів, отриманий з m паралельних вимірювань, не перевищить своїх критичних значень (таблиця 3.3).

Таблиця 3.3

Критичні точки відносного розмаху W аналітичних сигналів (площ піків) для перевірки придатності хроматографічної системи по збіжності паралельних інжекцій

n	$\max(\Delta_x),$ %	f	$\max(S_e),$ %	число паралельних інжекцій m				
				2	3	4	5	6
				рівень значущості $\alpha, \%$				
				33,33	25,00	20,00	16,67	14,29
				гранично допустимий відносний розмах, $W_{\max} \%$				
5	5,5	3	3,84	6,25	11,08	14,73	17,78	20,46
7	4,2	5	4,36	6,59	11,33	14,641	17,25	19,45
9	3,8	7	4,82	7,08	12,02	15,34	17,901	20,00
11	3,6	9	5,25	7,59	12,78	16,21	18,80	20,90
13	3,4	11	5,65	8,08	13,55	17,11	19,77	21,91

Граничні випробування

Критерії прийнятності невизначеності аналітичної методики в разі граничних випробувань

Граничні випробування означають в цьому випадку, що результатом контролю якості за допомогою запропонованої аналітичної методики є висновок про те, перевершує або не перевищує знайдений за допомогою даної методики вміст аналіту деякий критичний рівень, тобто в аспекті розглянутої проблеми *результатом аналізу* буде:

$$x < x_{crit} \text{ або } x > x_{crit}, \quad 39$$

без істотного уточнення кількісного вмісту аналіту.

Методологія побудови вирішення поставленого завдання при цьому повинна залишитися такою ж самою. Але в цьому випадку ми повинні були б виходити не з визначення умови для МКВ, а з такої ж умови для МВ. Тобто, *для того, що б межа виявлення була достатньою для виконання аналізу за даною методикою та незначно впливала на результат, вона повинна бути незначною в порівнянні з граничним вмістом аналіту.* Відповідно до, вже згаданим принципом незначущості, для цього необхідно та достатньо, щоб МВ не перевищувала 32% граничного значення вмісту аналіту x_{crit} , тобто

$$\max(x_{LD}) = 0.32 \cdot x_{crit} \quad 40$$

Оскільки між МВ та МКВ існує однозначна відповідність, а саме:

$$x_{LQD} = 3 \cdot x_{LD},$$

то, умова (40) для МВ еквівалентно такій умові для МКВ

$$\max(X_{LQD})\% = 3 \cdot 32\% = 96\%. \quad 41$$

Тоді легко отримати вираз для максимальної невизначеності методики в разі граничних випробувань:

$$\max(\Delta_x)\% = 9.6 \cdot t(P, f) \cdot \sqrt{\frac{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_{crit} - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot \bar{x}^2}} \quad 42$$

Єдиною істотною відмінністю розрахунків критеріїв для граничних випробувань від розрахунків для кількісних досліджень є те, що в разі граничних тестів слід використовувати *однобічний квантиль розподілу Стьюдента*.

3.2 Визначення допустимого рівня забруднення за методом «найгіршого випадку»

При розрахунку межі вмісту АФІ на обладнанні після виробництва та очищення використовували підхід, який заснований на принципі «найгіршого випадку» з активності та на допущенні перенесення певної частки першого АФІ у наступне з урахуванням добових доз [23]. Ця частка зменшується в залежності від т. з. фактора безпеки (допустимої частки попереднього АФІ від його терапевтичної дози в максимальній добовій дозі наступного), безрозмірної величини, який є фактором оцінки ризику. Його значення залежить від типу лікарських засобів, що виготовляються. Для препаратів перорального застосування (таблетки, капсули, саше і т. п.) зазвичай використовують значення від 0,1 % до 1,0 % (таблиця 3.4) [18]. Варіювання фактора безпеки залежить від чутливості аналітичного методу контролю. Якщо його максимально допустиме значення 1,0 % дає при розрахунку значення ГДК залишків препарату, що не перевищує значення МКВ методики в три рази, то такий метод аналізу повинен бути визнаний непридатним для контролю якості очищення обладнання. Навпаки, якщо чутливість методу дозволяє достовірно визначати низькі концентрації, то існує можливість вибрати значення фактора безпеки менш ніж 0,1 % та, таким чином, посилити вимоги до якості очищення. У даній роботі значення фактора безпеки для різних препаратів варіювалося від 0,004 % до 1,0 %, в залежності від чутливості методу, так щоб забезпечити виконання вимоги до МКВ – не більше 32 % від ГДК.

Фактори безпеки для різних дозованих форм

Фактор безпеки	Тип лікарського засобу
1/10 – 1/100	продукти для зовнішнього застосування
1/100 – 1/1000	пероральні препарати
1/1000 – 1/10000	ін'єкційні та очні препарати
1/10000 – 1/100000	дослідницькі препарати

Гранично допустима маса попереднього продукту в максимальній добовій дозі наступного, D (мг) складе:

$$D = \frac{TD \cdot SF}{100}, \quad 43$$

де: TD – терапевтична доза попереднього продукту, мг;

SF – фактор безпеки, %.

Теоретичне гранично допустиме значення залишків попереднього продукту на всьому обладнанні після очищення E_T (мг):

$$E_T = \frac{D \cdot N_1}{m_0 \cdot N_2} \cdot 10^3, \quad 44$$

де: N_1 – найменше завантаження таблетмаси наступного продукту, кг;

N_2 – максимальне число дозованих форм в добовій дозі наступного продукту, шт; m_0 – маса однієї дозованої форми наступного продукту, г.

З урахуванням того, що на всій площі S_2 , яка контактує з продуктом, має знаходитись E_T мг попереднього продукту, в пробі, взятої з ділянки обладнання з поверхнею пробовідбору площею S_1 , має знаходитись теоретично гранично допустима кількість маси залишків попереднього продукту в пробі (в змиві з площі S_1) – $MASO$ (мкг/сваб):

$$MASO = \frac{E_T \cdot S_1}{S_2} \cdot 10^3, \quad 45$$

Гранично допустима концентрація вмісту аналіту – ГДК (x_{crit}) – розраховується з урахуванням обсягу розчинника, використовуваного для вилучення АФІ зі свабу.

Приклад

Для встановлення критеріїв прийнятності валідації аналітичної методики контролю якості очищення обладнання та визначення допустимого рівня забруднення за методом «найгіршого випадку» розглянута методика визначення АФІ деквалінію хлориду (ДХ) в змивах методом ВЕРХ (див. п 4.2.2).

Розрахунок ГДК залишків попереднього препарату

Для фактичного розрахунку $MASO$ для ДХ був обраний наступний препарат з найбільшою максимальною добовою дозою, який виробляється на виробничій ділянці ТДВ «ІНТЕРХІМ» – а саме ТРАНКВІЛАР® ІС, таблетки по 0,5 г АФІ, максимальне число дозованих форм у добовій дозі якого становить $N_2 = 20$ шт, а найменше завантаження таблетмаси серії – $N_1 = 0,150$ кг, номінальна маса однієї таблетки $m_0 = 0,550$ г.

Терапевтична доза попереднього препарату, що містить ДХ, становить 6 таблеток згідно з інструкцією до застосування ЛП. Вміст АФІ ДХ в 1 таблетці – 0,25 мг, таким чином, терапевтична доза ДХ дорівнює 1,5 мг. Загальна площа робочого обладнання, яка контактує з продуктом, становить $S_2 = 8165$ см². При факторі безпеки $SF = 1$ %, гранично допустиме значення маси залишків деквалінію хлориду в змиві з площі $S_1 = 100$ см² складе $MASO = 2,5$ мкг/сваб. Оскільки з одного свабу вилучення аналіту проводять 5,0 мл розчинника, то гранично допустима концентрація (ГДК) вмісту аналіту складає $x_{crit} = 0,5$ мкг/мл.

Встановлення максимальної невизначеності методики

Для побудови градууювального графіка методики визначення залишків деквалінію хлориду обраний діапазон концентрацій стандартного розчину 10 %, 20 %, 30 %, 60 %, 70 %, 80 %, 100 % та 150 % від гранично допустимої концентрації вмісту аналіту – 0,5 мкг/мл.

Дані для розрахунку $max(\Delta_x)$:

– середнє значення діапазону $\bar{x} = 65,0$ %;

– стандартне відхилення для діапазону $S_x = 46,29$ %;

– двобічний квантиль розподілу Стюдента для довірчої ймовірності $P = 95\%$ та ступенів свободи $f = n - 2 = 6$, $t(P, f) = 2,4469$.

За формулою (14) отримаємо:

$$\max(\Delta_x)\% = 3,2 \cdot 2,4469 \cdot \sqrt{\frac{7 \cdot 46,29^2 + 8 \cdot (100 - 65)^2}{7 \cdot 46,29^2 + 8 \cdot 65^2}} = 5,6\%$$

Вимоги до лінійності градуовального графіка

Мінімально допустиме значення для коефіцієнта кореляції розраховували за формулою (32):

$$r_{min} = \sqrt{1 - \frac{8 \cdot 6 \cdot 5,6^2}{2,4469^2 \cdot (7 \cdot 46,29^2 + 8 \cdot (100 - 65)^2)}} = 0,99495.$$

Максимально допустиме залишкове стандартне відхилення, по формулі (27):

$$s_e \leq \frac{46,29 \cdot 5,6}{2,4469} \cdot \sqrt{\frac{8 \cdot 7}{7 \cdot 46,29^2 + 8 \cdot (100 - 65)^2}} = 5,02. \quad 27$$

Будували градуовальний графік, відкладаючи на осі абсцис значення концентрації деквалінію хлориду, у відсотках від ГДК, а по осі ординат – нормалізовані значення площ піків (рисунок 3.1).

МКВ методики, розрахована за формулою (9), склала 0,08 мкг/мл. Ця кількість складає 16 % від $x_{crit} = 0,5$ мкг/мл та не перевищує його максимального допуску – 0,16 мкг/мл, тобто 32 % від гранично допустимого вмісту аналіту, відповідно до принципу незначущості (13).

Результати за розрахунком критеріїв прийнятності лінійної залежності для методики визначення залишкових кількостей деквалінію хлориду в змивах після очищення обладнання наведені в таблиці 3.5. Як видно з представлених в таблиці даних, всі параметри лінійної залежності площ піків ДХ від концентрацій, побудованої у відносних координатах, витримують встановлені вимоги до валідаційних характеристик в умовах даної методики.

На підставі цього можна зробити висновок, що розроблена методика характеризується прийнятною лінійністю для заданого діапазону концентрації аналіту при заданій максимальній невизначеності.

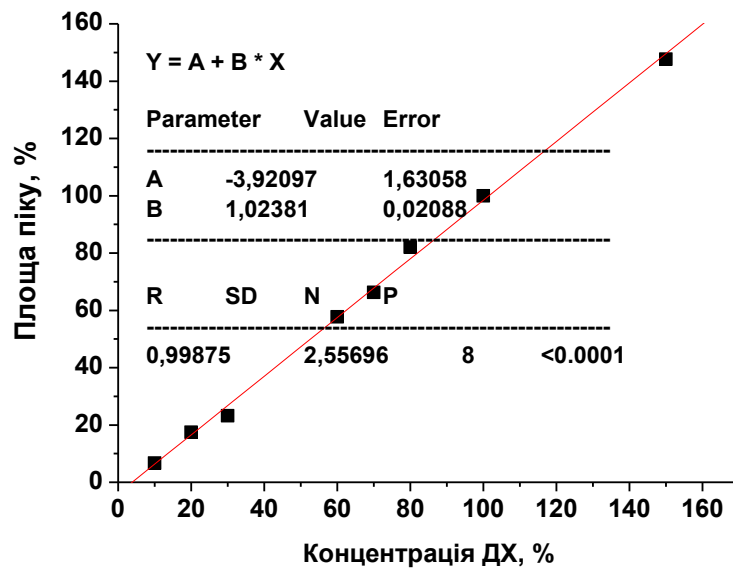


Рисунок 3.1. Градувальний графік залежності площі піку ДХ від концентрації в нормалізованих координатах

Таблиця 3.5

Критерії прийнятності параметрів градуованого графіка для визначення ДХ в нормалізованих координатах

Параметр лінійної залежності	Фактичне значення	Довірчий інтервал, Δt (95 %, 6) = 2.4469	Вимога	Висновок
коефіцієнт лінійної кореляції r	0,99876	—	не менше 0,99495	відповідає
кутовий коефіцієнт регресії b	1,0238	0,0511	$ 1 - b \leq \Delta_b$	відповідає
вільний член регресії a	- 3,92	3,99	$ a \leq \Delta_a$	відповідає
залишкове стандартне відхилення S_e	2,56	—	не більше 5,02	відповідає
МКВ	0,08 мкг/мл	—	не більше 0,16 мкг/мл (32 % від ГДК)	відповідає

Правильність, прецизійність та відтворюваність.

У модельних дослідах в ході валідації методу робили змиви свабом,

змоченим 96 % етиловим спиртом, з поверхні (100 см²), на яку штучно наносили 2,5 мкг АФІ ДХ, далі проводили вилучення 5,0 мл розчину для пробопідготовки (0,5 мкг/мл). Було встановлено, що ступінь вилучення деквалінію хлориду в кінцевий розчин становить близько 75 % (таблиця 3.6), тобто вимога (34) до правильності не виконується:

$$\left| 100 - \bar{k} \right| > 0.32 \cdot \max(\Delta_x) = 0.32 \cdot 5.6 \% = 1.8 \%$$

Таким чином, при розрахунку результату необхідно враховувати ступінь вилучення речовини.

Встановлено, що довірчий інтервал для ступеня вилучення не перевищує максимально допустиму невизначеність методики (5,6 %). Тобто, методика характеризується задовільною прецизійністю (умова (35)).

Таблиця 3.6

Ступінь вилучення (k , %) деквалінію хлориду з поверхні

	Номер змиву					\bar{k}	Δ_k
	1	2	3	4	5		
1-й день	74,7	80,7	74,7	79,3	68,5	75,6	5,4
2-й день	71,8	80,9	76,5	71,3	80,1	76,1	5,1

Перевірку відтворюваності проводили порівнянням результатів, отриманих за два дні методом дисперсійного аналізу (таблиця 3.7). Отримане значення F -критерію для 5 випробувань протягом 2 днів не перевищує табличного значення для довірчої ймовірності 95 %.

Таблиця 3.7

Перевірка відтворюваності дисперсійним аналізом

джерело варіації	df	S^2	F - фактичне	F - критичне
міжгрупова	1	0,729	0,034	5,318
залишкова	8	21,557		

З представлених результатів можна зробити висновок, що методика характеризується задовільною відтворюваністю.

3.3 Висновки до розділу 3

У результаті дослідження методами математичної статистики з урахуванням вимог GMP був розроблений підхід для визначення основної метрологічної характеристики аналітичних методик контролю якості очищення обладнання – максимально допустимої невизначеності результату вимірювання. Встановлено критерії для перевірки лінійності градуювальних залежностей, прецизійності та відтворюваності методик визначення залишків АФІ після очищення фармацевтичного обладнання.

РОЗДІЛ 4

МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ДЕЯКИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ ПІСЛЯ ОЧИЩЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ОБЛАДНАННЯ

Розроблені методики визначення залишкових кількостей деяких АФІ в змивах з фармацевтичного обладнання. Приготування випробовуваних розчинів, визначення ступеня вилучення та обробку результатів для розроблених методик проводили за наведеними уніфікованим прописами та формулами. Концентрацію аналіту визначали за градуювальним графіком.

Випробовуваний розчин. Аплікатор зі змивом з поверхні фармообладнання (площа змиву – 100 см²) поміщають у хімічну склянку місткістю 25 мл, додають 5,0 мл відповідного розчинника та проводять десорбцію протягом 10 хв. При необхідності розчин проби розбавляють до концентрації, яка знаходиться в інтервалі лінійності градуювального графіка.

Вміст аналіту (X), в мікрограмах в змиві, розраховують за формулою:

$$X = C \cdot V \cdot \frac{100}{k},$$

де: C – концентрація аналіту, отримана з градуювального графіка, в мкг/мл;

V – об'єм розчинника, який використовується для вилучення АФІ зі свабу;

k – ступінь вилучення.

Ступінь вилучення. У модельних дослідах в ході валідації методики робили змиви свабом, змоченим відповідним розчинником, з поверхні (100,0 см²), на яку штучно наносили розчини аналіту відомих концентрацій та висушували, далі проводили вилучення відповідним об'ємом розчинника протягом 10 хв (отримували розчини декількох концентрацій, які знаходяться в інтервалі лінійності градуювального графіка). Далі визначали вміст аналіту. Ступінь вилучення аналіту (k , %) розраховують за формулою:

$$k = \frac{\text{встановлена кількість речовини}}{\text{нанесена кількість речовини}} \cdot 100$$

Межу кількісного визначення АФІ розраховують за формулою (9):

$$MKB = \frac{10 \cdot s_a}{b},$$

де: s_a – стандартне відхилення вільного члена;

b – тангенс кута нахилу градуєвальної прямої.

Аналітичні характеристики розроблених методик (діапазон лінійності методики, МКВ, ГДК) наведені в таблиці 3.1 Д (додаток 3). Валідаційні характеристики та їх критерії прийнятності для методик визначення залишкових кількостей АФІ в змивах після очищення обладнання наведені в таблиці 3.2 Д (додаток 3), ступені вилучення аналітів (%) – в таблиці 3.3 Д (додаток 3).

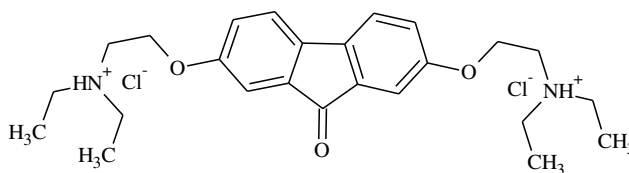
Показана можливість експресного внутрішньовиробничого контролю очищення фармацевтичного обладнання при виробництві лікарських препаратів.

4.1 Оптичні методи аналізу

4.1.1 Спектрофотометричне визначення тилорону, L-5-гідрокситриптофану, колагену, бензобіталу

Для визначення тилорону, L-5-гідрокситриптофану, колагену, бензобіталу в змивах після очищення технологічного обладнання розроблені нові спектрофотометричні методики. Методики засновані на вимірюванні інтенсивності світлопоглинання розчинів даних АФІ в залежності від їх концентрацій.

Тилорон (дигідрохлорид 2,7-біс-[2-(діетиламіно)етокси]флуорен-9-ону) є ефективним низькомолекулярним синтетичним індуктором інтерферону:



Градуєвальний графік

Розчин РСЗ тилорону. 0,0250 г РСЗ тилорону поміщають у мірну колбу

місткістю 25,0 мл, додають 15 мл води та розчиняють, доводять водою до позначки та перемішують.

1,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл та доводять водою до позначки (10 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 50 мл вносять по 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 5,0; 12,5 та 25,0 мл розчину РСЗ тилорону, доводять водою до позначки, отримують розчини з вмістом тилорону 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 2,5 та 5,0 мкг/мл, відповідно. Розчини перемішують та вимірюють оптичну густину приготованих робочих розчинів РСЗ тилорону за довжини хвилі 270 нм у кюветі з товщиною шару 1,0 см, використовуючи в якості розчину порівняння воду (рисунок 4.1, а). За отриманими результатами будують градувальний графік (рисунок 4.1, б), відкладаючи на осі абсцис значення концентрацій тилорону (мкг/мл), а по осі ординат – значення оптичної густини.

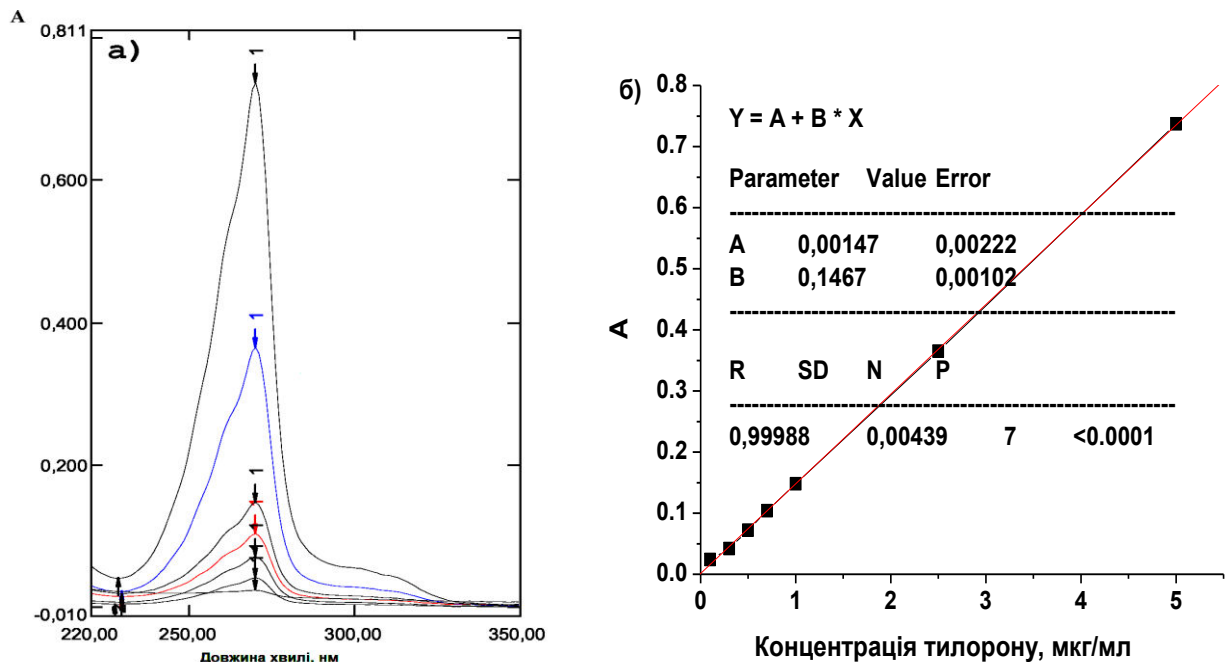
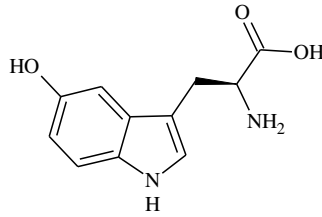


Рисунок 4.1. Спектри поглинання розчинів тилорону (а) та градувальний графік (б) для його визначення

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій тилорону 0,1 – 5,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

L-5-гідрокситриптофан (2-аміно-3-(5-гідрокси-1H-індол-3-іл) пропанова кислота) – амінокислота, що входить до складу білків, є

прекурсором нейротрансмитера серотоніну:



Градуювальний графік

Розчин L-5-гідрокситриптофану. 100 мг L-5-гідрокситриптофану (CAS 4350-09-8) поміщають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл води. Розчин перемішують на магнітній мішалці протягом 30 хв, отриманий розчин доводять водою до позначки та перемішують.

У мірні колби місткістю 100,0 мл поміщають по 0,1; 0,2; 0,4; 1,0; 1,2; 1,6; 1,8; 2,0; 2,4 мл розчину L-5-гідрокситриптофану, доводять до позначки водою та перемішують, отримуючи розчини з концентраціями 1,0; 2,0; 4,0; 10,0; 12,0; 16,0; 18,0; 20,0; 24,0 мкг/мл, відповідно.

Розчини використовують свіжоприготованими.

Компенсаційний розчин. Вода.

Вимірюють оптичну густину отриманих розчинів відносно компенсаційного розчину на спектрофотометрі у максимумі поглинання за довжини хвилі 275 нм у кюветі з товщиною поглинаючого шару 1,0 см (рисунок 4.2, а). За отриманими результатами будують градувальний графік (рисунок 4.2, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій L-5-гідрокситриптофану (мкг/мл), а по осі ординат – значення оптичної густини.

Градуювальний графік лінійний в інтервалі концентрацій L-5-гідрокситриптофану 1,0 – 24,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Колаген – є фібрилярним білком глікопротеїдної природи, що складається із макромолекул, які мають унікальну триспіральну структуру. Колагенові волокна заповнюють міжклітинний простір, виконують структурну функцію та функцію збереження вологи, відповідають за

пружність шкіри.

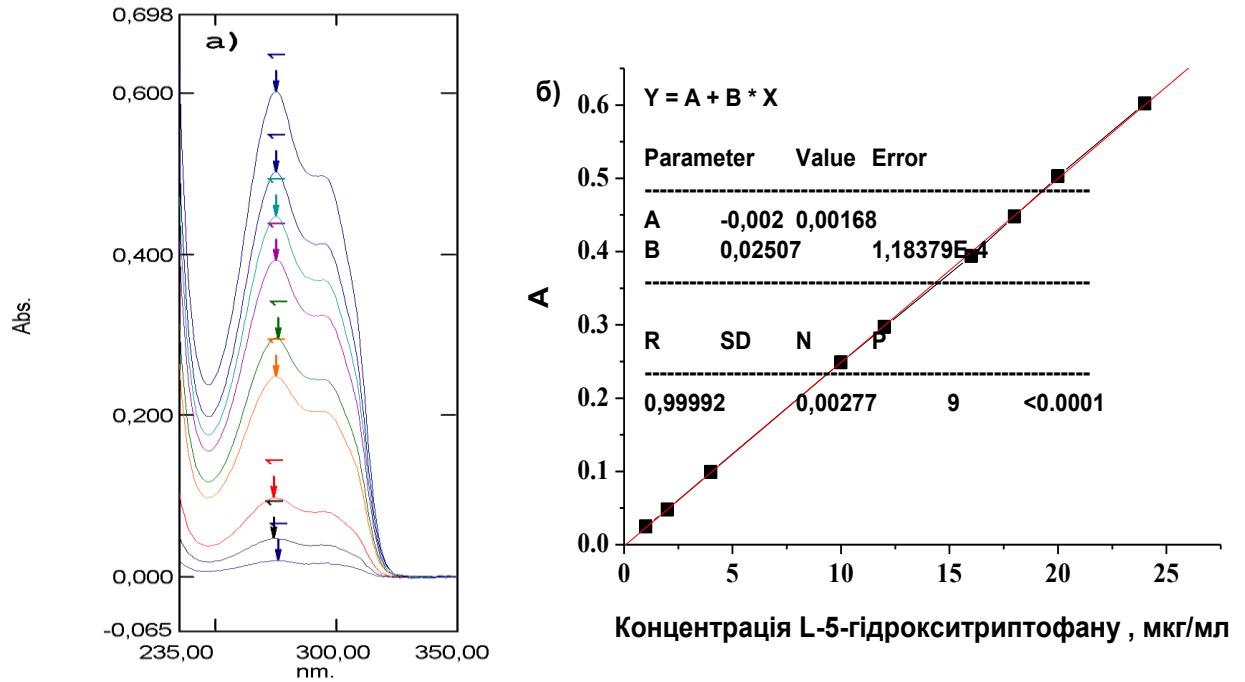


Рисунок 4.2. Спектри поглинання розчинів L-5-гідрокситриптофану (а) та градувальний графік (б) для його визначення

Визначення колагену запропановано проводити колориметричним методом Лоурі. У лужному середовищі іони Cu^{2+} утворюють комплекс з пептидними зв'язками, переходячи в Cu^+ . Одновалентні іони міді реагують з реактивом Фоліна (фосфомолібденова кислота з фенолом), утворюючи нестабільний продукт, що переходить у молібденову синь, з максимумом адсорбції при 750 нм. Збільшення адсорбції при 750 нм пропорційно концентрації білка. Метод дуже чутливий до наявності в розчині сторонніх відновлювачей. Встановлено, що компоненти плацебо не заважають визначенню білка.

Випробовуваний розчин. До 2,0 мл розчину, отриманого за уніфікованим прописом, додають 2,0 мл реактиву міді лужної [118] та перемішують. Залишають на 10 хв. Потім додають 1,5 мл фосфорно-молібденового реактиву розведеного [118], перемішують та залишають при кімнатній температурі на 30 хв.

Холостий розчин. До 4,0 мл води додають 4,0 мл реактиву міді лужної та перемішують. Залишають на 10 хв. Потім додають 3,0 мл фосфорно-

молібденового реактиву розведеного, перемішують та залишають при кімнатній температурі на 30 хв.

Розчини використовують свіжоприготованими.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину проби змивів з технологічного обладнання за довжини хвилі 750 нм у кюветі з товщиною шару 1,0 см, використовуючи холостий розчин у якості компенсаційного.

Градувальний графік

Вихідний розчин колагену. 100,0 мг колагену типу I (fish) або типу II (chicken) (відповідного даній серії дієтичної добавки) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл води. Розчин перемішують на магнітній мішалці протягом 10 хв. Доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

У мірні колби місткістю 50,0 мл поміщають по 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,5 мл вихідного розчину колагену, доводять об'єми розчинів водою до позначки та перемішують, отримуючи розчини з концентраціями 2,0; 4,0; 6,0; 10,0; 14,0; 18,0; 20,0; 22,0; 24,0; 30,0 мкг/мл, відповідно.

До 2,0 мл кожного із розчинів (градувальні розчини) додають 2,0 мл реактиву міді лужної та перемішують. Залишають на 10 хв. Потім додають 1,5 мл фосфорно-молібденового реактиву розведеного, перемішують та залишають при кімнатній температурі на 30 хв.

Розчини використовують свіжоприготованими.

Вимірюють оптичну густину отриманих розчинів за довжини хвилі 750 нм у кюветі з товщиною шару 1,0 см, використовуючи холостий розчин у якості компенсаційного (рисунок 4.3, а). За отриманими результатами будують градувальний графік (рисунок 4.3, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій колагену, в мкг/мл, а по осі ординат – значення оптичної густини.

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій колагену 2,0 – 30,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

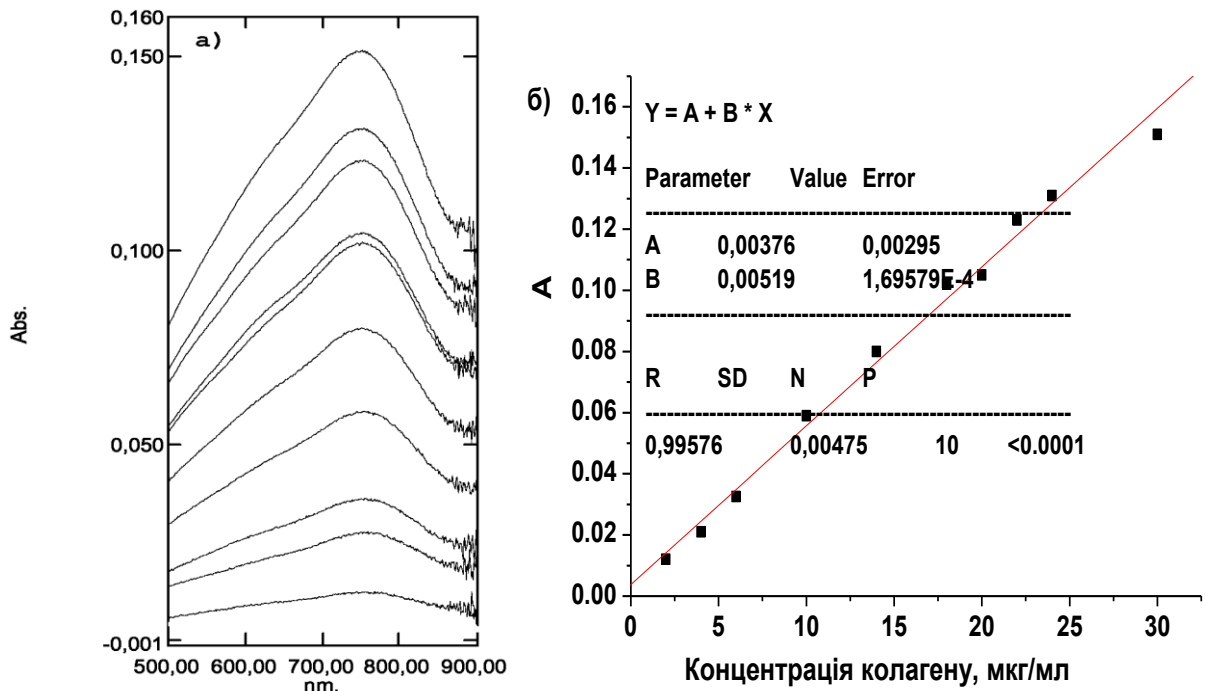
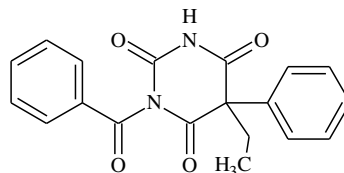


Рисунок 4.3. Спектри поглинання розчинів колагену (а) та градувальний графік (б) для його визначення

Бензобітал (1-бензоіл-5-етил-5-фенілбарбітурова кислота), проявляє протисудомну дію, практично не виявляє снодійної дії:



Градувальний графік

Розчин РСЗ бензобарбіталу. 0,050 г РСЗ бензобарбіталу поміщають в мірну колбу місткістю 50,0 мл, додають 30 мл етанолу (96 %) та розчиняють. Отриманий розчин доводять етанолом (96 %) до позначки та перемішують (1000,0 мкг/мл). 5,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл, доводять об'єм до позначки 0,01 М розчином хлористоводневої кислоти та перемішують (100,0 мкг/мл). 5,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл, доводять об'єм до позначки 0,01 М розчином хлористоводневої кислоти та перемішують (10,0 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 20,0 мл вносять по 0,2; 0,6; 1,0; 1,4 (із розчину

з концентрацією 10 мкг/мл); 0,2; 0,6; 1,0; 1,4 мл (із розчину з концентрацією 100 мкг/мл) отриманих розчинів бензобарбіталу та доводять 0,01 М хлористоводневою кислотою до позначки.

Розчини перемішують та вимірюють оптичну густина відносно розчину 0,01 М хлористоводневої кислоти за довжини хвилі 257 нм у кюветі з товщиною шару 5,0 см (рисунок 4.4, а).

За отриманими результатами будують градувальний графік (рисунок 4.4, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій бензобарбіталу, в мкг/мл, а по осі ординат – значення оптичної густини

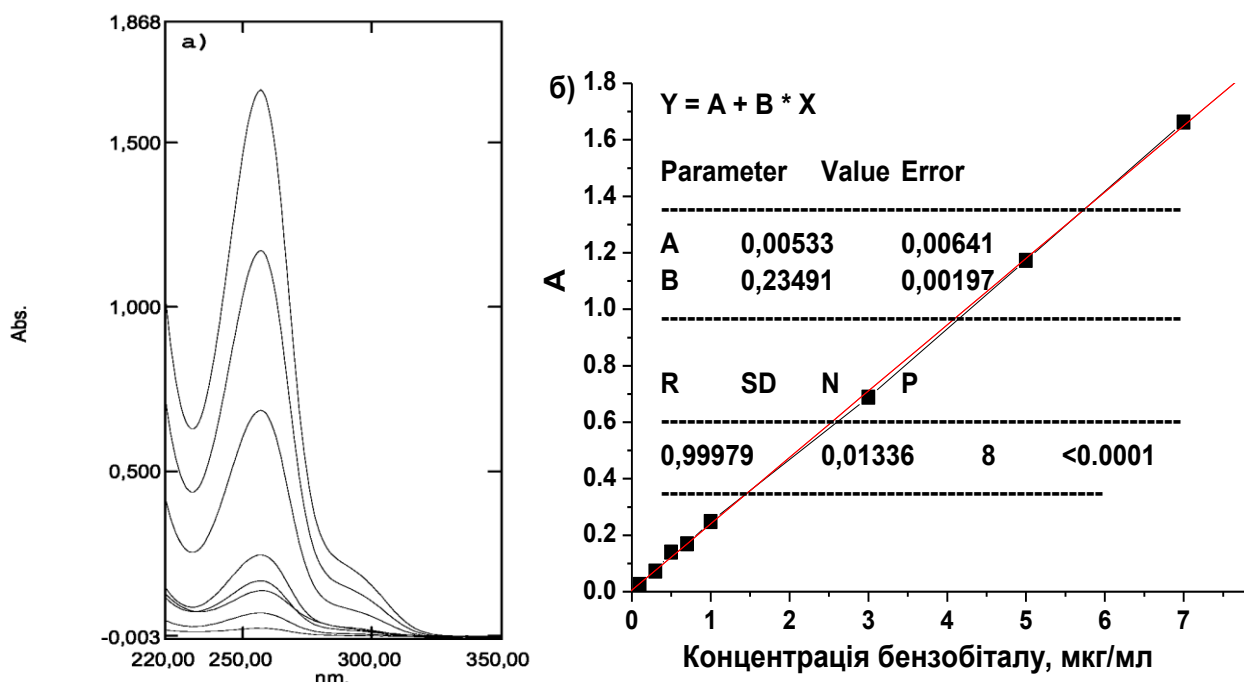


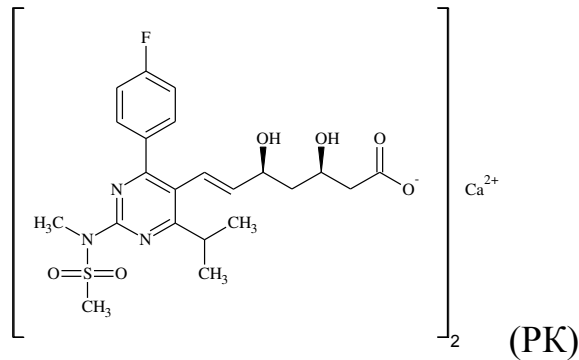
Рисунок 4.4. Спектри поглинання розчинів бензобарбіталу (а) та градувальний графік (б) для його визначення

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій бензобарбіталу 0,1 – 7,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

4.1.2 Люмінесцентне визначення розувастатину кальцію, флупіртину малеату, абіратерону ацетату, ривастигміну гідротартрату

Розувастатин кальцію (кальцієва сіль біс {(3R, 5S, 6E)-7-{4-(4-фторфеніл)-6-ізопропіл-2-[метил(метилсульфоніл)аміно]піримідин-5-іл}-3,5-дигідроксигепт-6-енової кислоти}, РК) – гіполіпідемічний засіб з групи статинів, використовується для зменшення підвищеного рівня загального

холестерину, інгібітор ГМГ-КоА-редуктази:



УФ-спектр РК має полосу поглинання в УФ-області з максимумом за довжини хвилі 241 нм ($\epsilon = 5,4 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹). Спектр збудження люмінесценції РК подібний спектру його поглинання ($\lambda_{\text{збуд}} = 250$ нм).

Нами встановлено, що субстанція РК практично не розчиняється у воді. Вивчений вплив на інтенсивність люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) РК метанолу, етанолу, ацетонітрилу, диметилформаміду, диметилсульфоксиду, пропанолу (70 об/об). Встановлено, що максимальна люмінесценція РК спостерігається у метанолі (рисунок 4.5).

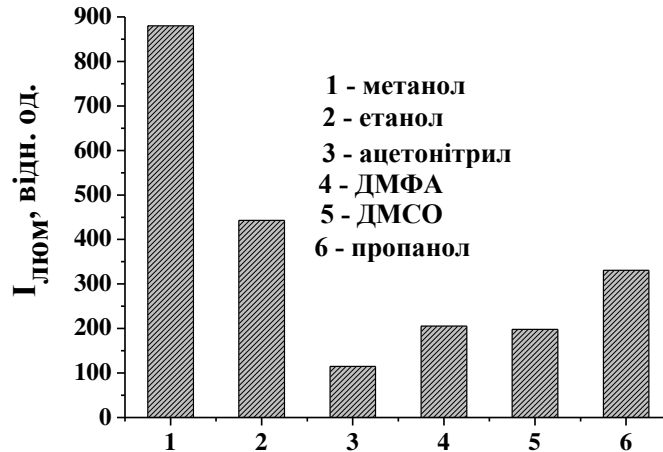


Рисунок 4.5. Вплив органічних розчинників на інтенсивність люмінесценції РК ($C_{\text{РК}} = 100,0$ мкг/мл)

Зі збільшенням концентрації метанольного розчину РК спостерігається збільшення інтенсивності його власної люмінесценції (рисунок 4.6, а).

Градувальний графік

Розчин РСЗ розувастатину кальцію. 0,025 г РСЗ розувастатину кальцію поміщають в мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 15 мл

метанолу, перемішують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником (1000,0 мкг/мл). Розчини РК (100,0 мкг/мл, 10,0 мкг/мл) готують розведенням одержаного розчину.

Розчини для побудови градууювального графіка готують в мірних колбах місткістю 10,0 мл із розчинів РК з концентраціями 10 мкг/мл та 100 мкг/мл. Розчини доводять до позначки метанолом. Паралельно вимірюють інтенсивність люмінесценції метанолу в цих умовах ($I_{\text{хол}}$).

Через 5 хв вимірюють інтенсивність люмінесценції ($I_{\text{РК}}$) при $\lambda_{\text{ем}} = 456 \text{ нм}$ ($\lambda_{\text{збуд}} = 250 \text{ нм}$) (рисунок 4.6, а). За отриманими результатами, з урахуванням холостої, проби будують градууювальний графік (рисунок 4.6, б), який описується рівнянням $I_{\text{РК}} - I_{\text{хол}} = 18,39 + 128,33 \cdot C_{\text{РК}} - 4,36 \cdot C_{\text{РК}}^2$ ($R = 0,99702$).

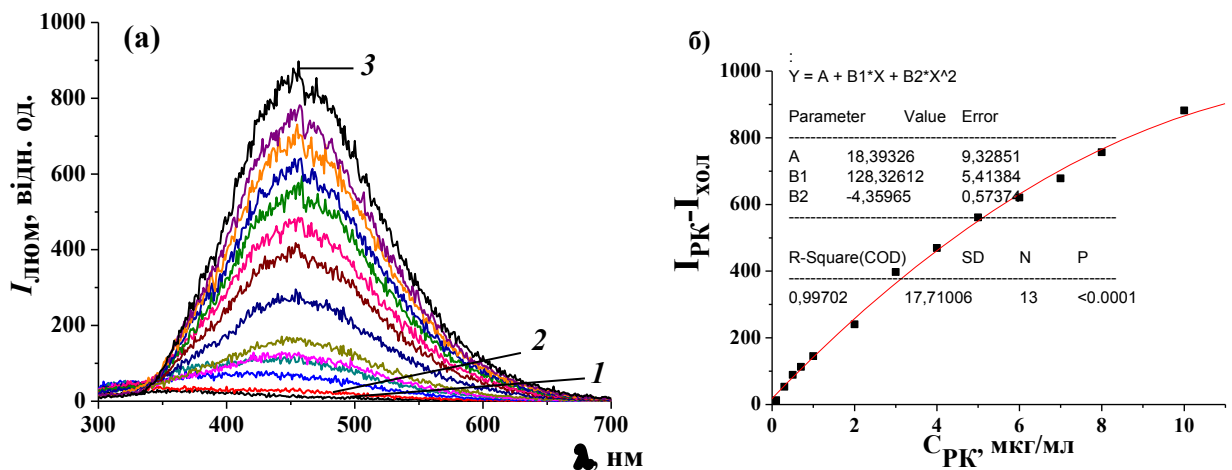


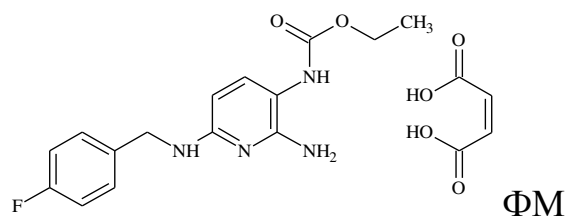
Рисунок 4.6. Спектри власної люмінесценції метанолу (1), розчинів РК с концентраціями від 0,1 мкг/мл (2) до 100,0 мкг/мл (3) (а) та градууювальний графік (б) для люмінесцентного визначення РК ($\lambda_{\text{збуд}} = 250 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{ем}} = 456 \text{ нм}$; щілини 10-10; посилення 750)

Градууювальний графік наведений в інтервалі концентрацій РК 0,1 – 10,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Флупіртину малеат

Флупіртину малеат (етилловий ефір [2-аміно-6-(4-фторбензіламіно)-піридин-3-іл] карбамінової кислоти малеат, ФМ) – неопіодний анальгетик центральної дії, який не викликає залежності та звикання, крім того, надає

міорелаксуючу та нейропротективну дію:



Нами встановлено, що субстанція ФМ практично не розчиняється у воді.

Вивчено вплив на власну люмінесценцію розчину ФМ органічних розчинників різної природи (рисунок 4.7). Встановлено, що при об'ємних вмістах 90 об/об всі розчинники практично не впливають на люмінесценцію ФМ, ацетон, ДМФА та ДМСО зменшують $I_{\text{люм}}$ ФМ у ~ 2 рази.

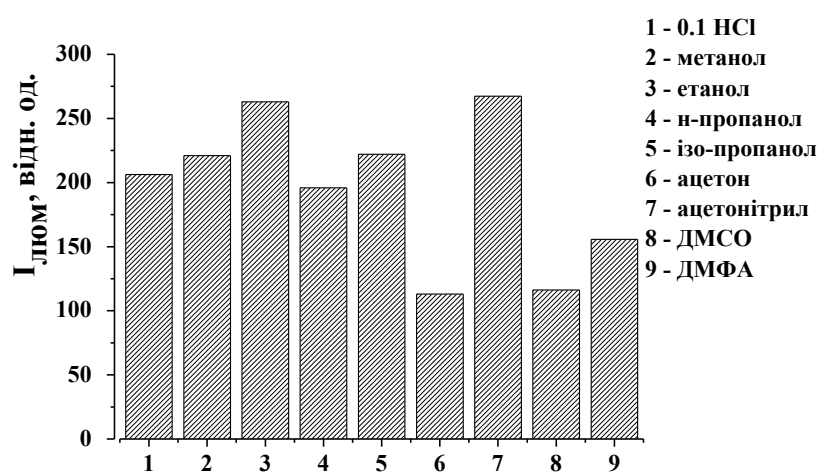


Рисунок 4.7. Вплив органічних розчинників на інтенсивність люмінесценції розчину ФМ ($C_{\text{ФМ}}=0,1$ мкг/мл; $\lambda_{\text{збуд}} = 345$ нм; щілини 10-10; посилення 600)

В етиловому спирті та в 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти відбувається повне розчинення субстанції ФМ, але при цьому оптична густина розчину ФМ в етиловому спирті нижче, ніж у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти. Спостерігається батохромний зсув максимуму поглинання на 5 нм в етанольному середовищі (рисунок 4.8, а). Спектр поглинання ФМ у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти характеризується наявністю інтенсивних смуг в УФ-області спектра з максимумами при $\lambda = 245$ нм ($\epsilon = 1,23 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹) та $\lambda = 345$ нм ($\epsilon = 1,90 \cdot 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹).

Спектр збудження люмінесценції ФМ подібний спектру його поглинання (рисунок 4.8, б).

Із збільшенням рН в ацетатно-аміачному буферному розчині спостерігається зменшення власної інтенсивності люмінесценції ФМ (в ~ 3 рази) з гіпсохромним зсувом максимуму на 35 нм (рисунок 4.9). Для подальших досліджень вибрано розчинення субстанції в 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти, так як в цьому випадку $I_{\text{люом}}$ розчину ФМ максимальна.

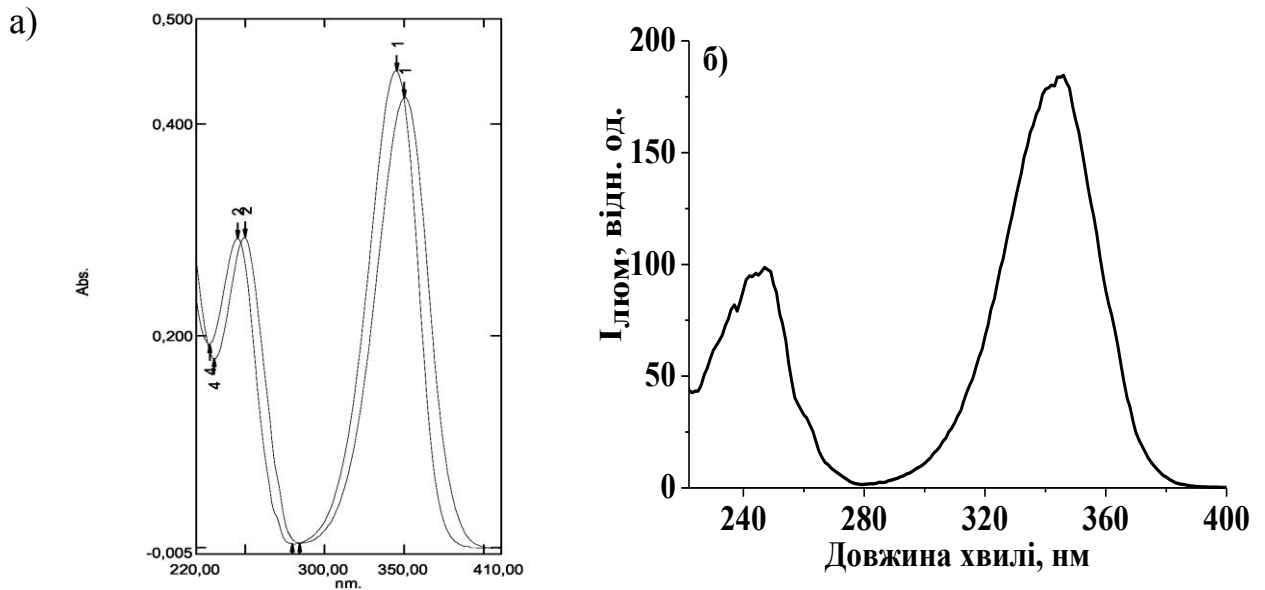


Рисунок 4.8. Спектри поглинання (а) розчинів ФМ у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти та етанолі ($C_{\text{ФМ}}=10,0$ мкг/мл; $l = 1$ см) та збудження люмінесценції (б) розчину ФМ ($C_{\text{ФМ}}=1,0$ мкг/мл; $\lambda_{\text{ем}}=427$ нм; щілини 5-5; посилення 600)

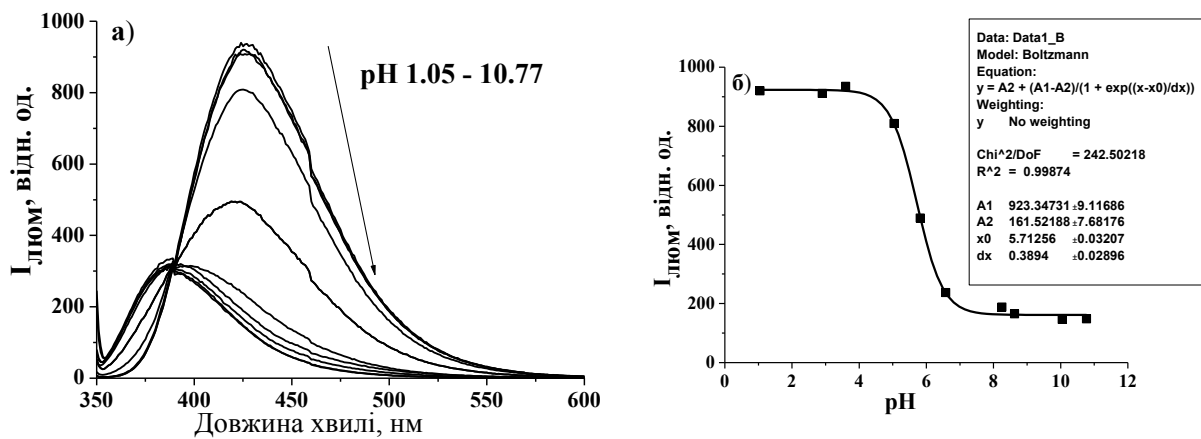


Рисунок 4.9. Спектри власної люмінесценції ФМ (а) ($\lambda_{\text{збуд}}=345$ нм; щілини 5-5; посилення 600) в інтервалі рН 1,05 – 10,77 та залежність $I_{\text{люом}}$ ФМ (б) від рН ($\lambda_{\text{ем}}=427$ нм)

Виявлено, що зі збільшенням концентрації ФМ в середовищі 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти спостерігається пряmolінійне збільшення

його власної люмінесценції.

Градувальний графік

Розчин РСЗ флупіртину малеату. 0,025 г РСЗ флупіртину малеату поміщають в мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 15 мл 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти, перемішують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником (1000,0 мкг/мл). Розчини ФМ (100,0 мкг/мл, 10,0 мкг/мл, 1,0 мкг/мл) готують розведенням одержаного розчину.

Для побудови градувального графіка в ряд мірних колб місткістю 10,0 мл вносять по 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 мл розчину ФМ (1,0 мкг/мл), 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 мл розчину ФМ (10,0 мкг/мл) та 0,2; 0,3 мл розчину ФМ (100,0 мкг/мл). Розчини доводять до 10,0 мл 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти та перемішують. Через 5 хвилин вимірюють $I_{\text{люм}}$ при $\lambda_{\text{ем}}=427$ нм ($\lambda_{\text{збуд}}=345$ нм) (рисунок 4.10, а). За отриманими результатами будують градувальний графік (рисунок 4.10, б).

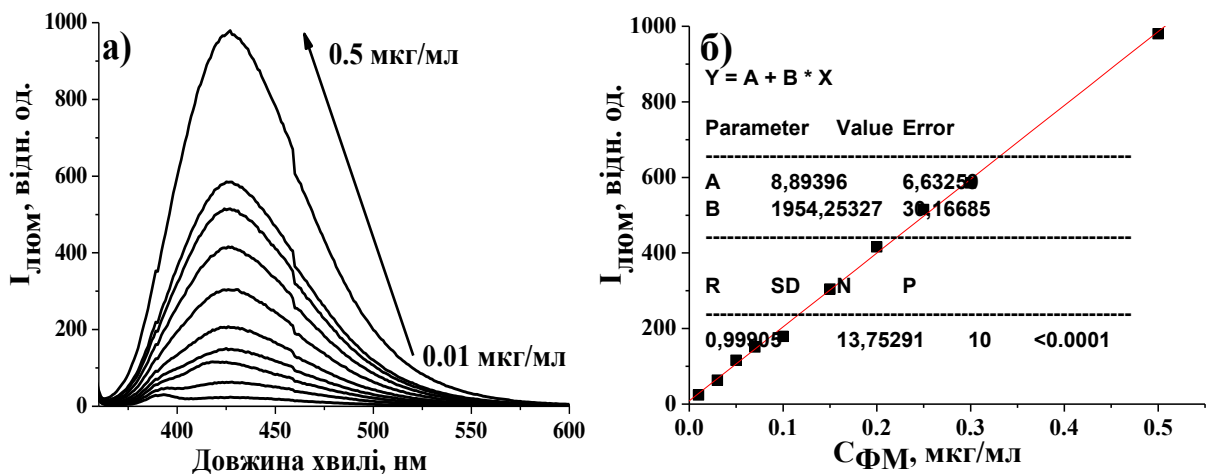
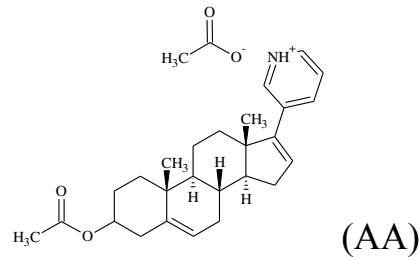


Рисунок 4.10. Спектри власної люмінесценції розчинів ФМ (а) (щільності 10-10) ($\lambda_{\text{збуд}}=345$ нм; посилення 600) та градувальний графік (б) для його люмінесцентного визначення

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій ФМ 0,01 – 0,5 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Абіраторону ацетат (3 β)-17-(Піридин-3-іл)андроста-5,16-дієн-3 α -іл ацетат, АА) є інгібітором біосинтезу андрогену. Зокрема, абіраторон селективно інгібує фермент 17 α -гідроксилазу/С17,20-ліазу (СYP17):



Вивчено вплив на власну люмінесценцію розчину AA органічних розчинників різної природи (рисунок 4.11). Встановлено, що при об'ємних вмістах розчинників 90 об/об етанол має максимальну $I_{\text{люм}}$.

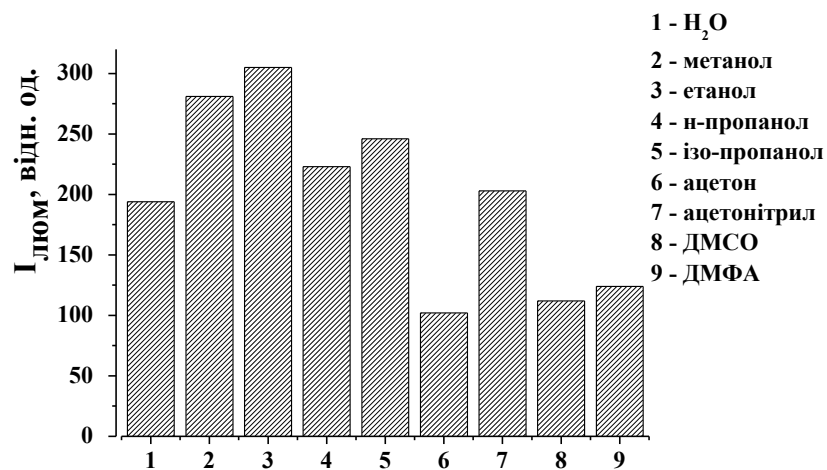


Рисунок 4.11. Вплив органічних розчинників на інтенсивність люмінесценції розчину AA ($C_{\text{AA}}=2,0$ мкг/мл; $\lambda_{\text{збуд}} = 253$ нм; щілини 10-10; посилення 600)

Виявлено, що зі збільшенням концентрації AA в етанолі спостерігається прямолінійне збільшення його власної люмінесценції.

Градувальний графік

Розчин РСЗ абіратерону ацетату. 0,025 г РСЗ абіратерону ацетату поміщають в мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 15 мл етанолу, перемішують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником (1000,0 мкг/мл). Розчини AA (100,0 мкг/мл, 10,0 мкг/мл) готують розведенням одержаного розчину.

Для побудови градувального графіка в ряд мірних колб місткістю 10,0 мл вносять по 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0 мл розчину AA (10,0 мкг/мл) та 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 мл розчину AA (100,0 мкг/мл). Розчини доводять до 10,0 мл етанолом та перемішують. Через 5 хвилин вимірюють $I_{\text{люм}}$ при

$\lambda_{\text{ем}}=350$ нм ($\lambda_{\text{збуд}}=253$ нм) (рисунок 4.12, а). За отриманими результатами будують градуювальний графік (рисунок 4.12, б).

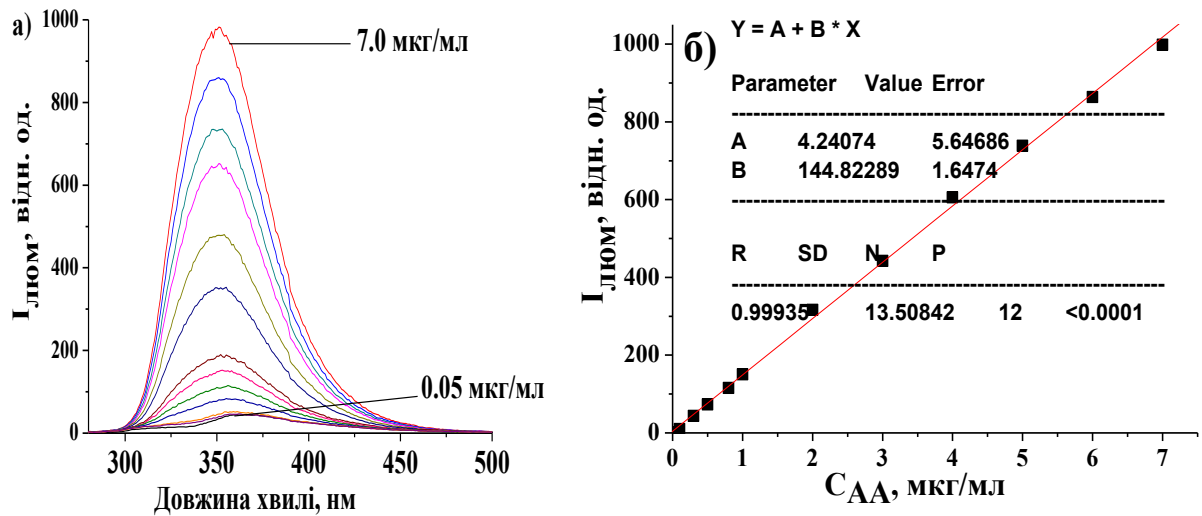
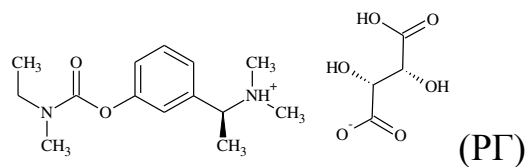


Рисунок 4.12. Спектри власної люмінесценції розчинів АА (а) ($\lambda_{\text{збуд}}=253$ нм; щілини 10-10; посилення 600) та градуювальний графік (б) для його люмінесцентного визначення

Градуювальний графік лінійний в інтервалі концентрацій АА 0,05 – 7,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Ривастигміну гідротартрат (3-[(1S)-1-(диметиламіно)етил]феніл-N-етил-N-метилкарбамат гідро(2R,3R)-2,3-дигідроксибутандіоат, РГ) – селективний інгібітор ацетилхолінестерази головного мозку карбаматного типу, застосовують при симптоматичному лікуванні деменції, обумовленої хворобою Альцгеймера:



Спектр поглинання РГ у воді характеризується наявністю смуги в УФ-області спектра з максимумом за довжини хвилі 263 нм ($\epsilon = 2,6 \cdot 10^3$ л·моль⁻¹·см⁻¹). Спектр збудження власної люмінесценції РГ подібен спектру його поглинання ($\lambda_{\text{збуд}} = 262$ нм).

Вивчено вплив на інтенсивність люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) РГ метанолу, етанолу, ацетонітрилу, диметилформаміду, диметилсульфоксиду, пропанолу. Встановлено, що максимальна люмінесценція РГ спостерігається у водному

середовищі. Виявлено, що із збільшенням концентрації водного розчину РГ спостерігається збільшення його власної люмінесценції (рисунок 4.13, а).

Градувальний графік

Розчин РСЗ ривастигміну гідротартрату. 0,025 г РСЗ ривастигміну гідротартрату поміщають в мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 15 мл води, перемішують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником (1000,0 мкг/мл). Розчини РГ (100,0 мкг/мл, 10,0 мкг/мл) готують розведенням одержаного розчину.

Для побудови градувального графіка в ряд мірних колб місткістю 10,0 мл вносять по 0,5; 1,0 мл розчину РГ (10 мкг/мл), 0,3; 0,4; 0,5; 0,7; 1,0; 2,0 мл розчину РГ (100 мкг/мл). Розчини доводять до 10,0 мл водою. Через 5 хв вимірюють $I_{\text{люм}}$ при $\lambda_{\text{ем}} = 293$ нм ($\lambda_{\text{збуд}} = 262$ нм). За отриманими результатами будують градувальний графік (рисунок 4.13, б).

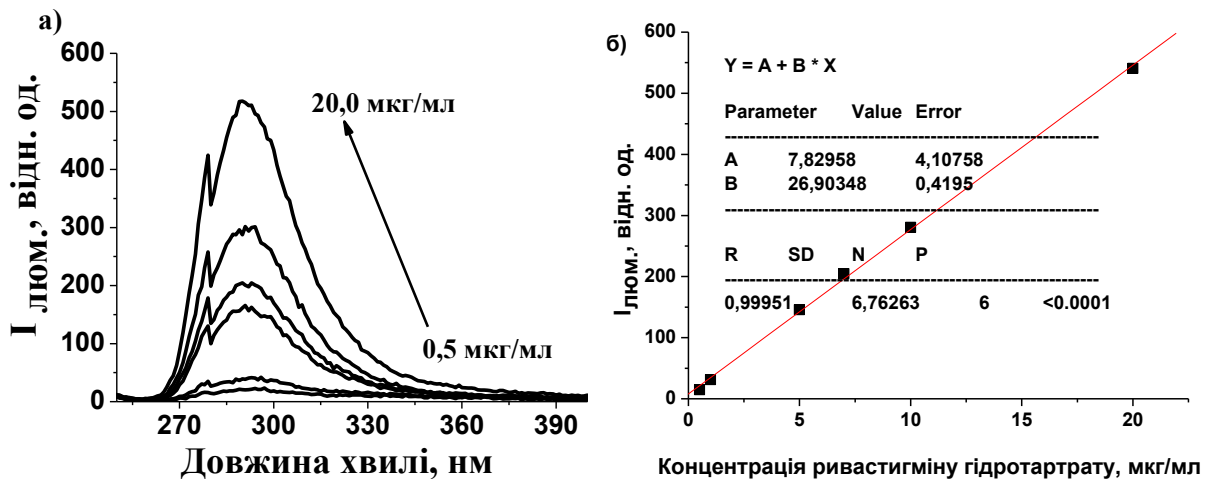
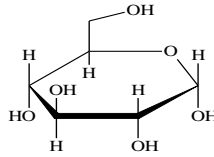


Рисунок 4.13. Спектри власної люмінесценції РГ (а); градувальний графік для люмінесцентного визначення РГ (б) ($\lambda_{\text{збуд}} = 262$ нм; щілини 10-10; посилення 560)

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій РГ 0,5 – 20,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

4.1.3 Поляриметричне визначення глюкози

Глюкоза – моносахарид, що відноситься до групи альдогексоз. Глюкозу застосовують у медицині як поживну речовину та компонент кровозамісної та протишокової рідини:



Об'єктом дослідження була глюкоза, яка входить до складу препарату РЕГІСОЛ (ТДВ «ІНТЕРХІМ», Україна), порошок для орального розчину по 18,9 г у саше. Визначення вмісту глюкози проводили методом поляриметрії.

Градувальний графік

Розчини РСЗ глюкози. У мірні колби місткістю 100,0 мл вносять по 0,05; 0,1; 0,5; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1 та 1,2 г РСЗ глюкози, розчиняють в 80 мл води при перемішуванні на магнітній мішалці протягом 15 хв, додають 0,1 мл розчину аміаку розведеного [118], витримують протягом 30 хв та доводять об'єм розчину водою до 100,0 мл.

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

Розчини використовують свіжоприготованими.

Визначають нуль поляриметра з використанням компенсаційного розчину та кут обертання площини поляризації (α) випробовуваного розчину при температурі $(20 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

Встановлена лінійна залежність кута обертання від вмісту глюкози (рисунок 4.14) для її кількісного визначення.

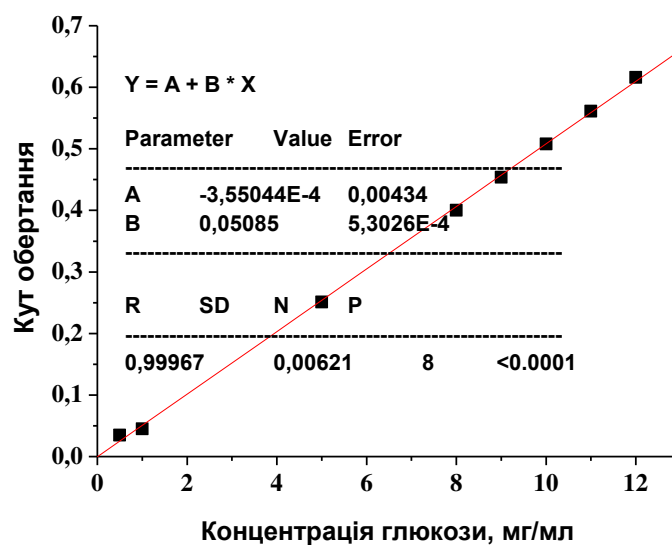


Рисунок 4.14. Лінійна залежність кута обертання від концентрації ГЛЮКОЗИ

Градувальний графік лінійний в діапазоні концентрацій глюкози 0,5 – 12,0 мг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

4.1.4 АЕС-ІЗП методика визначення залишкових кількостей калію та натрію

Розроблена АЕС-ІЗП (атомно-емісійна спектрометрія з індуктивно зв'язаною плазмою) методика визначення залишкових кількостей калію та натрію після очищення фармацевтичного обладнання, на якому виробляються багатокомпонентні лікарські форми (саше), що містять натрію хлорид, калію хлорид, натрію цитрат. Цьому методу властива унікальна можливість визначення з однієї проби великої кількості елементів, а також висока швидкість вимірювання (менше 1 хв) їх низьких концентрацій.

У лікарському засобі РЕГІСОЛ® НЕО, саше по 7,5 г (ТДВ «ІНТЕРХІМ», Україна), вміст діючих речовин в одному саше є наступними: натрію цитрат – 580 мг, натрію хлорид – 350 мг, калію хлорид – 300 мг.

Вимірюють інтенсивності емісії на атомно-емісійному спектрометрі з індуктивно-зв'язаною плазмою, використовуючи наступні параметри:

- аналітична лінія К – 766,490 нм;
- аналітична лінія Na – 818,326 нм;
- режим спостереження плазми – аксіальний;
- потужність плазми – 1150 Вт;
- час інтегрування сигналу – 60 с;
- допоміжний потік аргону – 0,5 л/хв;
- розпилювач – SeaSpray Nebulizer;
- потік аргону у розпилювачі – 0,50 л/хв;
- швидкість обертання насосу – 50 об/хв.

Встановлена лінійна залежність емісії розчинів калію та натрію, від концентрації в інтервалі 50 – 5000 мкг/л).

Градувальний графік

Розчин порівняння калію 10000 мг/л.

Наважку 1,9070 г попередньо висушеного при 105 °С протягом

3-х годин калію хлориду поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 80 мл води та доводять до позначки водою.

Розчин порівняння натрію 10000 мг/л.

Наважку 2,5420 г попередньо висушеного при 105 °С протягом 3-х годин натрію хлориду поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 80 мл води та доводять до позначки водою.

Розчин порівняння калію 100 мг/л.

1,0 мл розчину порівняння калію 10000 мг/л поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл та доводять до позначки водою.

Розчин порівняння натрію 100 мг/л.

1,0 мл розчину порівняння натрію 10000 мг/л поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл та доводять до позначки водою.

Розчин порівняння калію 5000 мкг/л та натрію 5000 мкг/л (5).

По 5,0 мл розчинів порівняння натрію 100 мг/л та калію 100 мг/л поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл та доводять до позначки водою.

Розчин порівняння калію 50 мкг/л та натрію 50 мкг/л (1).

1,0 мл розчину порівняння (5) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл та доводять до позначки водою.

Розчин порівняння калію 250 мкг/л та натрію 250 мкг/л (2).

5,0 мл розчину порівняння (5) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл та доводять до позначки водою.

Розчин порівняння калію 500 мкг/л та натрію 500 мкг/л (3).

10,0 мл розчину порівняння (5) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл та доводять до позначки водою.

Розчин порівняння калію 2500 мкг/л та натрію 2500 мкг/л (4).

50,0 мл розчину порівняння (5) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл та доводять до позначки водою.

Розпилюють розчини в плазму у вказаній послідовності: розчини порівняння (1) – (5), контрольний та випробовуваний розчини, реєструють сигнали емісії. Між розчинами в плазму розпилюють воду.

Концентрації натрію та калію, у мкг/л, у розчинах обчислюють за допомогою програмного забезпечення спектрометра, або шляхом побудови калібрувального графіка в координатах інтенсивність емісії натрію/калію – концентрація натрію/калію в розчинах порівняння. Для розрахунку концентрації використовують лінійну функцію.

Спектри емісії розчинів порівняння калію та натрію у воді для різних концентрацій наведено на рисунках 4.15 та 4.16.

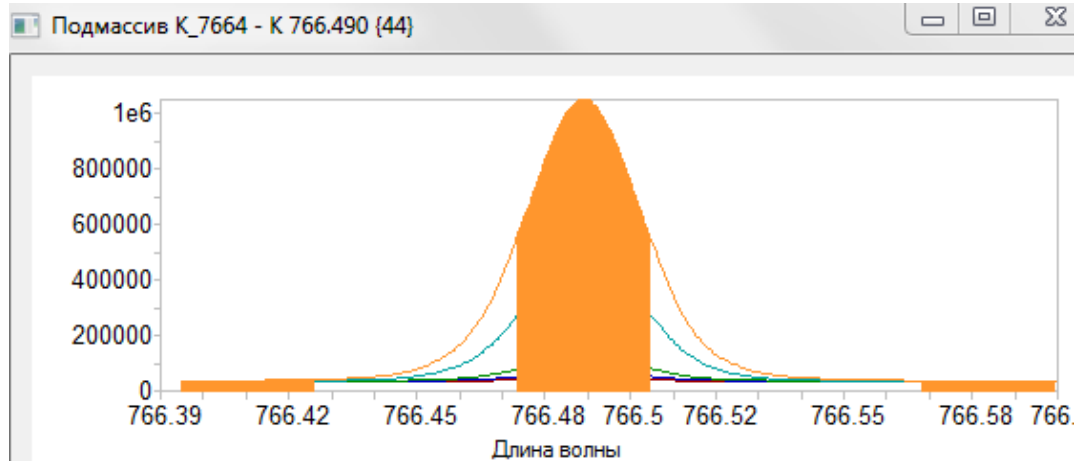


Рисунок 4.15. Спектри емісії розчинів порівняння, одержаних при визначенні калію

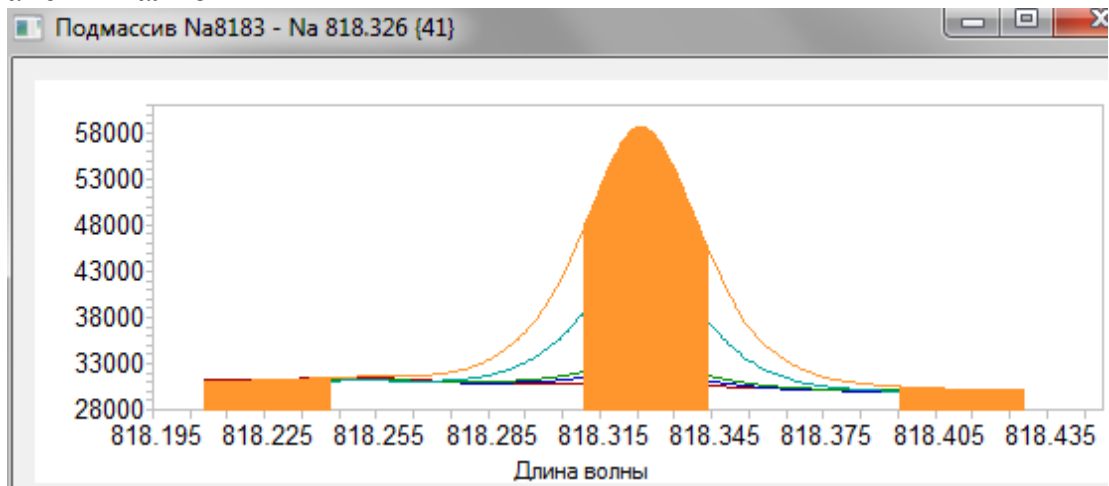


Рисунок 4.16. Спектри емісії розчинів порівняння, одержаних при визначенні натрію

Контрольний розчин. Чистий сваб поміщають у лабораторний стакан місткістю 10,0 мл, додають 5 мл води та проводять десорбцію протягом 10 хв. Отриманий розчин фільтрують через мембранний фільтр.

Градувальні графіки (рисунок 4.17) лінійні в діапазоні концентрацій 50 – 5000 мкг/л для калію (натрію).

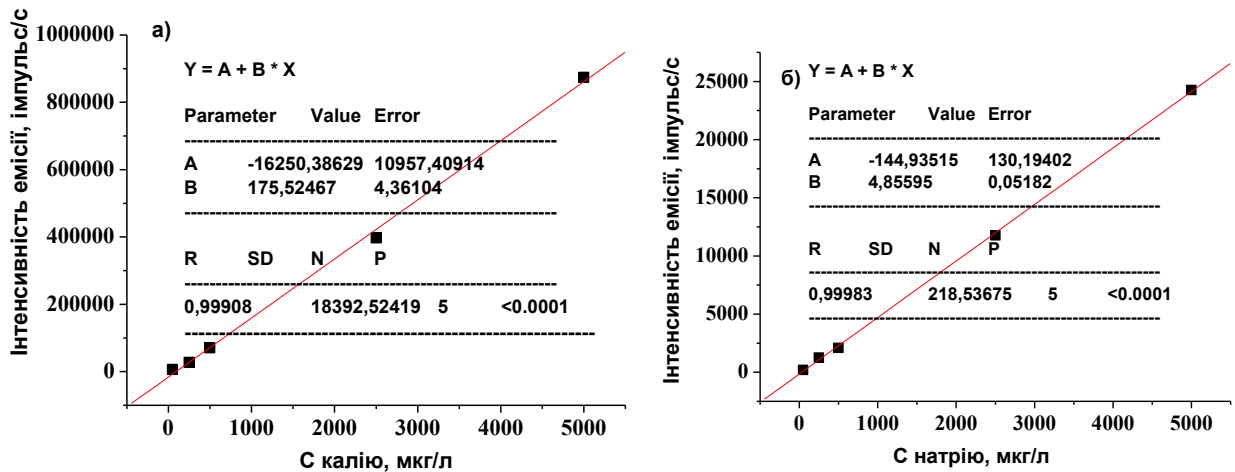


Рисунок 4.17. Градувальні графіки для визначення калію (а) та натрію (б)

Вміст калію/натрію (X), в мікрограмах у змиві, розраховують за формулою: $X = (C - C_0) \cdot 0,005$,

де: C – концентрація калію/натрію в випробовуваному розчині, розрахована з градувального графіка, мкг/л;

C_0 – концентрація калію/натрію в контрольному розчині, розрахована з градувального графіка, мкг/л.

4.2 Хроматографічні методики аналізу

Для кожного препарату оптимізовані умови аналізу: тип сорбенту, розмір часток та діаметр пор сорбенту, довжина колонки, температура колонки, вміст та швидкість елюенту, діапазон концентрацій органічного модифікатора у рухомій фазі, довжина хвилі та час детектування.

У якості рухомих фаз в методиках для обернено-фазової ВЕРХ використовували водні розчини з додаванням органічних розчинників (метанол, ацетонітрил). З метою отримання відтворюваних результатів значення рН рухомих фаз підтримували в заданих межах, застосовуючи додавання відповідних солей або кислот. Для ЛП, які містять основні групи, враховували робочий діапазон колонок, рК аналізованих ЛП, властивості вільних силанольних груп сорбенту. Нами показано, що рухоми фази з рН 2 – 5 є найкращими для розділення та поліпшення симетрії піків, а також призводять до збільшення ефективності розділення аналітів, тому що низькі значення рН зменшують ступінь взаємодії з залишковими силанольними

групами поверхні сорбенту, які в кислому середовищі протоновані.

Для збільшення часу утримування додавали до рухомої фази в якості динамічних модифікаторів гідрофобні амонієві катіони, поверхнево-активні речовини. Для покращення селективності при розділенні та покращення параметрів піків вводили іон-парні реагенти.

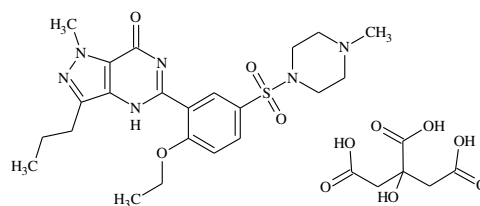
Концентрації аналітів у випробовуваному розчині визначали за градууювальним графіком.

Придатність хроматографічної системи визначали за співвідношенням сигнал/шум (не менш ніж 3 – 5), розрахованого для піку аналіту з хроматограми розчину для перевірки придатності (розчин з мінімальною концентрацією інтервалу лінійності градууювального графіка).

Для перевірки специфічності методик записували хроматограми розчинів для пробопідготовки, промивного розчину з чистого свабу (на них мають бути відсутні піки, які заважають визначенню аналітів) та модельних розчинів АФІ (час утримування піку аналіту на хроматограмі випробовуваного розчину має співпадати з часом утримування на хроматограмі відповідного зовнішнього стандарту).

4.2.1 ВЕРХ визначення деяких АФІ після виробництва однокомпонентних препаратів

Силденафілу цитрат (5-[2-Етоксі-5-[(4-метилпіперазин-1-іл)сульфоніл]феніл]-1-метил-3-пропіл-1,6-дигідро-7H-піразоло[4,3-d]піримідин-7-он дигідроген 2-гид-роксипропан-1,2,3-трикарбоксилат) – інгібітор фосфодіестерази типу 5. Лікарський засіб для лікування еректильної дисфункції:



Визначення проводять, використовуючи рідинний хроматограф с УФ-детектором за таких умов:

- колонка з нержавіючої сталі розміром 0,15 м × 4,6 мм, заповнена сорбентом типу Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ с розміром часток 5 мкм;
- рухома фаза: буферний розчин – метанол – ацетонітрил (500:330:190);
- швидкість рухомої фази: 1,5 мл/хв;
- температура колонки: 25 °С;
- температура автосамплеру: 20 °С;
- об'єм інжекції: 50 мкл;
- детектування за довжини хвилі: 290 нм;
- час хроматографування: 5 хв.

Буферний розчин. 70 мл триетиламіну поміщають у мірну колбу місткістю 1000,0 мл, доводять об'єм розчину до позначки водою, перемішують та доводять до рН 4,0 кислотою фосфорною.

Градувальний графік

Розчин РСЗ силденафілу цитрату. 0,025 г РСЗ силденафілу цитрату поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 15 мл метанолу, перемішують та доводять об'єм до позначки метанолом. 1,0 мл отриманого розчину поміщають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 50 мл рухомої фази, перемішують та доводять об'єм до позначки рухомою фазою (10,0 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 10,0 мл поміщають по 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 та 10,0 мл отриманого розчину та доводять до позначки рухомою фазою, отримуючи розчини з вмістом силденафілу цитрату 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 та 10,0 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.18, а) будують градувальний графік (рисунок 4.18, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій силденафілу цитрату (мкг/мл), а по осі ординат – значення площ піків.

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій силденафілу цитрату 0,1 – 10,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

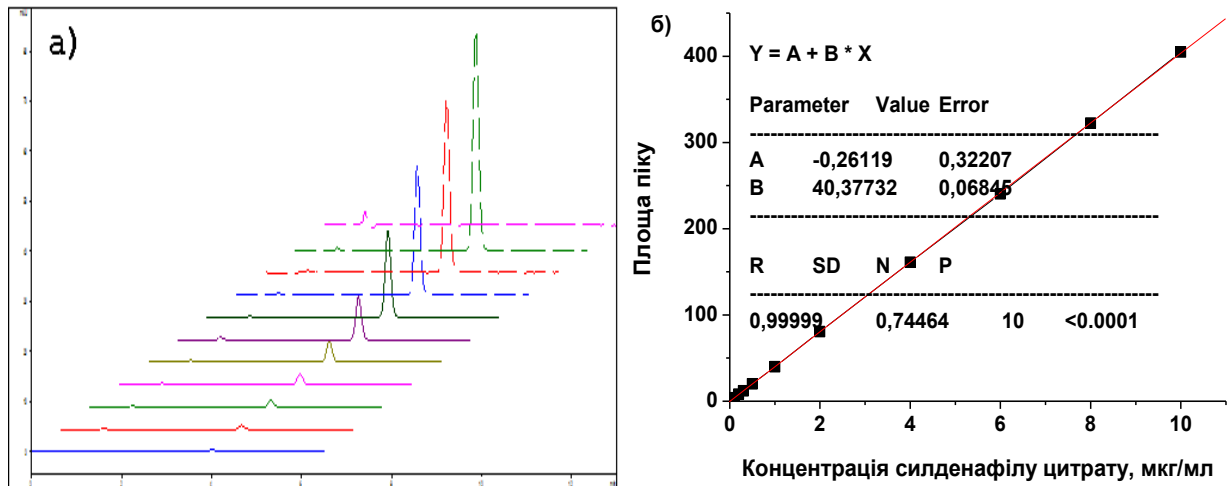
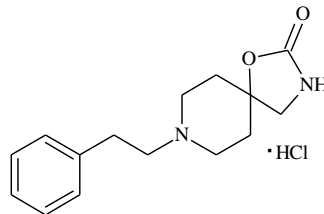


Рисунок 4.18. Хроматограми модельних розчинів силденафілу цитрату (а) та градувальний графік (б) для його визначення

Фенспіриду гідрохлорид (8-(2-фенілетил)-1-окса-3,8-діазаспіро[4,5]декан-2-ону гідрохлорид) – синтетичний препарат, похідне оксазолідинонів, що має властивості нестероїдного протизапального препарату, антигістамінних препаратів та застосовується у лікуванні захворювань дихальної системи:



Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка з нержавіючої сталі розміром 0,15 м × 4,6 мм, заповнена сорбентом типу Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ з розміром часток 5 мкм;
- рухома фаза: 2,76 г натрію дигідрофосфату моногідрату поміщають у мірну склянку місткістю 2000 мл та розчиняють у 800,0 мл води для хроматографії, додають 200,0 мл метанолу та доводять кислотою фосфорною до рН 3.0;
- швидкість рухомої фази: 1,5 мл/хв;
- температура колонки: 30 °С;

- температура автосамплеру: 20 °С;
- об'єм інжекції: 50 мкл;
- детектування за довжини хвилі: 210 нм;
- час хроматографування: 5 хв.

Градувальний графік

Розчин РСЗ фенспіриду гідрохлориду. 0,025 г РСЗ фенспіриду гідрохлориду поміщають в мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 10 мл води для хроматографії, перемішують та доводять об'єм до позначки водою для хроматографії (розчин А).

0,5 мл розчин А поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл та доводять об'єм розчину до позначки водою для хроматографії (розчин В).

У мірні колби місткістю 10,0 мл поміщають по 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0 мл розчину В та 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 мл розчину А та доводять об'єм кожного з розчинів водою для хроматографії до позначки, отримуючи розчини з вмістом фенспіриду гідрохлориду 0,5; 1,0 3,0; 5,0; 7,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0 та 100,0 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.19, а) будують градувальний графік (рисунок 4.19, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій фенспіриду гідрохлориду (мкг/мл), а по осі ординат – значення площ піків.

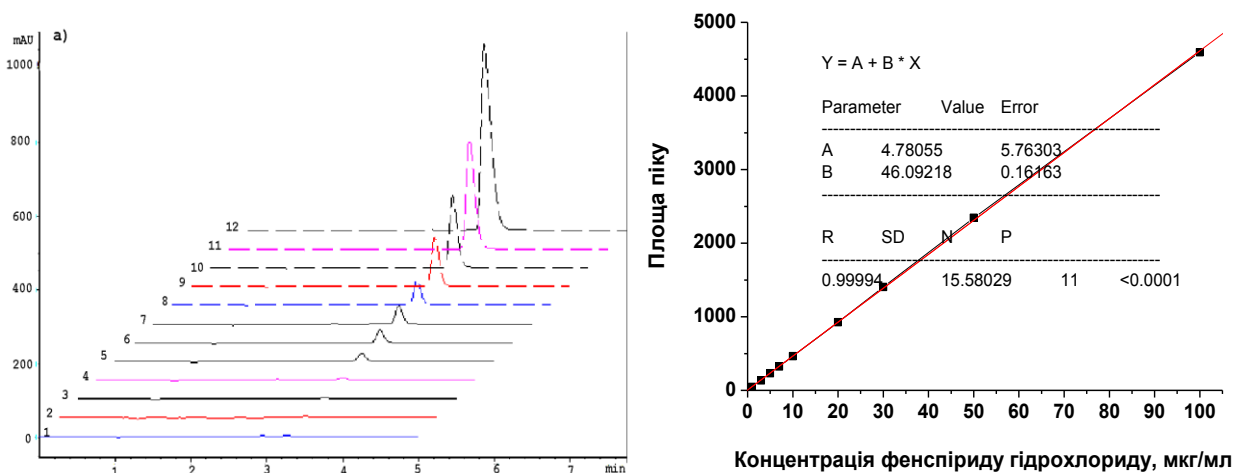
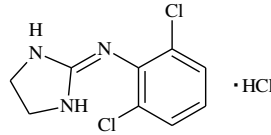


Рисунок 4.19. Хроматограми модельних розчинів фенспіриду гідрохлориду (а) та градувальний графік (б) для його визначення

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій фенспіриду гідрохлориду 0,5 – 100,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Клонідин гідрохлорид (2,6-дихлор-N-(імідазолідін-2-ілден)анілін гідрохлорид) – є антигіпертензивним засобом центральної дії:



Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка з нержавіючої сталі розміром 0,15 м × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії с розміром часток 5 мкм;
- рухома фаза: метанол – розчин А – фосфорна кислота (500:500:1, об/об/об), доводять рН за допомогою 1 М розчину натрію гідроксиду до 3,0;
- швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;
- температура колонки: 25 °С;
- детектування за довжини хвилі: 220 нм;
- об'єм інжекції: 50 мкл;
- час хроматографування: 8 хв.

Приготування розчину А. 2,2 г натрію октансульфонату розчиняють у 900 мл води для хроматографії, доводять об'єм розчину до 1000,0 мл водою для хроматографії та перемішують.

Градувальний графік

Розчин РСЗ клонідину гідрохлориду. 25,0 мг РСЗ клонідину гідрохлориду поміщають в мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 20 мл води для хроматографії, перемішують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником (1000,0 мкг/мл).

1,0 мл отриманого розчину поміщають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм до позначки водою для хроматографії та перемішують (10,0 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 10,0 мл поміщають по 0,10; 0,25; 0,50; 0,75;

1,25; 2,5; 3,5; 5,0 та 6,0 мл розчину РСЗ клонідину гідрохлориду та доводять об'єми до позначки водою для хроматографії, отримуючи розчини з вмістом клонідину гідрохлориду 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,25; 2,50; 3,50; 5,00 та 6,00 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.20, а) будують градувальний графік (рисунок 4.20, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій клонідину гідрохлориду (мкг/мл), а по осі ординат – значення площ піків.

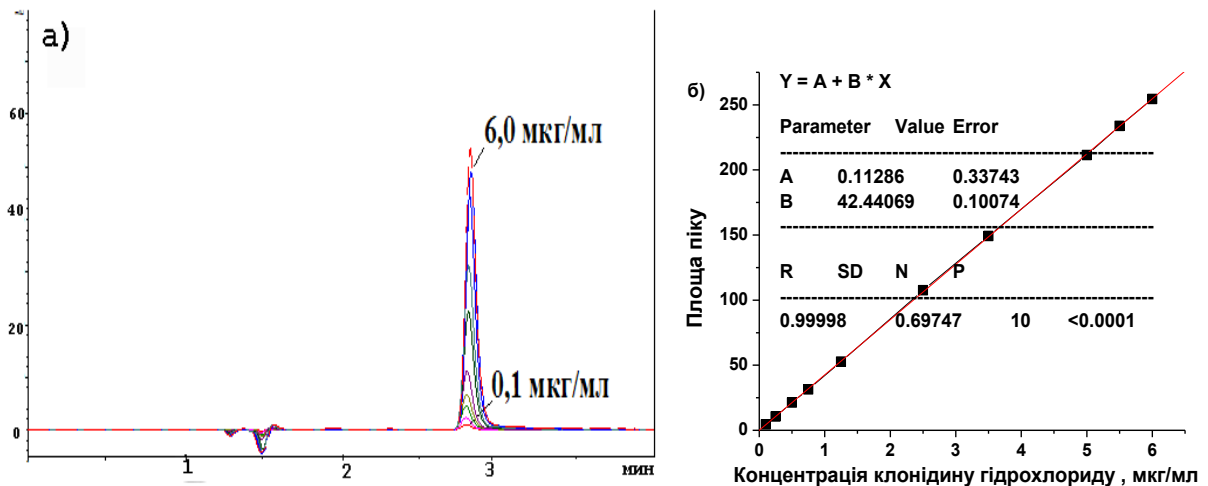


Рисунок 4.20. Хроматограми модельних розчинів клонідину гідрохлориду (а) та градувальний графік (б) для його визначення

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій клонідину гідрохлориду 0,1 – 6,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Розувастатин кальцію

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за наступних умов: колонка з нержавіючої сталі розміром 0,15 м × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії типу Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ с розміром часток 5 мкм; рухома фаза: 0,2 % (об/об) розчин кислоти оцтової : ацетонітрил (50:50); швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв; температура колонки: 25 °С; температура автосамплера: 4 °С; час хроматографування: 6 хв; детектування за довжини хвилі: 248 нм; об'єм інжекції: 100 мкл; час утримування розувастатину: 3,0 хв.

0,2 % (об/об) розчин кислоти оцтової. 2,0 мл кислоти оцтової льодяної

поміщають в мірну колбу місткістю 1000,0 мл, доводять об'єм розчину водою для хроматографії до позначки та перемішують.

Розчин для пробопідготовки. 500,0 мл 0,2 % (об/об) розчину кислоти оцтової змішують з 250,0 мл метанолу та 250,0 мл ацетонітрилу, перемішують та охолоджують.

Градувальний графік

Розчин РСЗ розувастатину кальцію. 0,025 г РСЗ розувастатину кальцію поміщають у мірну колбу місткістю 25,0 мл, додають 15 мл розчину для пробопідготовки, перемішують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником.

0,1 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм до позначки розчином для пробопідготовки та перемішують (1,0 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 10,0 мл поміщають по 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 10,0 мл розчину РСЗ розувастатину кальцію та доводять до позначки розчином для пробопідготовки, отримуючи розчини з вмістом розувастатину кальцію 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3, 0,5 та 1,0 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.21, а) будують градувальний графік (рисунок 4.21, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій РК (мкг/мл), а по осі ординат – значення площ піків.

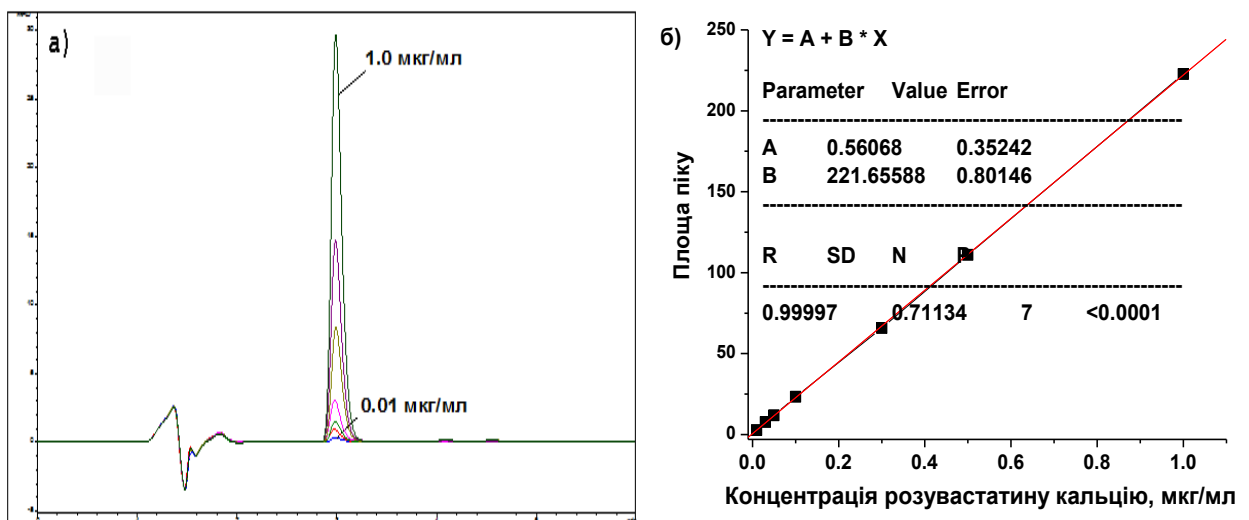


Рисунок 4.21. Хроматограми модельних розчинів РК (а) та градувальний графік (б) для його визначення

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій РК 0,01 – 1,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

У модельних дослідах в ході валідації методик робили змиви змоченим 96% -ним спиртом свабом з поверхні (100,0 см²), на яку штучно наносили 0,005 г АФІ РК, далі проводили витяг 5,0 мл метанолу. 0,1 мл одержаного розчину поміщали в мірну колбу місткістю 100,0 мл та доводили до позначки розчином для пробопідготовки (ВЕРХ) або метанолом (люмінесценція) (1,0 мкг/мл). 1,0 мл одержаного розчину поміщали в мірну колбу місткістю 10,0 мл та доводили до позначки розчином для пробопідготовки (ВЕРХ) або метанолом (люмінесценція) (0,1 мкг / мл). Далі концентрацію РК визначали в умовах, зазначених у відповідних методиках. Було встановлено, що кількісний витяг розувастатину кальцію в кінцевий розчин становить 93,2% – 97,1 % (ВЕРХ) та 90,9 % – 95,6 % (люмінесценція) (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Порівняння ступенів вилучення розувастатину кальцію, одержаних за ВЕРХ та люмінесцентним методами

№ проби	Ступінь вилучення розувастатину кальцію $k, \%$					
	ВЕРХ			Люмінесценція		
	Знайдено	$k_{cp} \pm \Delta_k$	$S_r, \%$	Знайдено	$k_{cp} \pm \Delta_k$	$S_r, \%$
1	93,25			90,94		
2	95,30			95,62		
3	96,81	95,55±1,92	1,62	92,54	93,40±2,27	1,96
4	97,14			93,23		
5	95,23			94,67		

Для порівняння двох методів застосували статистичний критерій F -розподілу, який дозволяє порівнювати величини вибірових дисперсій двох рядів спостережень, та t -критерій Стюдента для перевірки збіжності середніх значень. Для обчислення $F_{екс}$ використовували формулу: $F_{екс} = \frac{S_{max}^2}{S_{min}^2}$.

Розрахований F -критерій за експериментальними даними ($F_{\text{екс}} = 1,40$) порівняли з табличним значенням ($F_{\text{табл}} = 6,39$). На підставі того, що $F_{\text{екс}} < F_{\text{табл}}$ можна зробити висновок, що розбіжність між дисперсіями для двох наборів даних можна визнати статистично незначущим з імовірністю 95%.

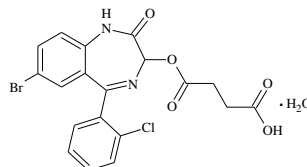
Для порівняння середніх двох вибірок використовували t -критерій Стьюдента, який розраховували за формулою: $t_{\text{екс}} = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{S_0} \cdot \sqrt{\frac{n}{2}}$, де

$S_0 = \sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{2}}$ – об'єднане стандартне відхилення. Розрахований за

експериментальними даними t -критерій ($t_{\text{екс}} = 2,00$) порівняли з табличним значенням для ступенів свободи 8 і $P = 95 \%$ ($t_{\text{табл}} = 2,37$). На підставі того, що $t_{\text{екс}} < t_{\text{табл}}$ можна зробити висновок, що розбіжність між середніми двох вибірок є статистично незначущим з ймовірністю 95 %. Таким чином, є підстави вважати, що обидві вибірки належать одній генеральній сукупності.

Отримані дані вказують на задовільну збіжність результатів, одержаних двома різними методами. Таким чином, ВЕРХ та люмінесцентний методи дають близькі результати при визначенні розувастатину кальцію в модельних змивах (табл. 4.1). Вони мають близьку відтворюваність: відхилення паралельних визначень від середнього становить $\pm 1,92 \%$ та $2,27 \%$, відповідно. Перевагою люмінесцентного методу є простота виконання аналізу та невелика витрата реагентів, однак, ВЕРХ метод дозволяє отримувати більш низьку межу виявлення (на порядок величини).

Левана (моно-[7-бром-2-оксо-5-(2-хлорфеніл)-2,3-дигідро-1Н-бензо[1,4]-діазепін-3-іл]сукцинату моногідрат) – належить до групи похідних бензодіазепіну, є частковим селективним агоністом ГАМК А-рецепторного комплексу, чинить виражену снодійну, анксиолітичну, помірну міорелаксантну та протисудомну дію:



Визначення проводять методом рідинної хроматографії, використовуючи рідинний хроматограф з УФ-детектором за таких умов:

– колонка з нержавіючої сталі розміром 0,25 м × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії типу Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ з розміром часток 5 мкм;

– рухома фаза: ацетонітрил : вода : кислота фосфорна (400:600:2,0);

– швидкість рухомої фази: 1,5 мл/хв;

– температура колонки: 30 °С;

– час хроматографування: 12 хв;

– детектування за довжини хвилі: 230 нм;

– об'єм інжекції: 10 мкл;

– час утримування левана: 7,8 хв;

– час утримування 7-бром-3-гідрокси-5-(2-хлорфеніл)-1,3-дигідробензо[1.4]діазепін-2-она: 5,7 хв.

Градувальний графік

Розчин РСЗ левана. 0,020 г РСЗ левана поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70,0 мл ацетонітрилу, перемішують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником.

1,0 мл отриманого розчину поміщають в мірну колбу місткістю 10,0 мл, доводять об'єм до позначки ацетонітрилом та перемішують (20,0 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 20,0 мл поміщають по 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,1 та 1,2 мл розчину РСЗ левана та доводять до позначки ацетонітрилом, отримуючи розчини з вмістом левана 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8; 1,0; 1,1 та 1,2 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.22, а) будують градувальний графік (рисунок 4.22, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій левана (мкг/мл), а по осі ординат – значення площ піків.

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій левана 0,1 – 1,2 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

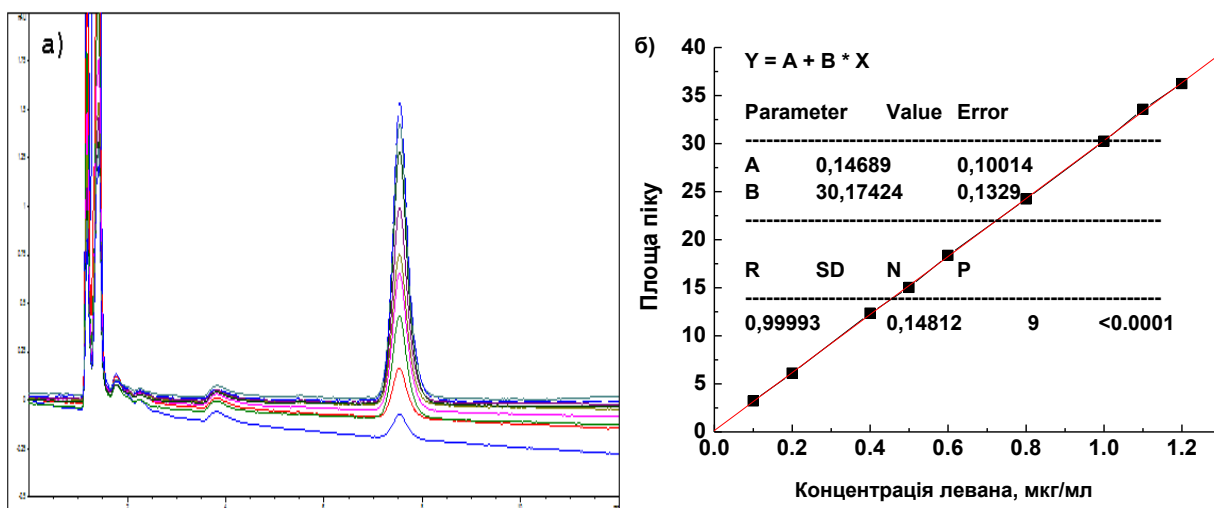


Рисунок 4.22. Хроматограми модельних розчинів левана (а) та градувальний графік (б) для його визначення

Ривастигміну гідротартрат

Хроматографування проводять за таких умов:

- колонка з нержавіючої сталі розміром 0,15 м × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії типу Zorbax Eclipse XDB-C18 з розміром часток 5 мкм;
- рухома фаза: фосфатний буферний розчин: метанол (30:70);
- швидкість рухомої фази: 1,8 мл/хв;
- температура колонки: 25 °С;
- об'єм інжекції: 20,0 мкл;
- детектування за довжини хвилі: 214 нм;
- час хроматографування: 5 хв.

Градувальний графік

Розчин РСЗ ривастигміну гідротартрату. 50,0 мг РСЗ ривастигміну гідротартрату поміщають в мірну колбу місткістю 50,0 мл, розчиняють у 25 мл води для хроматографії доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та перемішують (1000 мкг/мл) (розчин А).

0,2 мл отриманого розчину А поміщають у мірну колбу місткістю 20,0 мл, доводять об'єм розчину до позначки водою для хроматографії та перемішують (10 мкг/мл) (розчин Б).

У мірні колби місткістю 10,0 мл поміщають по 0,5; 0,7; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 мл розчину Б та 0,1; 0,3 та 0,5 мл розчину А РСЗ ривастигміну гідротартрату та доводять до позначки водою для хроматографії, отримуючи розчини з вмістом РГ 0,5; 0,7; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 10,0; 30,0 та 50,0 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок. 4.23, а) будують градувальний графік (рисунок 4.23, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій РГ (мкг/мл), а по осі ординат – значення площ піків ривастигміну.

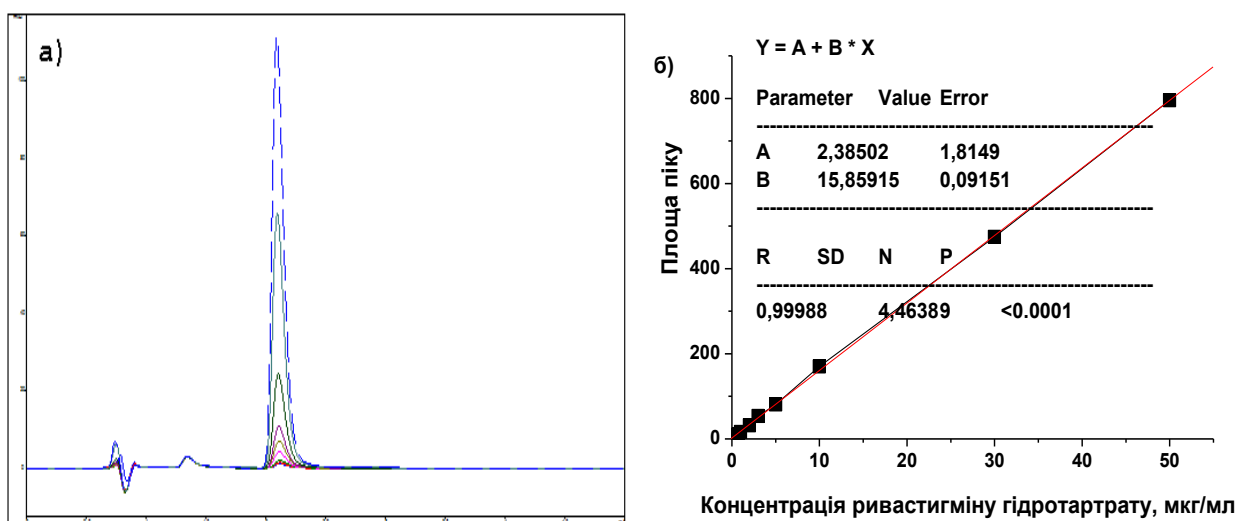
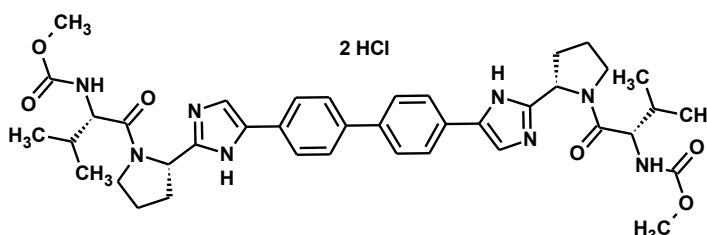


Рисунок 4.23. Хроматограми модельних розчинів РГ (а) та градувальний графік (б) для його визначення

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій РГ 0,5 – 50,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Даклатасвіру дигідрохлорид (метил [(2S)-1-{(2S)-2-[4-(4'-{2-[(2S)-1-{(2S)-2-[(метоксикарбоніл)аміно]-3-метилбутаноіл]-2піролідиніл]-1H-імідазол-4-іл}-4-біфеніліл]-1H-імідазол-2-іл]-1-піролідиніл}-3-метил-1-оксо-2-бутаніл]карбамат дигідрохлорид) – показаний для лікування інфекції хронічного гепатиту С:



Буферний розчин. 6,8 г калію дигідрофосфату поміщають у мірну колбу місткістю 1000,0 мл, розчиняють в 900 мл води для хроматографії, доводять рН до 3,0 за допомогою фосфорної кислоти, доводять об'єм розчину водою для хроматографії до позначки та перемішують.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

– колонка з нержавіючої сталі розміром 0,25 м × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії типу Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ з розміром часток 5 мкм;

– рухома фаза А: ацетонітрил : буферний розчин (30:70 об/об) (50 %); рухома фаза В: метанол (50 %);

– швидкість рухомої фази: 1,5 мл/хв;

– температура колонки: 30 °С;

– час хроматографування: 5 хв;

– детектування за довжини хвилі: 306 нм;

– об'єм інжекції: 100 мкл.

Градувальний графік

Розчин РСЗ даклатавіру дигідрохлориду. 50,0 мг РСЗ даклатавіру дигідрохлориду поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 80 мл метанолу, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та перемішують.

5,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл, доводять об'єм розчину до позначки 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти та перемішують (50 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 100,0 мл поміщають по 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,7; 1,0; 2,0; 5,0 та 10,0 мл розчину РСЗ даклатавіру дигідрохлориду та доводять до позначки 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти, отримуючи розчини з вмістом даклатавіру дигідрохлориду 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,35; 0,5; 1,0; 2,5 та 5,0; мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.24, а) будують градувальний

графік (рисунок 4.24, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій даклатасвіру дигідрохлориду, в мкг/мл, а по осі ординат – значення площ піків даклатасвіру.

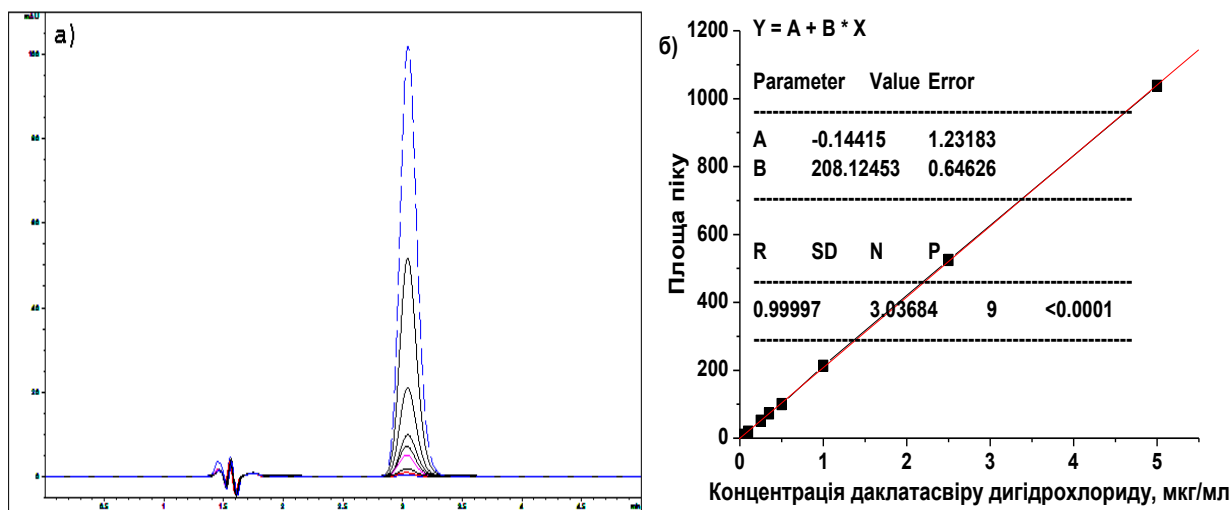
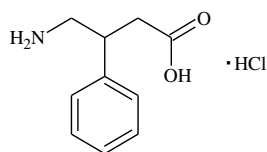


Рисунок 4.24. Хроматограми модельних розчинів даклатасвіру дигідрохлориду (а) та градувальний графік (б) для його визначення

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій даклатасвіру дигідрохлориду 0,025 – 5,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Фенібут (4-аміно-3-фенілбутанової кислоти гідрохлорид) – проявляє ноотропну активність, зменшує напруженість, тривогу, поліпшує сон:



Розчин калію дигідрофосфату. 3,4 г калію дигідрофосфату поміщають у мірну колбу місткістю 1000,0 мл, розчиняють в 900 мл води для хроматографії, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

– колонка з нержавіючої сталі розміром 0,15 м × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії типу Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ з розміром часток 5 мкм;

– рухома фаза: 800 мл розчину калію дигідрофосфату поміщають в конічну колбу місткістю 2000 мл та розчиняють 2,0 г натрію гексансульфонату, додають 200 мл метанолу, 2,0 мл триетиламіну та перемішують, доводять рН до 6,0 за допомогою кислоти фосфорної;

- швидкість рухомої фази: 1,3 мл/хв;
- температура колонки: 25 °С;
- час хроматографування: 5 хв;
- детектування за довжини хвилі: 210 нм;
- об'єм інжекції: 100 мкл.

Градувальний графік

Розчин РСЗ фенібуту. 100,0 мг РСЗ фенібуту поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 75 мл 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та перемішують.

1,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину до позначки 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти та перемішують (10 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 50,0 мл поміщають по 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0; 7,5; 10,0; 11,0 та 12,0 мл розчину РСЗ фенібуту та доводять до позначки 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти, отримуючи розчини з вмістом фенібуту 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,2 и 2,4 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.25, а) будують градувальний графік (рисунок 4.25, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій фенібуту, в мкг/мл, а по осі ординат – значення площ піків.

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій фенібуту 0,1 – 2,4 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

4.2.2 ВЕРХ визначення деяких АФІ після виробництва багатокомпонентних препаратів

При розробці методик аналізу залишкових кількостей АФІ для

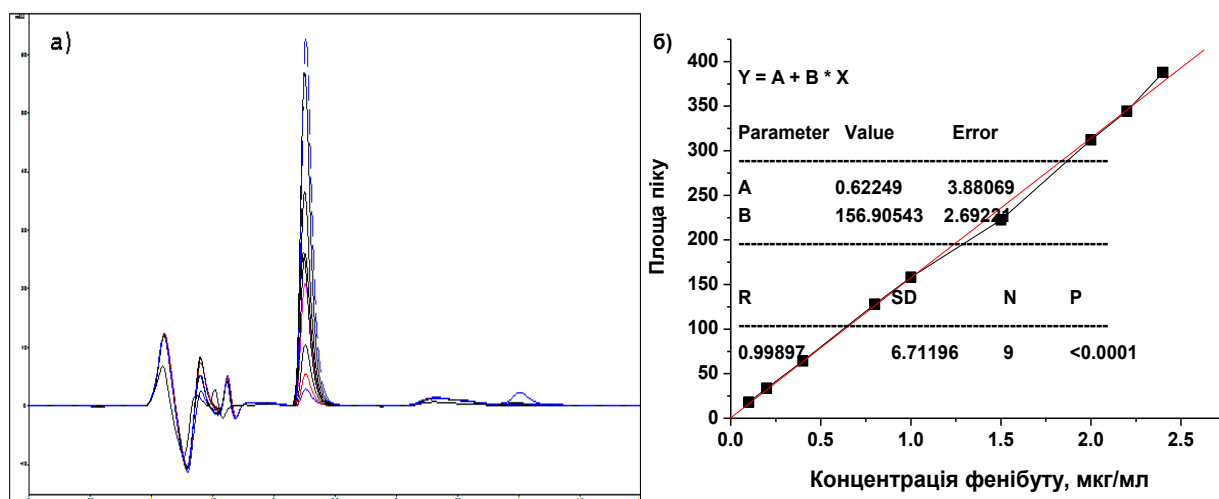
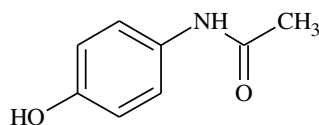


Рисунок 4.25. Хроматограми модельних розчинів фенібуту (а) та градувальний графік (б) для його визначення

багатокомпонентних препаратів, окремі сполуки яких можуть бути присутніми на поверхнях частин обладнання, оптимізацією умов хроматографування забезпечений вихід з колонки усіх компонентів, мінімізований час аналізу. В якості визначаємого АФІ обрали мажорний компонент, у якого найгірша розчинність.

При одночасному визначенні декількох ЛП застосовували трьох- або навіть чотирьохкомпонентні рухомі фази, які склалися з метанолу, ацетонітрилу, буферу та алкіламінів, в ізократичному та градієнтному режимах елюювання. Методом ВЕРХ розроблені методики визначення залишкових кількостей мажорних компонентів після очищення фармацевтичного обладнання, на якому виробляються багатокомпонентні лікарські форми (таблетки, саше). Вміст препаратів представлений у таблиці 4.2.

Парацетамол (N-(4-гідроксифеніл)ацетамід) – це анальгетик та антипіретик (знеболювальний та жарознижувачий засіб):



В змивах після виробництва препарату АМІЦИТРОН[®], порошок для орального розчину по 23,0 г у саше, визначали парацетамол.

Таблиця 4.2

Вміст багатокомпонентних препаратів, для яких розроблені методики ВЕРХ-визначення

Препарат	АФІ
АМІЦИТРОН [®] , порошок для орального розчину по 23,0 г у саше	<i>парацетамол</i> 500 мг фенілефрину гідрохлорид 10 мг феніраміну малеат 20 мг
АМІЦИТРОН [®] ПЛЮС від кашлю, порошок для орального розчину по 5,0 г	<i>парацетамол</i> 500 мг <i>гвайфенезин</i> 200 мг фенілефрину гідрохлорид 10 мг
ТЕОФЕДРИН ІС [®] , таблетки	<i>парацетамол</i> 200 мг <i>теофілін</i> безводний 100 мг кофеїн безводний 50 мг ефедрину гідрохлорид 20 мг фенобарбітал 20 мг цитизин 0,1 мг
АМІЦИТРОН [®] ЕКСТРАТАБ, таблетки, вкриті плівковою оболонкою	<i>парацетамол</i> 650 мг фенілефрину гідрохлорид 10 мг хлорфеніраміну малеат 4 мг
ПЕНТАЛГІН ІС [®] , таблетки	метамізол натрію 300 мг <i>парацетамол</i> 200 мг кофеїн-бензоат натрію 50 мг фенобарбітал 10 мг кодеїну фосфат 9,5 мг
АМІЛАР ІС таблетки для розсмоктування	<i>деквалінію хлорид</i> 0,25 мг <i>цинхокаїну гідрохлорид</i> 0,03 мг
АНДИФЕН ІС, таблетки	<i>метамізол натрію</i> моногідрат 250 мг фенобарбітал 20 мг папаверину гідрохлорид 20 мг бендазолу гідрохлорид 20 мг
ВСАА смарт, таблетки жувальні зі смаком апельсину	<i>L-лейцин</i> 1000,0 мг <i>L-ізолейцин</i> 500,0 мг <i>L-валін</i> 500,0 мг
РЕГІСОЛ ІС порошок для орального розчину по 18,9 г у саше	натрію хлорид 3,5 г калію хлорид 2,5 г натрію цитрат 2,9 г <i>глюкоза безводна</i> 10,0 г

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

– колонка з нержавіючої сталі розміром 4,6 мм × 50 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії типу Poroshell 120 SB

C-18 з розміром часток 2,7 мкм;

– рухома фаза А: фосфатний буферний розчин рН 6,0;

– рухома фаза В: ацетонітрил;

– швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;

– температура колонки: 30 °С;

– детектування за довжини хвилі: 215 нм – протягом перших 1,5 хв, за довжини хвилі 280 нм – протягом наступних 2,0 хв, далі за довжини хвилі 215 нм – протягом наступних 3,5 хв;

– час хроматографування: 5,2 хв;

– об'єм інжекції: 100 мкл.

Використовують таку програму градієнту:

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)	Примітка
0 – 4,0	95→40	5→60	Лінійний градієнт
4,0 – 5,2	40→95	60→5	Лінійний градієнт
Post time 2 хв			

Фосфатний буферний розчин рН 6,0. 5,44 г калію дигідрофосфату поміщають в мірну колбу місткістю 1000,0 мл, розчиняють в 900 мл води для хроматографії, доводять 0,5 М розчином калію гідроксиду до рН 6,0 ± 0,1 та доводять об'єм водою для хроматографії до позначки, перемішують.

0,5 М розчин калію гідроксиду. 500 мл 1 М розчину калію гідроксиду поміщають в мірну колбу місткістю 1000,0 мл та доводять об'єм розчину водою для хроматографії до позначки.

Градувальний графік

Розчин РСЗ парацетамолу. 0,050 г РСЗ парацетамолу поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 50 мл води для хроматографії, перемішують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником. 4,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм до позначки водою для хроматографії та перемішують (20,0 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 10,0 мл поміщають по 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0;

2,5; 7,5; 10,0 мл розчину РСЗ парацетамолу та доводять до позначки водою для хроматографії, отримуючи розчини з вмістом парацетамолу 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 5,0; 15,0 та 20,0 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.26, а) будують градувальний графік (рисунок 4.26, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій парацетамолу (мкг/мл), а по осі ординат – значення площ піків.

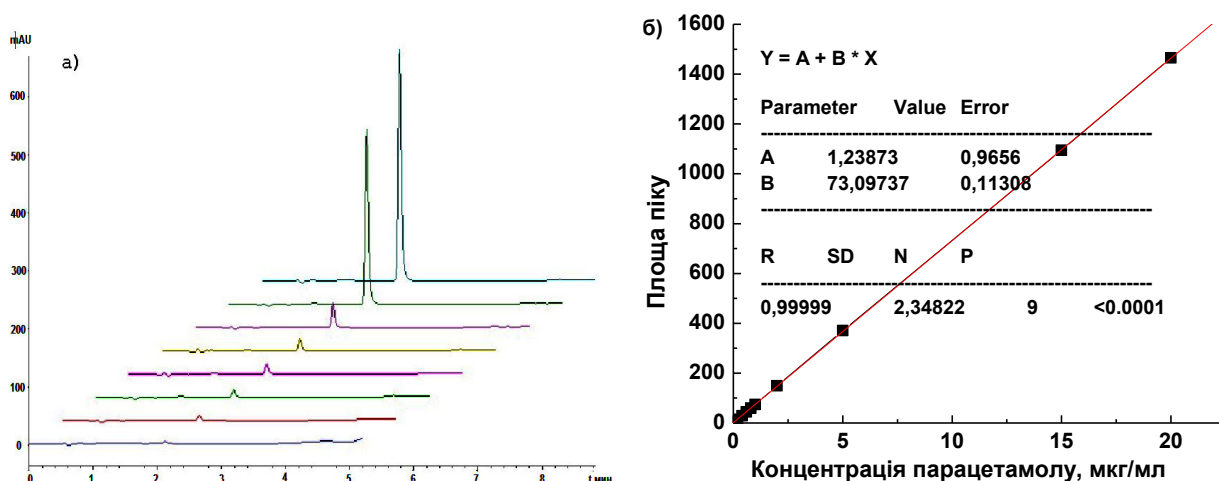
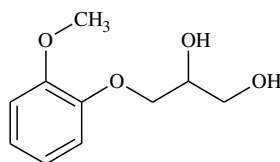


Рисунок 4.26. Хроматограми модельних розчинів парацетамолу (а) та градувальний графік для його визначення (б)

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій парацетамолу 0,2 – 20,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Парацетамол, гвайфенезин

В змивах після виробництва препарату АМЦИТРОН® ПЛЮС від кашлю визначали парацетамол, додатково – другий мажорний компонент гвайфенезин ((RS)-3-(2-метоксіфеноксі)пропан-1,2-діол), який знижує в'язкість мокротиння та полегшує його відходження шляхом стимуляції секреції компонентів бронхіального слизу:



Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

– колонка з нержавіючої сталі розміром 4,6 мм x 100 мм, заповнена

силікагелем октадецилсилільним для хроматографії типу Zorbax Eclipse Plus C₁₈ з розміром часток 3,5 мкм;

- рухома фаза А: фосфатний буферний розчин рН 6,0;
- рухома фаза В: метанол;
- швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;
- температура колонки: 30 °С;
- детектування за довжини хвилі: 215 нм – протягом перших 2,3 хв, далі за довжини хвилі 280 нм – протягом наступних 2,7 хв;
- час хроматографування: 5 хв;
- об'єм інжекції: 50 мкл.

Використовують таку програму градієнту:

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 – 2,0	85→50	15→50
2,0 – 2,2	50→40	50→60
2,2 – 5,0	40→35	60→65
Post time 1,5 хв		

Розчин для пробопідготовки. Змішують 700 мл води для хроматографії та 300 мл метанолу, охолоджують.

Фосфатний буферний розчин рН 6,0. 5,44 г калію дигідрофосфату поміщають у мірну колбу місткістю 1000,0 мл, розчиняють в 900 мл води для хроматографії, доводять 0,5 М розчином калію гідроксиду до рН 6,0 ± 0,1 та доводять об'єм водою для хроматографії до позначки, перемішують.

0,5 М розчин калію гідроксиду. 500 мл 1 М розчину калію гідроксиду поміщають у мірну колбу місткістю 1000,0 мл та доводять об'єм розчину водою для хроматографії до позначки.

Градувальний графік

Розчин РСЗ парацетамолу та гвайфенезину. 0,500 г РСЗ парацетамолу,

0,200 г РСЗ гвайфенезину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 50 мл розчину для пробопідготовки, перемішують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником.

1,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм до позначки розчином для пробопідготовки та перемішують (50,0 мкг/мл парацетамолу; 20,0 мкг/мл гвайфенезину).

У мірні колби місткістю 100,0 мл поміщають по 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,0; 2,0; 5,0 та 10,0 мл розчину РСЗ парацетамолу та гвайфенезину, доводять об'єми до позначки розчином для пробопідготовки, отримуючи розчини з вмістом парацетамолу (гвайфенезину) 0,05 мкг/мл (0,02 мкг/мл), 0,1 мкг/мл (0,04 мкг/мл), 0,15 мкг/мл (0,06 мкг/мл), 0,25 мкг/мл (0,1 мкг/мл), 0,35 мкг/мл (0,14 мкг/мл), 0,45 мкг/мл (0,18 мкг/мл), 0,5 мкг/мл (0,2 мкг/мл), 1,0 мкг/мл (0,4 мкг/мл), 2,5 мкг/мл (1,0 мкг/мл) та 5,0 мкг/мл (2,0 мкг/мл), відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.27) будують градувальні графіки (рисунок 4.28), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій парацетамолу та гвайфенезину в мкг/мл, а по осі ординат – значення площ піків парацетамолу та гвайфенезину, відповідно.

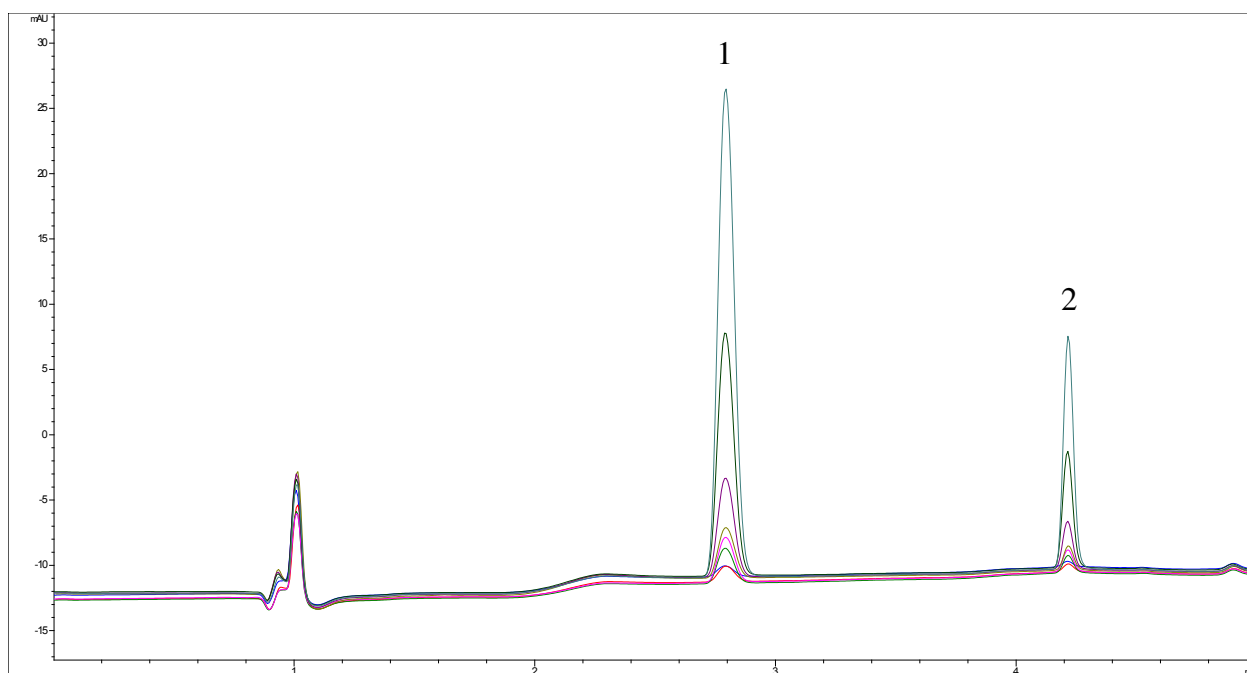


Рисунок 4.27. Хроматограми модельних розчинів РСЗ парацетамолу та гвайфенезину (1 – парацетамол; 2 – гвайфенезин)

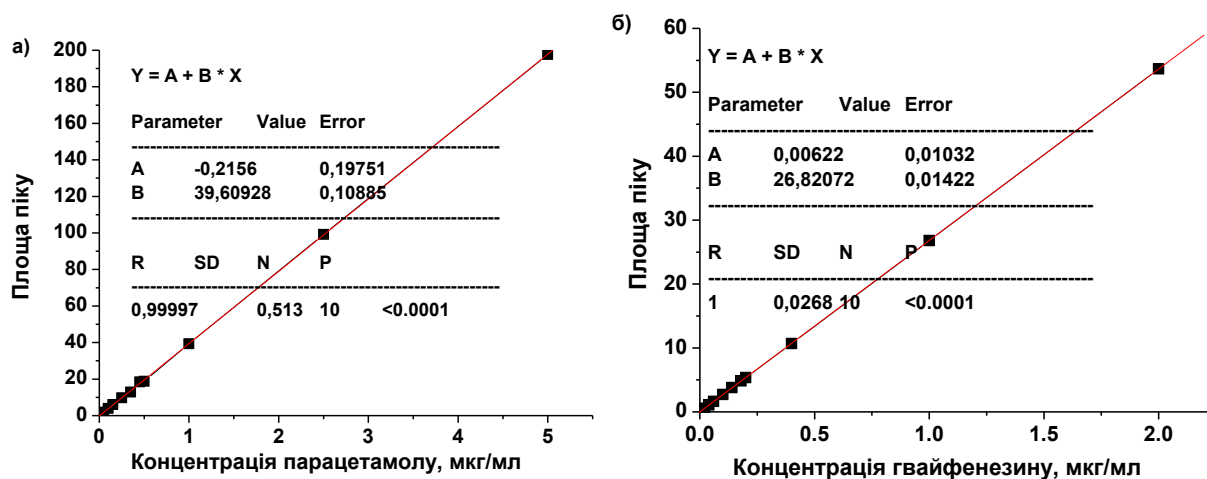
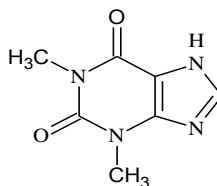


Рисунок 4.28. Градувальні графіки для визначення парацетамолу (а) та гвайфенезину (б)

Градувальні графіки лінійні в інтервалах концентрацій парацетамолу 0,05 – 5,0 мкг/мл та гвайфенезину 0,02 – 2,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Парацетамол, теофілін

В змивах після виробництва препарату ТЕОФЕДРИН ІС[®] визначали парацетамол, додатково – другий мажорний компонент теофілін (1,3-диметил-7Н-пурін-2,6-діон), який збуджує центральну нервову систему, розширює судини серця, мозку, а також бронхи:



Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

– колонка з нержавіючої сталі розміром 0,15 м × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії типу Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ з розміром часток 5 мкм;

– рухома фаза А: розчин кислоти фосфорної: метанол: триетиламін (800:200:17); рухома фаза В: метанол;

– швидкість рухомої фази: 2,0 мл/хв;

– температура колонки: 30 °С;

- об'єм інжекції: 100 мкл;
- детектування за довжини хвилі 212 нм – протягом перших 5 хв та за довжини хвилі 220 нм – протягом наступних 5 хв.

Використовують таку програму градієнту:

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)
0 – 4,5	100	0
4,5 – 5,0	100 → 80	0 → 20
5,0 – 10,0	80	20
Post time – 2 хв		

Розчин для пробопідготовки. Змішують 700 мл води для хроматографії та 300 мл метанолу, охолоджують.

Розчин кислоти фосфорної. 16,7 г кислоти фосфорної поміщають у мірну колбу місткістю 1000,0 мл, доводять об'єм водою для хроматографії до позначки та перемішують.

Градувальний графік

Розчин РСЗ парацетамолу, теофіліну. 0,050 г РСЗ парацетамолу, 0,050 г РСО теофіліну безводного поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл, додають 25 мл розчину для пробопідготовки, перемішують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником.

1,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм до позначки розчином для пробопідготовки та перемішують (10,0 мкг/мл парацетамолу; 10,0 мкг/мл теофіліну).

У мірні колби місткістю 10,0 мл поміщають по 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,5; 5,0 та 10,0 мл розчину РСЗ парацетамолу, теофіліну та доводять об'єми до позначки розчином для пробопідготовки, отримуючи розчини з вмістом парацетамолу та теофіліну 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,5; 5,0 та 10,0 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.29) будують градувальні графіки (рисунок 4.30), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій парацетамолу та теофіліну (мкг/мл), а по осі ординат – значення площ піків парацетамолу та теофіліну, відповідно.

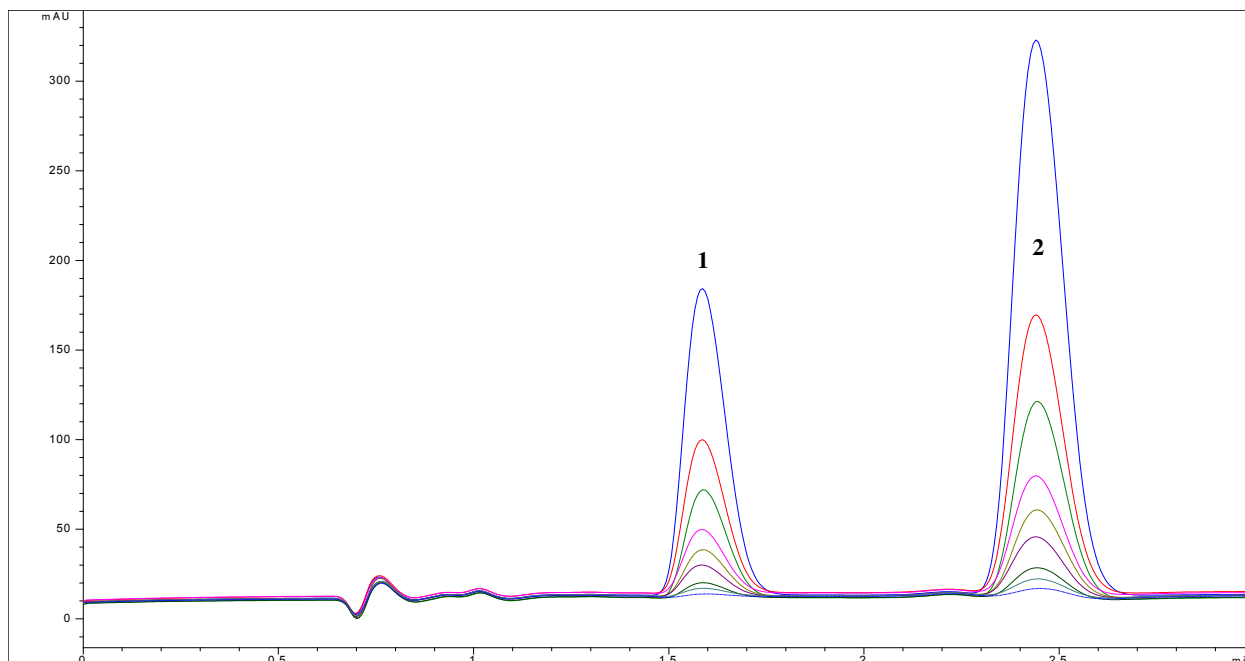


Рисунок 4.29. Хроматограми модельних розчинів РСЗ парацетамолу та теофіліну (1 – парацетамол; 2 – теофілін)

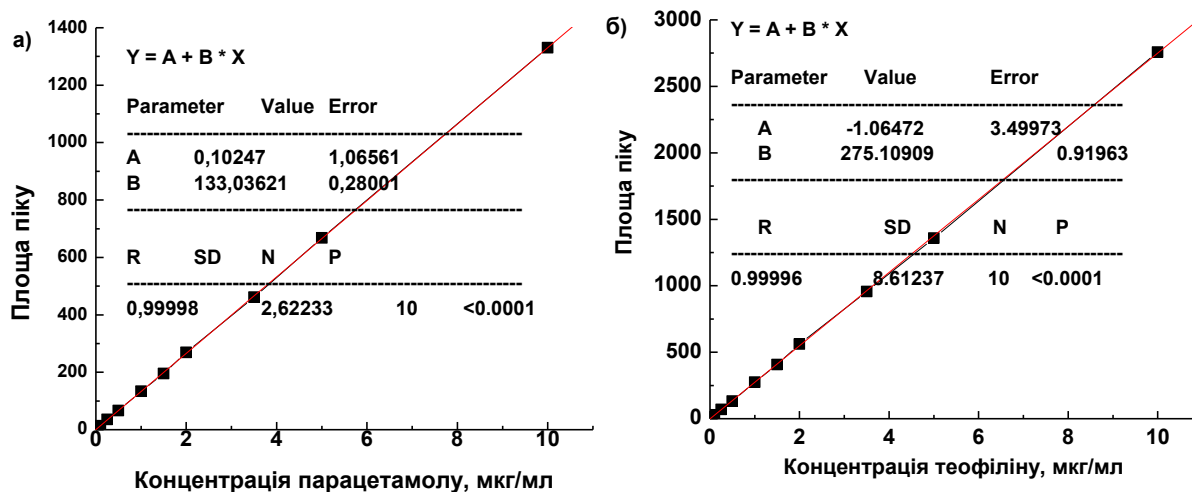


Рисунок 4.30. Градувальні графіки для визначення парацетамолу (а) та теофіліну (б)

Градувальні графіки лінійні в інтервалах концентрацій парацетамолу 0,05 – 10,0 мкг/мл та теофіліну 0,05 – 10,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Парацетамол

В змивах після виробництва препарату АМЦИТРОН® ЕКСТРАТАБ, таблетки, вкриті плівковою оболонкою, визначали парацетамол.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка з нержавіючої сталі розміром 0,15 м × 4,6 мм Discovery HS PEG з розміром часток 5 мкм;
- рухома фаза: фосфатний буферний розчин рН 6,0: ацетонітрил (70:30);
- температура колонки: 30 °С;
- об'єм інжекції: 100 мкл;
- детектування за довжини хвилі 215 нм.

Використовують таку програму градієнту:

Час (хв)	Швидкість рухомої фази, мл/хв
0 – 5,5	1
5,5 – 6,0	1 → 2
6,0 – 10,0	2

Фосфатний буферний розчин рН 6,0. 2,30 г кислоти фосфорної поміщають у мірну колбу місткістю 1000,0 мл, додають 900 мл води, доводять 1 М розчином натрію гідроксиду до рН $6,0 \pm 0,1$, доводять водою до позначки та перемішують.

Градувальний графік

Розчин РСЗ парацетамолу. 0,015 г РСЗ парацетамолу поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл рухомої фази, перемішують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником.

10,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм до позначки рухомою фазою та перемішують (15,0 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 100,0 мл поміщають по 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 та 50,0 мл розчину РСЗ парацетамолу та доводять об'єми до позначки рухомою фазою, отримуючи розчини з вмістом парацетамолу 0,015; 0,075; 0,15; 0,3; 0,75; 1,5 та 7,5 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.31, а) будують градувальний графік (рисунок 4.31, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій парацетамолу (мкг/мл), а по осі ординат – значення площ піків.

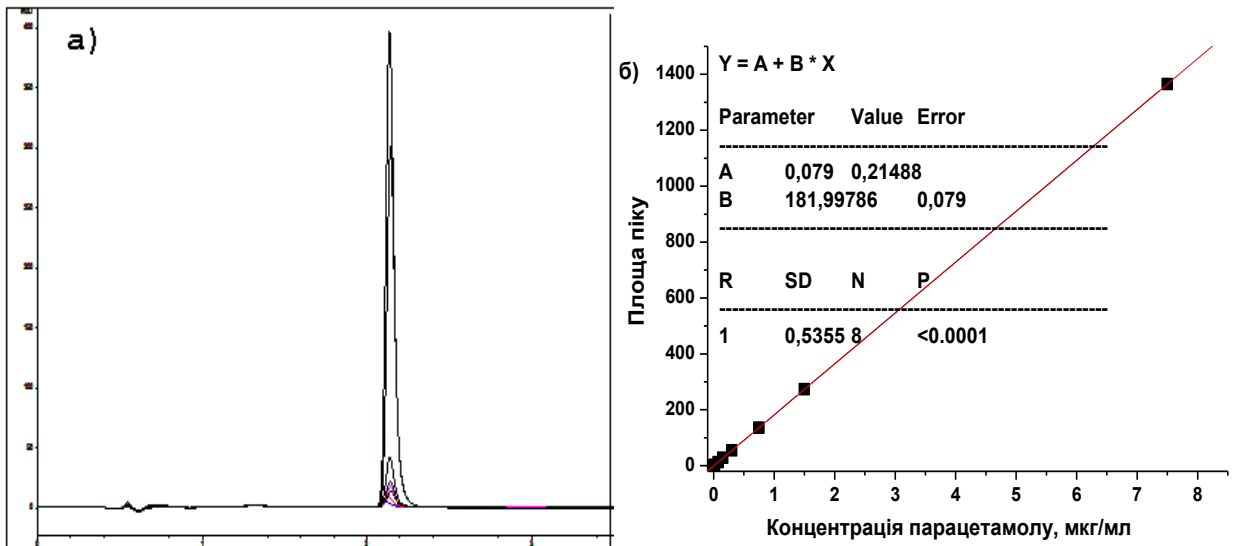


Рисунок 4.31. Хроматограми модельних розчинів парацетамолу (а) та градуювальник графік для його визначення (б)

Градуювальні графіки лінійні в інтервалах концентрацій парацетамолу 0,015 – 7,5 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Парацетамол

В змивах після виробництва препарату ПЕНТАЛГІН ІС[®], таблетки, визначали парацетамол.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

– колонка з нержавіючої сталі розміром 0,15 м × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії типу Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ з розміром часток 5 мкм;

– рухома фаза А: рочин фосфорної кислоти : метанол : триетиламін (800:200:17);

– рухома фаза В: метанол;

– температура колонки: 30 °С;

– швидкість рухомої фази: 2,0 мл/хв;

– об'єм інжекції: 100 мкл;

– детектування за довжини хвилі: 205 нм.

Використовують таку програму градієнту:

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)	Примітка
0 – 4,7	100	0	Ізократичний режим
4,7 – 5,7	100→75	0→25	Лінійний градієнт
5,7 – 9	75	25	Ізократичний режим
9 – 10	75→100	25→0	Лінійний градієнт
10 – 12	100	0	(Post time)

Розчин кислоти фосфорної. 16,7 г кислоти фосфорної поміщають в мірну колбу місткістю 1000,0 мл, доводять водою до позначки та перемішують.

Розчин параформальдегіду та натрію метабісульфіту. 10 г параформальдегіду та 25 г натрію метабісульфіту поміщають в мірну колбу місткістю 1000,0 мл, розчиняють у воді при сильному нагріванні, охолоджують, доводять водою до позначки та перемішують.

Розчин для пробопідготовки. Розчин параформальдегіду та натрію метабісульфіту : метанол (70:30).

Градувальний графік

Розчин РСЗ парацетамолу. 0,050 г РСЗ парацетамолу поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл, додають 30 мл розчину для пробопідготовки, перемішують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником.

0,5 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл, доводять об'єм до позначки розчином для пробопідготовки та перемішують (10,0 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 10,0 мл поміщають по 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 3,5; 5,0 та 10,0 мл розчину РСЗ парацетамолу та доводять об'єми до позначки розчином для пробопідготовки, отримуючи розчини з вмістом парацетамолу 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 3,5; 5,0; 10,0 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.32, а) будують градувальний графік (рисунок 4.32, б), відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій парацетамолу (мкг/мл), а по осі ординат – значення площ піків.

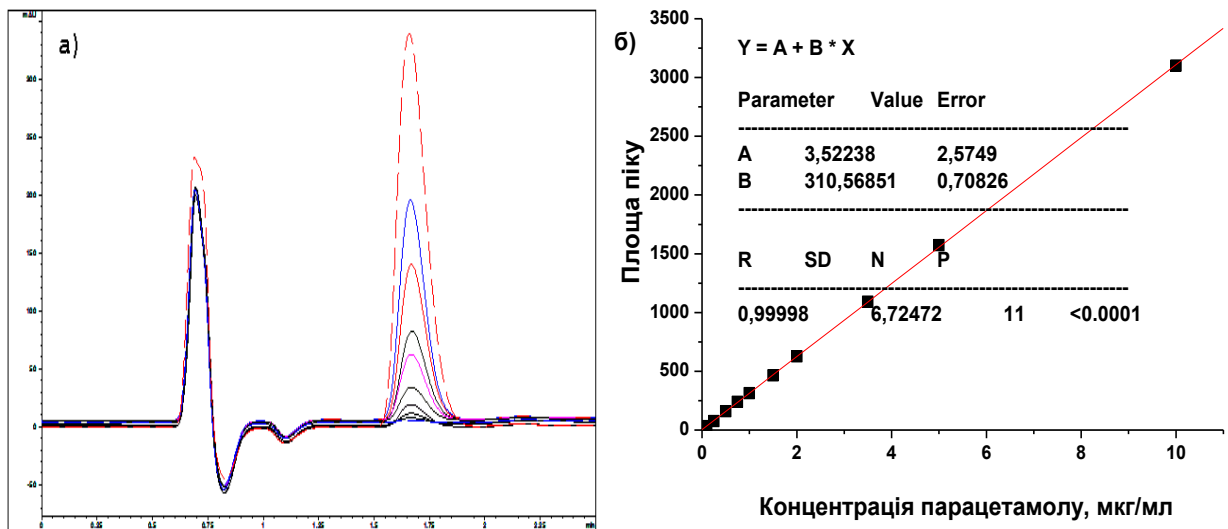
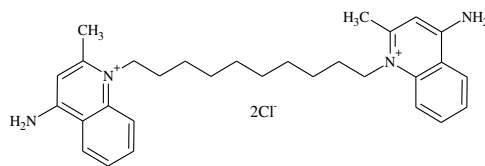


Рисунок 4.32. Хроматограми модельних розчинів парацетамолу (а) та градувальний графік для його визначення (б)

Градувальні графіки лінійні в інтервалах концентрацій парацетамолу 0,05 – 10 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Деквалінію хлорид (ДХ) (1,1'-(декан-1,10-диіл)біс(4-аміно-2-метилхінолінію) дихлорид) – ефективний щодо грамозитивних та грамнегативних мікроорганізмів, грибів, вірусів. Має протизапальну та гемостатичну дію. Застосовують при лікуванні запальних процесів в порожнині рота і глотки:



Оптимізовані умови хроматографування: рухома фаза А: 2,0 г натрію гексансульфонату поміщають у мірну склянку місткістю 2000 мл, розчиняють у 300 мл води для хроматографії, доводять до рН 4,0 кислотою оцтовою, додають 700 мл метанолу; рухома фаза В: метанол; швидкість рухомої фази: 2,0 мл/хв; температура колонки: 25°C; час хроматографування 4 хв; детектування за довжини хвилі 240 нм; об'єм інжекції 100 мкл; колонка з нержавіючої сталі розміром 0,25 м × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії типу Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ з розміром часток 5 мкм.

Визначення проводять у градієнтному режимі за наступною програмою:

Час, хв	Рухома фаза А %, об/об	Рухома фаза В %, об/об
0→5	100	0
5→5,1	100→70	0→30
5,1→10	70	30

Розчин для пробопідготовки. 700 мл метанолу змішують з 300 мл води для хроматографії, перемішують та охолоджують до кімнатної температури.

Градувальний графік

Розчин РСЗ деквалінію хлориду. 100,0 мг РСЗ ДХ поміщають в мірну колбу місткістю 200,0 мл, додають 150 мл розчину для пробопідготовки, перемішують на магнітній мішалці при нагріванні (40 °С), охолоджують та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником. 0,5 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 50,0 мл, доводять об'єм до позначки розчином для пробопідготовки та перемішують (5,0 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 10,0 мл поміщають по 0,1; 0,2; 0,3; 0,6; 0,7; 0,8; 1,0 та 1,5 мл отриманого розчину РСЗ ДХ та доводять до позначки розчином для пробопідготовки, отримуючи розчини з вмістом ДХ 0,05; 0,10; 0,15; 0,30; 0,35; 0,40; 0,50 та 0,75 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.33) будують градувальний графік, відкладаючи по осі абсцис значення концентрацій деквалінію хлориду, у відсотках від ГДК, а по осі ординат – нормалізовані значення площ піків (рисунок 3.1).

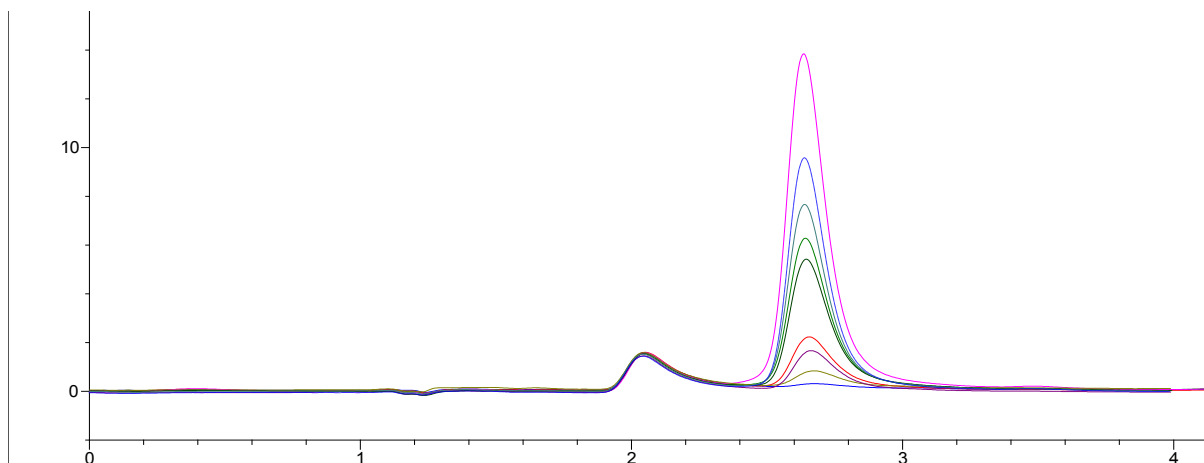
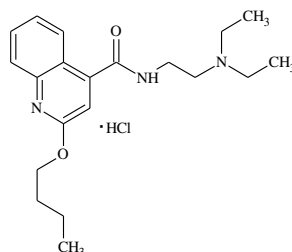


Рисунок 4.33. Хроматограми розчинів деквалінію хлориду

Цинхокаїну гідрохлорид (ЦГ) (2-бутокси-N-[2-(диетиламіно)етил]-хінолін-4-карбоксамід гідрохлорид) – механізм дії зумовлений блокадою чутливих нервових закінчень у шкірі або слизових оболонках, застосовується головним чином для поверхневої анестезії, оскільки є одним із найбільш сильних і токсичних місцевих анестетиків:



ЦГ

Для методики визначення цинхокаїну методом ВЕРХ з спектрофотометричним детектором мінімальна концентрація, яка може бути знайдена, складає 0,04 мкг/мл, що становить 67 % від ГДК. Таким чином, вимога до чутливості методу в цьому випадку не виконується, таким чином даний метод детектування сигналу не дозволяє проводити кількісне визначення залишку цинхокаїну гідрохлориду (ЦГ) на поверхні фармообладнання. Одним з методів детектування з більш високою чутливістю та специфічністю є мас-спектрометрія. Нами розроблена методика високочутливого визначення слідових кількостей ЦГ в змивах з поверхонь фармацевтичного обладнання після його очищення з використанням методу рідинної хромато-мас-спектрометрії. Детектування ЦГ проводили за сигналом молекулярного катіона основної речовини з 344 m/z (рисунк 4.34).

Встановлено, що запропонована методика характеризується задовільною лінійністю в діапазоні концентрацій від 0,006 мкг/мл до 0,114 мкг/мл ЦГ та дозволяє отримувати правильні результати, що підтверджено статистично незначною систематичною похибкою.

Градувальний графік

Розчин РСЗ цинхокаїну гідрохлориду. Наважку 10,0 мг РСЗ ЦГ поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 30 мл води для хроматографії, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують. 1,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу

місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину водою для хроматографії до позначки та перемішують.

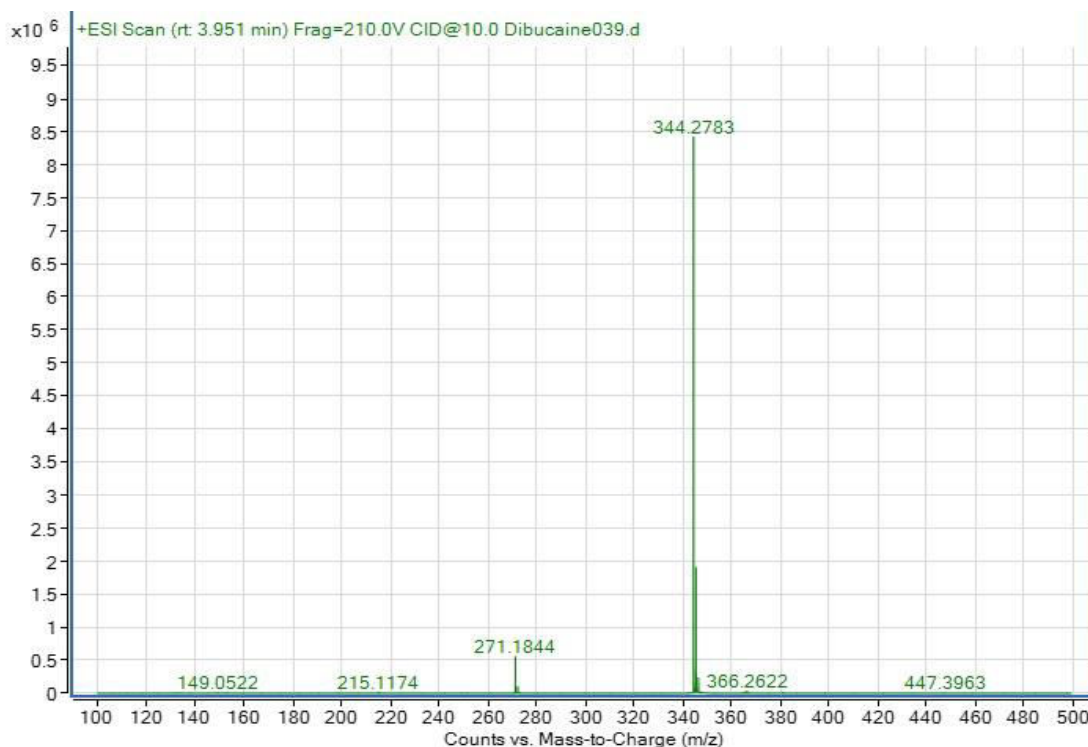


Рисунок 4.34. MS- спектр піку цинхокаїну

У мірні колби місткістю 100,0 мл поміщають по 0,60; 1,95; 3,30; 4,65; 6,00; 7,35; 8,70; 10,05 та 11,40 мл розчину РСЗ ЦГ, доводять до позначки водою для хроматографії та перемішують.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з мас-спектрометричним детектором за таких умов:

- колонка з нержавіючої сталі розміром 0,10 м × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії типу Zorbax Eclipse XDB-C18 з розміром часток 3,5 мкм;

- рухома фаза: 1 мл кислоти мурашиної змішують з 1000 мл води для хроматографії та перемішують. За допомогою розчину аміаку концентрованого доводять значення рН до 7,3. 200 мл отриманого розчину змішують з 800 мл метанолу; швидкість рухомої фази 0,50 мл/хв;

- температура колонки: 25 °С; об'єм інжекції: 100 мкл;

- мас-детектування: іонізація – електроспрей; полярність – позитивна; температура газу – 250°С; швидкість газу – 11 л/хв;

енергія – 210 В; час хроматографування: 8 хв.

Хроматографують поперемінно градувальні розчини (рисунок 4.35). Будують графік лінійної залежності площі піку масою 344 m/z від концентрації розчину (рисунок 4.36).

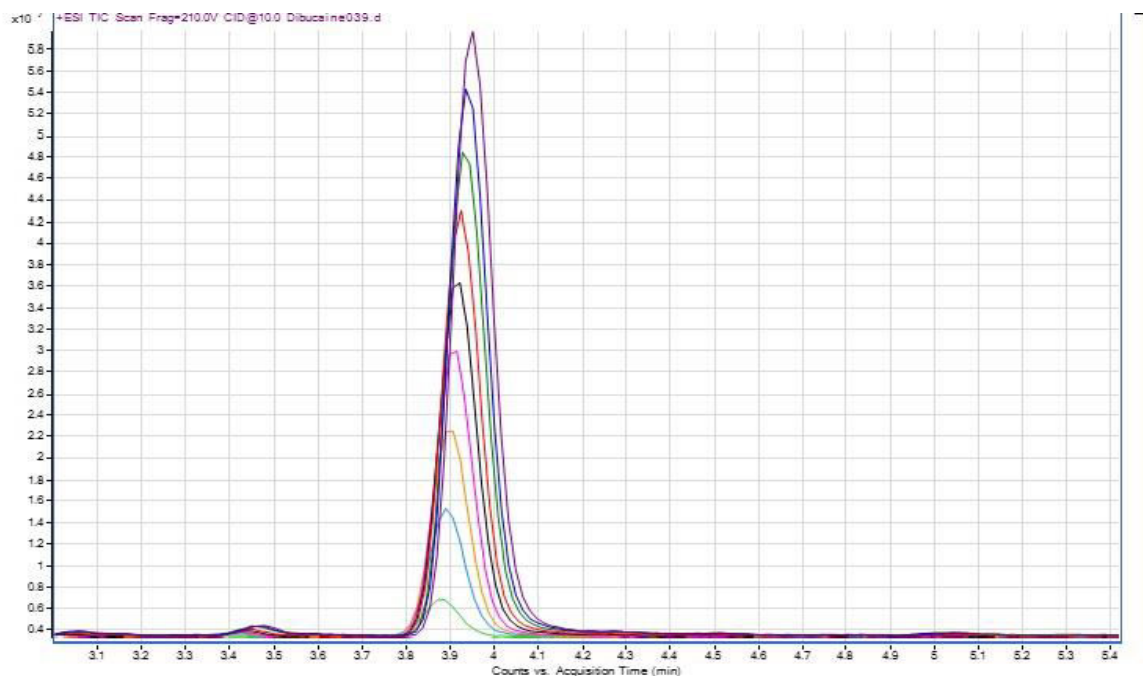


Рисунок 4.35. Хроматограми модельних розчинів ЦГ для градувального графіка

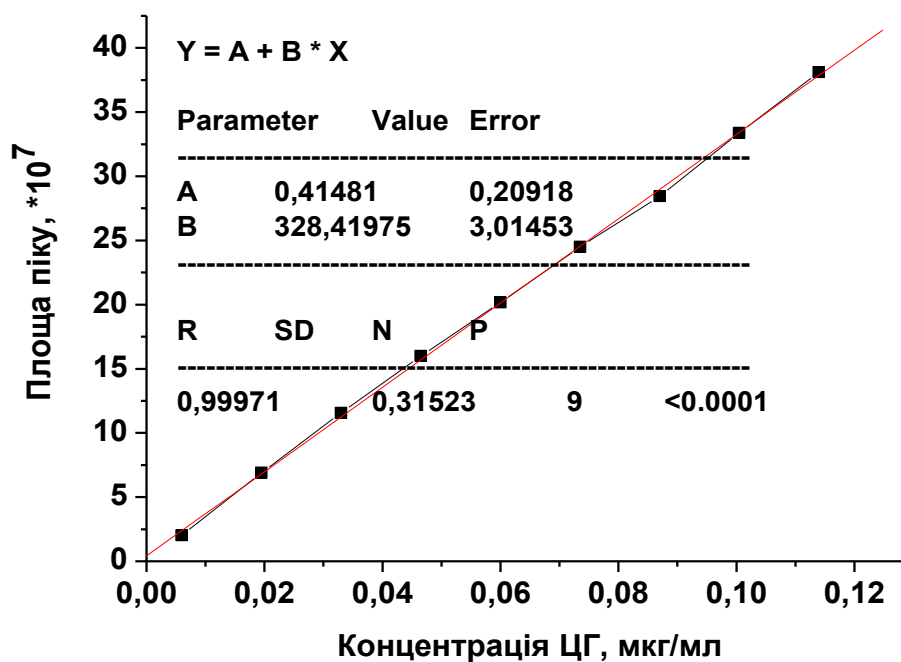
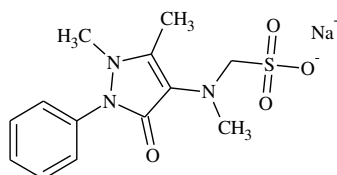


Рисунок 4.36. Градувальний графік залежності площі піку від концентрації ЦГ

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій ЦГ 0,006 мкг/мл до 0,114 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Метамізол натрію (натрію [(1,5-диметил-3-оксо-2-феніл-2,3-дигідро-1H-піразол-4-іл)-N-метиламіно]метансульфонат моногідрат) – анальгетичний ефект обумовлений інгібіцією ЦОГ та блокуванням синтезу простагландинів з арахідонової кислоти, що беруть участь у формуванні больових реакцій; має знеболювальну, жарознижувальну та протизапальну дію:



У змивах після виробництва препарату АНЦІФЕН ІС, таблетки визначали мажорний компонент метамізол натрію. Визначення проводять хроматографуванням на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

– колонка з нержавіючої сталі розміром 0,15 м × 4,6 мм, заповнена сорбентом типу Zorbax Eclipse XDB-C18 з розміром часток 5 мкм;

– рухома фаза А: 2,0 г натрію гексансульфонату поміщають у склянку місткістю 2000 мл, розчиняють у 800 мл розчину 3,4 г/л калію дигідрофосфату, додають 200 мл метанолу, перемішують, охолоджують та доводять кислотою фосфорною до рН 4,5; рухома фаза В: метанол;

– температура колонки: 30 °С; об'єм інжекції: 100 мкл;

– детектування за довжини хвилі: 240 нм – протягом перших 3,5 хв, 210 нм – наступні 2,5 хв, 240 нм – з 6,0 хв до 10,0 хв.

Використовують таку програму градієнту:

Час (хв)	Рухома фаза А (% об/об)	Рухома фаза В (% об/об)	Швидкість рухомої (мл/хв)
0 – 3,5	75	25	1,5
3,5 – 6,0	75→25	25→75	1,5→0,8
6,0 – 10,0	25	75	0,8
Post time 2 хв			

Градуювальний графік

Розчин РСЗ метамізолу натрію. 0,250 г РСЗ метамізолу натрію поміщають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 50 мл 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти, перемішують при нагріванні (70 °С) протягом 15 хв, охолоджують, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки та перемішують.

1,0 мл отриманого розчину поміщають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої до позначки та перемішують (25 мкг/мл).

У мірні колби місткістю 100,0 мл поміщають по 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 та 14,0 мл розчину РСЗ метамізолу натрію та доводять об'єми до позначки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої, отримуючи розчини з вмістом метамізолу натрію 0,025; 0,125; 0,25; 0,375; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 та 3,5 мкг/мл, відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.37, а) будують градувальний графік (рисунок 4.37, б), відкладаючи на осі абсцис значення концентрацій метамізолу натрію, в мкг/мл, а по осі ординат – значення площ піків метамізолу.

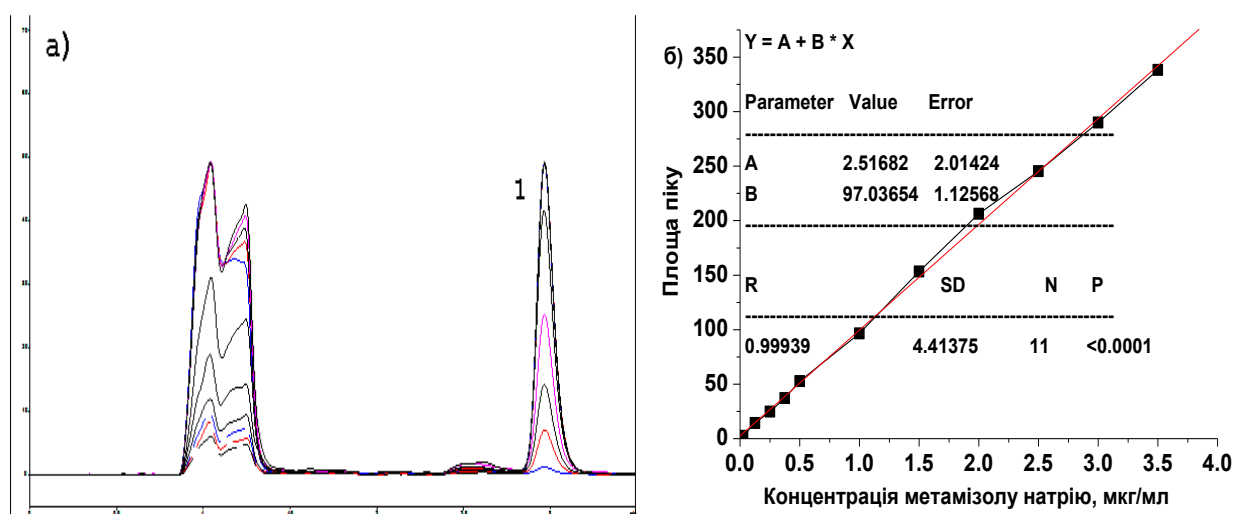
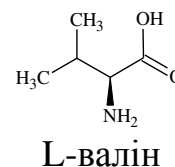
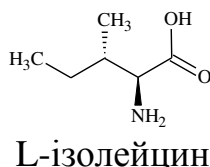
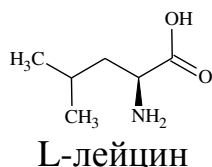


Рисунок 4.37. Хроматограми модельних розчинів метамізолу натрію (а, 1- пік метамізолу натрію) та градувальний графік для його визначення (б)

Градуювальний графік лінійний в інтервалі концентрацій метамізолу

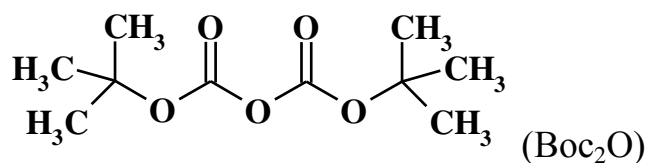
натрію 0,025 – 3,5 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

L-валін, L-лейцин та L-ізолейцин – відносяться до незамінних амінокислот (АК), виконують роль нейромедіаторів або є їх попередниками, необхідні для нормальної роботи головного мозку, а також забезпечують енергією м'язову тканину:



Відомий спосіб визначення амінокислот за допомогою методу ВЕРХ з попередньою процедурою предколоночної їх дериватизації [128] передбачає використання *o*-фталевого альдегіду (ОФА) в якості дериватизуючого агента. ОФА в присутності сульфурвмісного нуклеофілу швидко та кількісно взаємодіє з амінокислотами при кімнатній температурі. При цьому утворюються нестійкі похідні ОФА, що є недоліком даного методу. Також необхідно використовувати автосамплер приладу, який дозволяє проводити дериватизацію в автоматичному режимі внесення, розведення і змішування та спеціальну колонку Zorbax Eclipse AAA, що говорить про високу вартість обладнання та витратних матеріалів. До цього ще необхідно використовувати другий компонент – сульфурвмісний нуклеофіл (наприклад, меркаптоетанол).

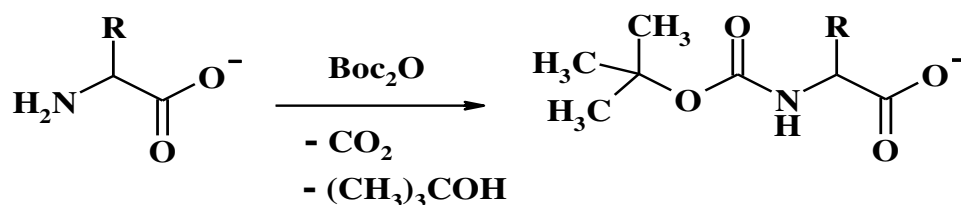
Нами розроблена проста у виконанні методика кількісного визначення амінокислот, L-валіну, L-лейцину та L-ізолейцину із застосуванням предколоночної дериватизації з реагентом, який широко використовується в органічному синтезі для захисту аміногруп – ди-трет-бутилдикарбонат (Boc_2O):



Перевага методики також полягає в тому, що для УФ детектування

використовуються традиційні хроматографічні колонки з силікагелем октадецилсилільним для хроматографії (C18).

В умовах розробленої методики пропонується проводити пробопідготовку в присутності 0,5 М розчину гідроксиду натрію. У лужному середовищі АК знаходяться в аніонній формі та реакція з Coc_2O протікає за наступною схемою:



Кількісне визначення залишкових кількостей амінокислот (L-валін, L-лейцин та L-ізолейцин) на поверхні фармацевтичного обладнання, на якому відбувалось виробництво дієтичної добавки «BCAA смарт» (ТДВ «ІНТЕРХІМ», Україна), проводили із застосуванням ВЕРХ.

Градуювальний графік

Розчин ди-трет-бутилдикарбонату. 21,90 г ди-трет-бутилдикарбонату (CAS 24424-99-5) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину ацетонітрилом до позначки та перемішують.

Розчин PC3 L-лейцину, PC3 L-валіну, PC3 L-ізолейцину. У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносять 300,0 мг PC3 L-лейцину, 150,0 мг PC3 L-валіну, 150,0 мг PC3 L-ізолейцину, розчиняють в 70 мл води для хроматографії та доводять до позначки тим самим розчинником.

У мірні колби місткістю 100,0 мл поміщають по 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 8,0 та 10,0 мл отриманого розчину, додають 2,0 мл 0,5 М розчину натрію гідроксиду, 30 мл метанолу та 1,0 мл розчину ди-трет-бутилдикарбонату, перемішують на магнітній мішалці протягом 30 хв (часу перемішування дотримуватися обов'язково). Доводять об'єм розчину метанолом до позначки та перемішують.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов:

- колонка з нержавіючої сталі розміром 0,10 м × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії з розміром часток 3,5 мкм;
- рухома фаза: суміш ацетонітрил : 0,1 % (об/об) розчин мурашиної кислоти (30:70 об/об);
- швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;
- об'єм проби, що вводиться: 10 мкл;
- детектування за довжини хвилі: 200 нм;
- температура колонки: 30 °С;
- час хроматографування: 17 хв.

Хроматографування проводять в ізократичному режимі (на рисунку 4.38 наведено хроматограми розчинів РСЗ АК для градуювальних графіків, де 1 – L-валін, 2 – L-ізолейцин, 3 – L-лейцин).

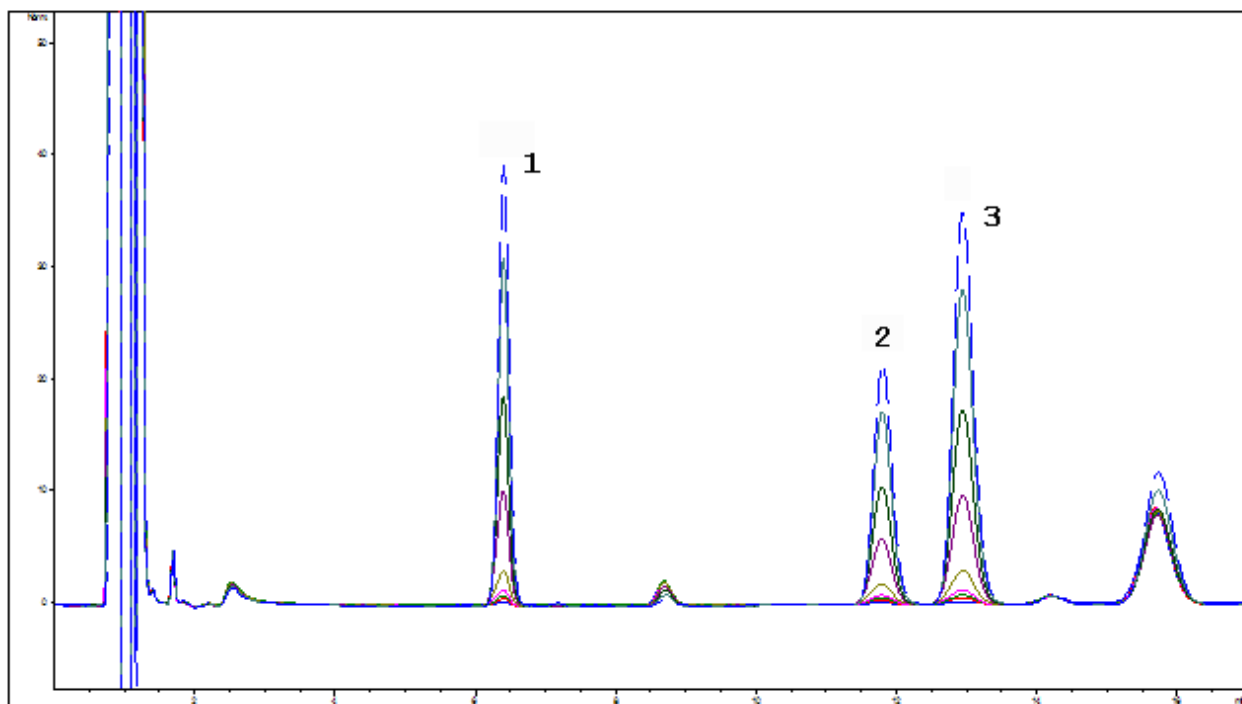


Рисунок 4.38. Хроматограми розчинів РСЗ АК для градуювальних графіків, де 1 – L-валін, 2 – L-ізолейцин, 3 – L-лейцин)

За отриманими результатами будують градуювальні графіки, відкладаючи на осі абсцис концентрації амінокислот, а по осі ординат – значення інтенсивності абсорбції за довжини хвилі 200 нм (площі піків)

Градувальні залежності площ піків від концентрації амінокислот наведено на рисунку 4.39.

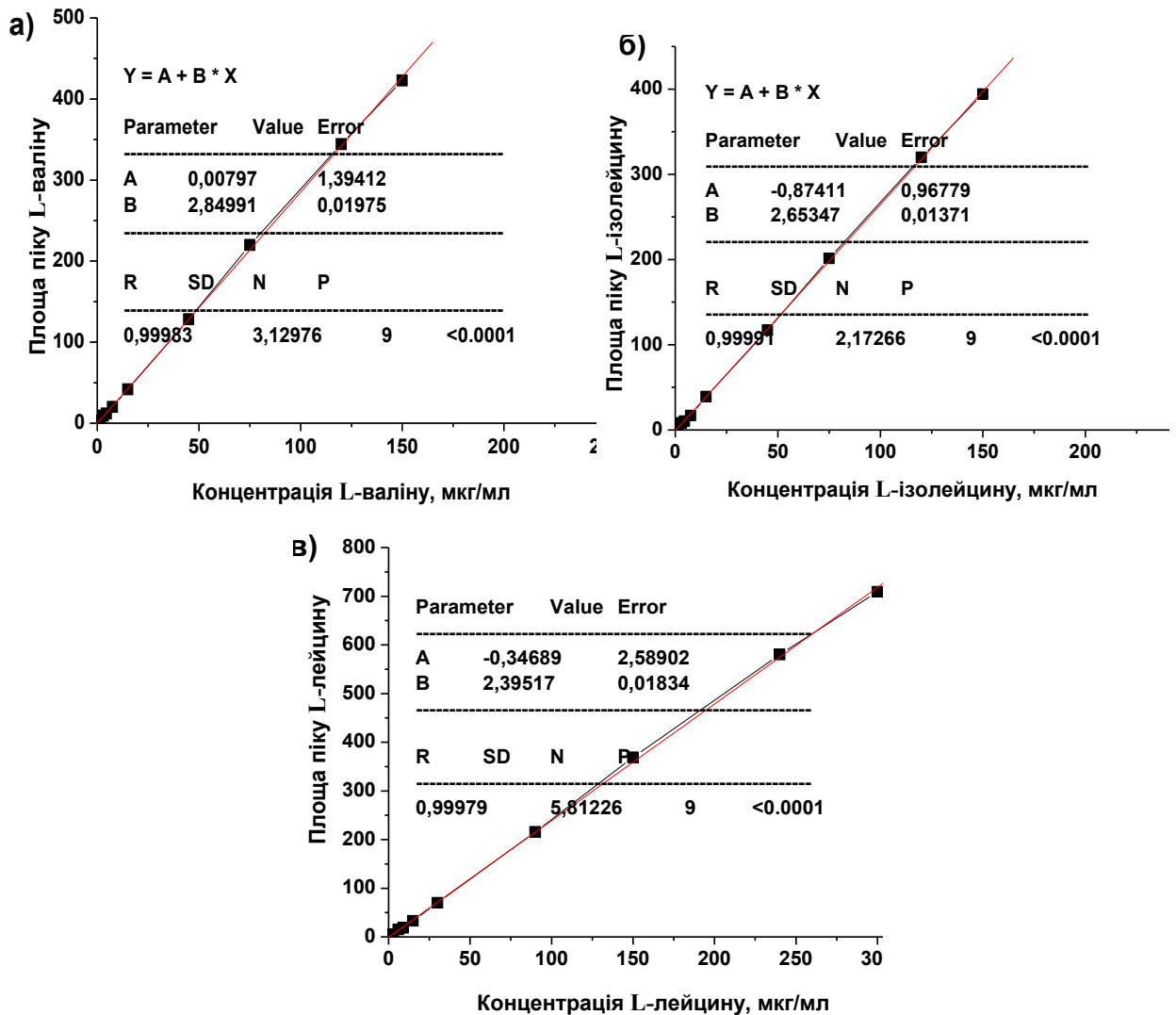


Рисунок 4.39. Градувальні графіки для визначення АК, де а – L-валін, б – L-ізолейцин, в – L-лейцин

Градувальні графіки лінійні в інтервалах концентрацій L-валіну 1,5 – 150,0 мкг/мл, L-ізолейцину 1,5 – 150,0 мкг/мл та L-лейцину 3,0 – 300,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

Глюкоза

Для визначення цукрів, цукрових спиртів, які не поглинають або слабо поглинають світло в УФ-області (наприклад, глюкоза) використовується рефрактометричний детектор, а також потрібна лігандообмінна колонка, заповнена сильною катіоннообмінною смолою (кальцієва форма),

0,30 м × 7,8 мм з розміром часток 9 мкм. Умови хроматографування: 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.

Градуювальний графік

Випробовувані розчини. 1,0 г глюкози поміщають в мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл води для хроматографії, розчиняють та доводять об'єм до позначки тим самим розчинником (10 мг/мл).

У мірні колби місткістю 100,0 мл поміщають по 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 мл розчину глюкози та доводять водою для хроматографії до позначки, отримуючи розчини з вмістом глюкози 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 і 2,0 мг/мл відповідно.

За отриманими результатами (рисунок 4.40) будують градувальний графік, відкладаючи на осі абсцис значення концентрації глюкози (мг/мл), а по осі ординат – значення площ піків (рисунок 4.41).

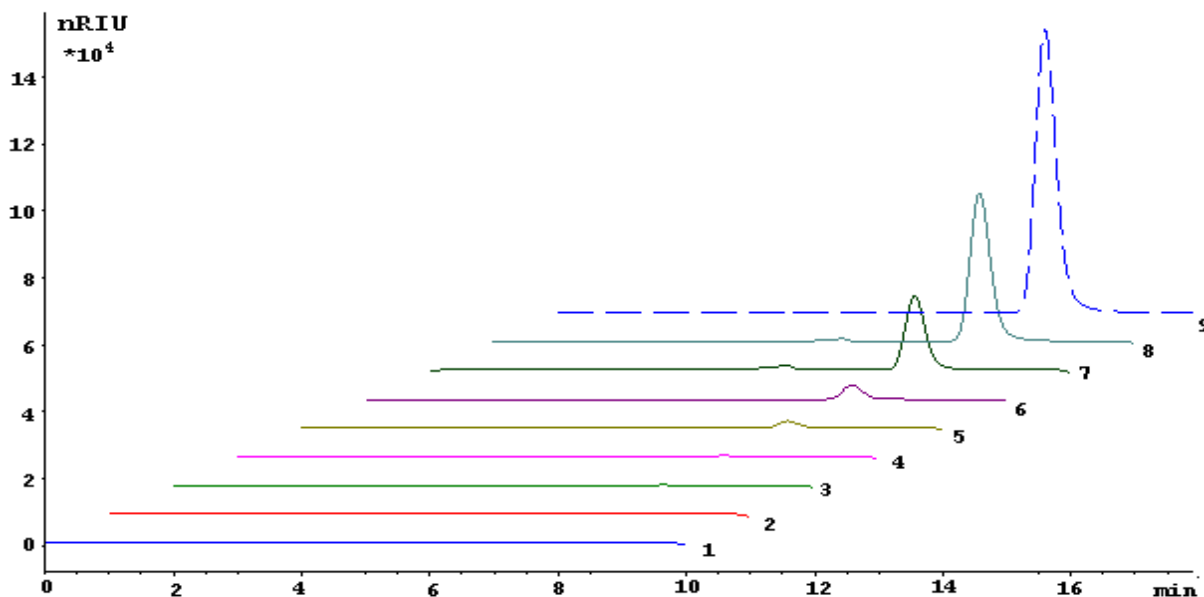


Рисунок 4.40. Хроматограми рухомої фази (1), контрольного дослідження (чистий сваб) (2), розчинів глюкози (3 – 9)

Градуювальний графік лінійний в інтервалі концентрацій глюкози 0,005 – 2,0 мкг/мл (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

При оцінці придатності розроблених хроматографічних методик

фактор симетрії піку не перевищував 1,5, число теоретичних тарілок (т.т.)

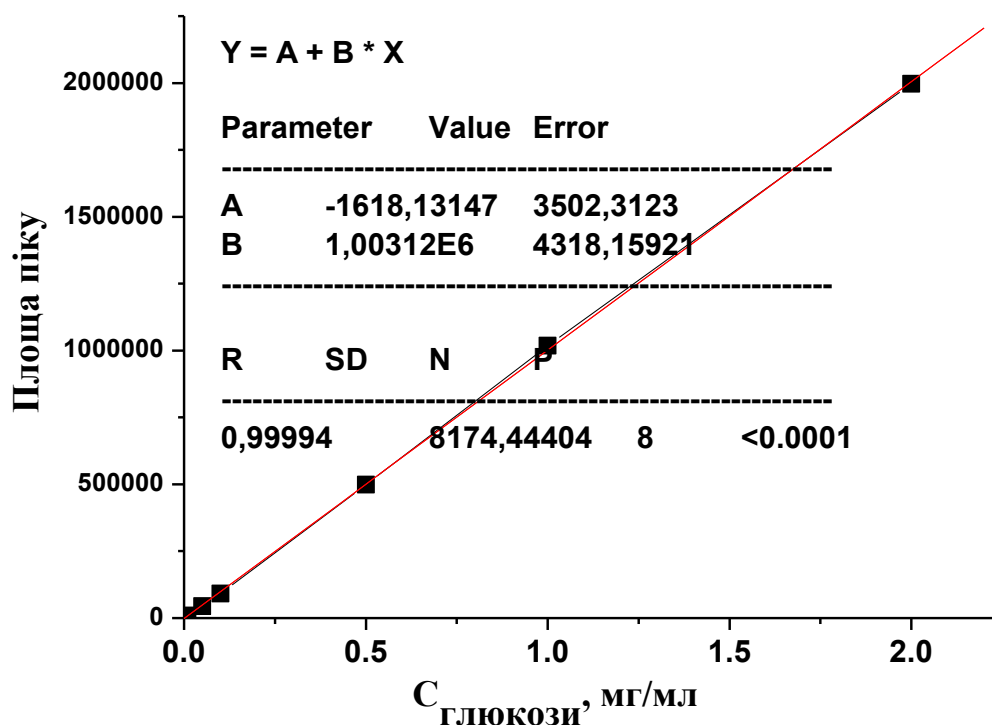


Рисунок 4.41. Градувальний графік для визначення глюкози

перевищує 2000, відносно стандартне відхилення часу утримування ($\tau_{упр}$) та площі піку ($S_{пiku}$) не перевищувало 2,0 % при $n = 5$. В таблиці 4.3 наведені показники придатності хроматографічних систем при визначенні вивчених препаратів. Оцінка ключових показників придатності хроматографічної системи виявила перспективу їх використання для контролю залишкових кількостей АФІ в змивах з технологічного обладнання фармацевтичного виробництва.

Методики розроблені відповідно до методичних та метрологічних вимог, валідовані за наступними показниками: специфічність, лінійність, точність, межа кількісного визначення.

Встановлено, що запропоновані методики характеризуються задовільною лінійністю, низькими значеннями меж виявлення (МВ) і меж кількісного визначення (МКВ) та дозволяють отримувати достовірні результати контролю очищення поверхонь обладнання. При цьому МКВ не перевищують величин допустимих залишків (ГДК) (табл. 3.1 Д, додаток 3).

Таблиця 4.3

Оцінка придатності хроматографічної системи ($n = 5$)

АФІ	симетрія піку	число т.т	$\tau_{умр}$ RSD %	$S_{піку}$ RSD %
Ривастигміну гідротартрат	1,0	2011	0,9	0,7
Левана	0,8	3045	0,4	0,9
Силденафілу цитрат	1,5	4356	0,8	0,7
Фенспіриду гідрохлорид	0,9	4992	0,4	0,9
Клонідину гідрохлорид	1,1	3781	1,1	1,3
Розувастатин кальцію	0,8	2881	0,5	0,7
Даклатасвіру дигідрохлорид	1,1	4304	0,3	0,6
Парацетамол (АМІЦИТРОН [®] , саше)	0,9	3120	0,4	1,2
Парацетамол (АМІЦИТРОН [®] ПЛЮС, саше)	1,0	2064	0,2	1,4
Гвайфенезин	1,1	4680	1,1	1,8
Парацетамол (ТЕОФЕДРИН ІС [®] , таблетки)	0,8	3028	0,5	1,5
Теофілін	0,9	2211	0,2	1,7
Деквалинію хлорид	1,1	3254	1,1	0,8
Цинхокаїну гідрохлорид	1,0	4100	1,0	1,1
Метамізол натрію	1,1	2501	1,3	1,6
L-лейцин	1,2	3511	0,5	1,4
L-валин	1,0	4778	0,8	1,2
L-ізолейцин	1,0	4896	0,6	1,5
Глюкоза	1,1	3564	0,5	1,7
<i>критерій прийнятності</i>	<i>0,8 – 1,5</i>	<i>≥ 2000</i>	<i>< 2</i>	<i>< 2</i>

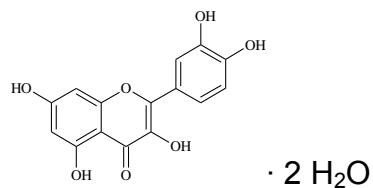
4.2.3 ВЕТШХ визначення сухого екстракту листя гінкго білоба (по кверцетину)

Важливим параметром, що відображає якість очищення обладнання після виробництва лікарських форм і біодобавок, що містять АФІ рослинного походження, є вміст мажорного компонента на поверхні відповідного устаткування (в разі сухого екстракту листя гінкго білоба – кверцетину).

До складу сухого екстракту листя гінкго білоба входять різні біологічно активні речовини (БАР), в тому числі флавоноїди, терпенові трілактони, алкалоїди, органічні кислоти та мікроелементи. Ці БАР мають антиоксидантну, протиішемічну, протинабрякову, антиагрегантну,

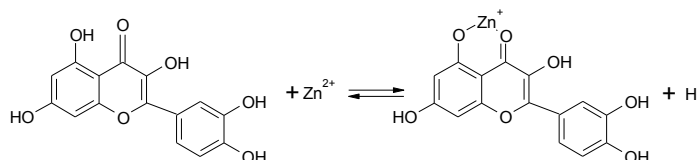
діуретичну та нейропротекторну дію.

Кверцетин – 3,3',4',5,7 – пентагідроксифлавоон дигідрат.



При розробці методики, як розчинник для приготування розчинів, був використаний метанол. При побудові градуовального графіка залежності площі піку від маси кверцетину на пластинці було виявлено, що величина вільного члена рівняння градуовальної залежності ($y = 32,094 \cdot x - 1294,3$) має дуже велике негативне значення та найменше нанесення, що детектується, відповідає масі близько 50 нг/пляму.

Ми припустили, що це пов'язано із взаємодією кверцетину з компонентами сорбенту. У зв'язку з цим була досліджена робастність методики по залежності інтенсивності сигналу від часу знаходження речовини на пластинці. Для цього на пластинку наносили по 100 нг кверцетину з інтервалом 15 хв між кожною аплікацією, всього 5 нанесень. Була виявлена монотонна зміна сигналу в залежності від часу перебування речовини на поверхні сорбенту. Оскільки в аналізі використовуються пластини з флуоресцентним індикатором UF 254, а в якості індикатора використовуються силікат цинку (II), було припущено, що на поверхні сорбенту в місці нанесення відбувається оборотна взаємодія кверцетину з сіллю цинку (II) за наступною схемою:



Принципово важливо, що для альтернативних схем взаємодії (по ортооксікарбонільному або діфенольному угрупованню) реакція проходить з витісненням протона.

Для підтвердження цієї гіпотези був проведений експеримент з дослідження залежності інтенсивності сигналу від часу знаходження

речовини на пластинці з сорбентом без флуоресцентного індикатора. Було виявлено, що в цьому випадку не спостерігається статистично значущої зміни площі піку кверцетину залежно від часу знаходження речовини на пластинці. З наведеної схеми взаємодії слідує, що додавання протонної кислоти буде зміщувати рівновагу вліво та перешкоджати комплексоутворенню. Для підтвердження цього були приготовані розчини кверцетину в метанолі з додаванням концентрованої фосфорної кислоти (85 %) у співвідношенні 2: 1, 1: 1 та 1: 2 (мкг речовини на мкл кислоти) та вивчена стабільність кверцетину на поверхні сорбенту з флуоресцентним індикатором (рисунок 4.42).

Було виявлено, що стабільність досягається при співвідношенні кверцетин – концентрована фосфорна кислота (85 %) = 1: 1.

Визначення залишкових кількостей сухого екстракту листя гінкго білоба (за вмістом кверцетину) на поверхні фармацевтичного обладнання, на якому відбувалось виробництво лікарського засобу на основі даного активного фармацевтичного інгредієнту, проводили із застосуванням вискоєфективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ).

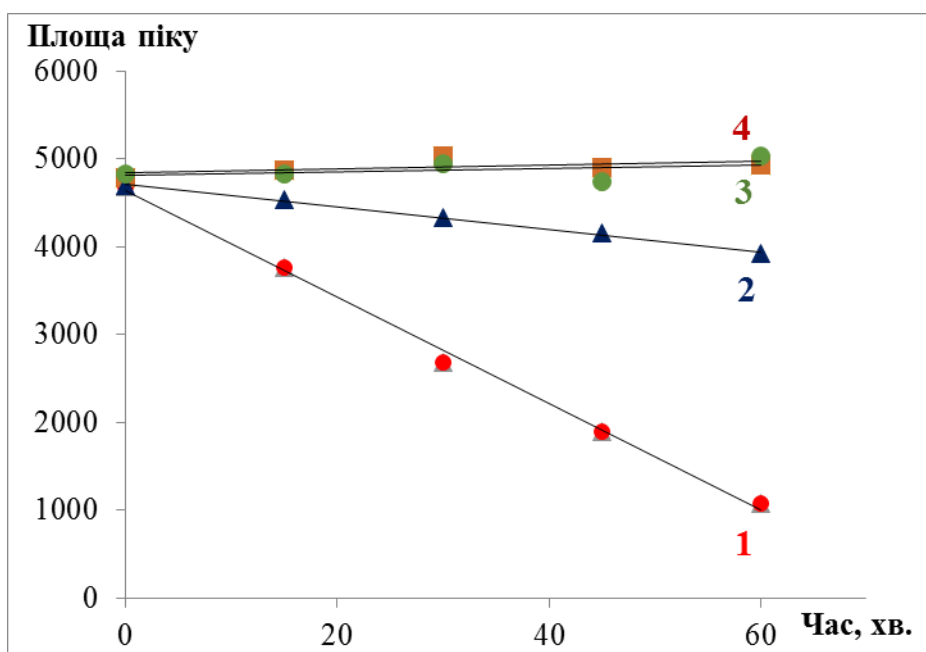


Рисунок 4.42. Залежність площі піку кверцетину від часу знаходження речовини на пластинці та кількості фосфорної кислоти: 1 – без кислоти, 2 – кверцетин – фосфорна кислота 2: 1, 3 – кверцетин-фосфорна кислота 1: 1, 4 – кверцетин-фосфорна кислота 1: 2

Градувальний графік будують наступним чином:

- у мірну колбу місткістю 50,0 мл вносять 10,0 мг кверцетину, розчиняють в 20 мл метанолу та доводять до позначки метанолом. 1,0 мл отриманого розчину поміщають в мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 0,2 мл концентрованої фосфорної кислоти (85 %) та доводять до позначки метанолом;
- на лінію старту хроматографічної пластинки за допомогою напівавтоматичного аплікатора Linomat 5 наносять 1, 2, 3, 4, 5 мкл (10, 20, 30, 40, 50 нг кверцетина, відповідно) отриманого розчину. Пластинку поміщають в камеру із сумішшю розчинників толуол – етилацетат – кислота мурашина (50: 40: 2). Коли фронт розчинників пройде 5 см від лінії старту, пластинку виймають з камери, сушать у потоці теплого повітря протягом 20 хв та сканують на хроматоденсітометрі TLC Scanner 3 за довжини хвилі 380 нм.

Аплікацію зразків проводять за наступних умов:

- об'єм шприца, мкл – 100
- об'єм предозування, мкл – 2
- відстань від краю пластинки до центру першого треку, мм – 15
- відстань від нижнього краю пластинки до старту, мм – 15
- довжина смуги нанесення, мм – 6
- відстань між центрами треків, мм – не менше ніж 10
- швидкість дозування, нл/сек – 200.

Сканування хроматограми проводять за умов:

- розмір щілини, мм × мм – 4,00 × 0,30
- швидкість сканування, мм/сек – 20
- розділення, мкм/крок – 100
- довжина хвилі сканування, нм – 380
- мінімальна висота піку – 5
- мінімальна площа піку – 20.

Вимірюють площі отриманих плям на хроматограмі. За отриманими результатами будують градувальний графік, відкладаючи на осі абсцис значення маси кверцетину (нг/пляму), а по осі ординат – значення інтенсивності абсорбції за довжини хвилі 380 нм (площа піку).

На рисунку 4.43 представлена лінійна залежність площі піку від маси кверцетину.

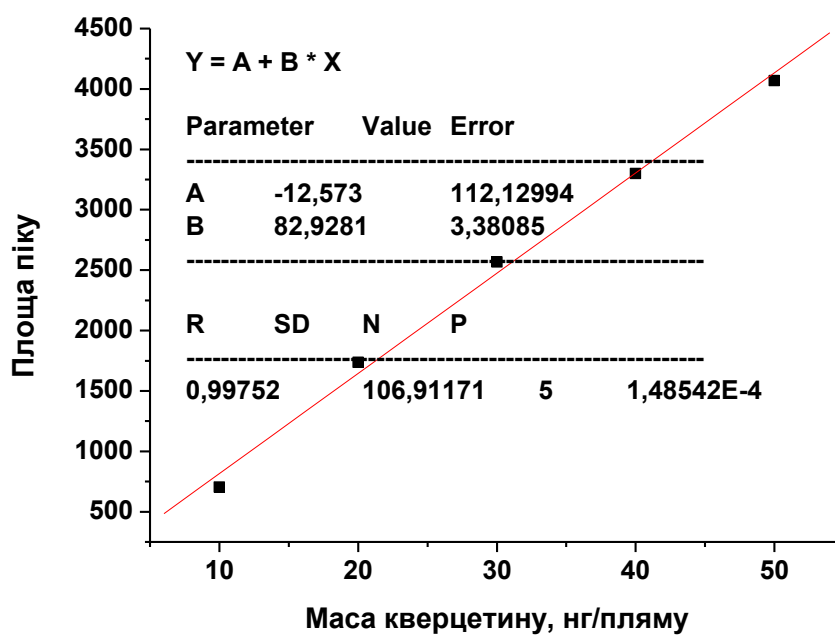


Рисунок 4.43. Градувальна залежність площі піку від маси кверцетину, нанесеного на ВЕТШХ-пластинку

Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій кверцетину 10,0 – 50,0 нг/ пляму (див. таблиці 3.1 Д, 3.2 Д).

На рисунку 4.44 наведені відповідні 3D хроматограми.

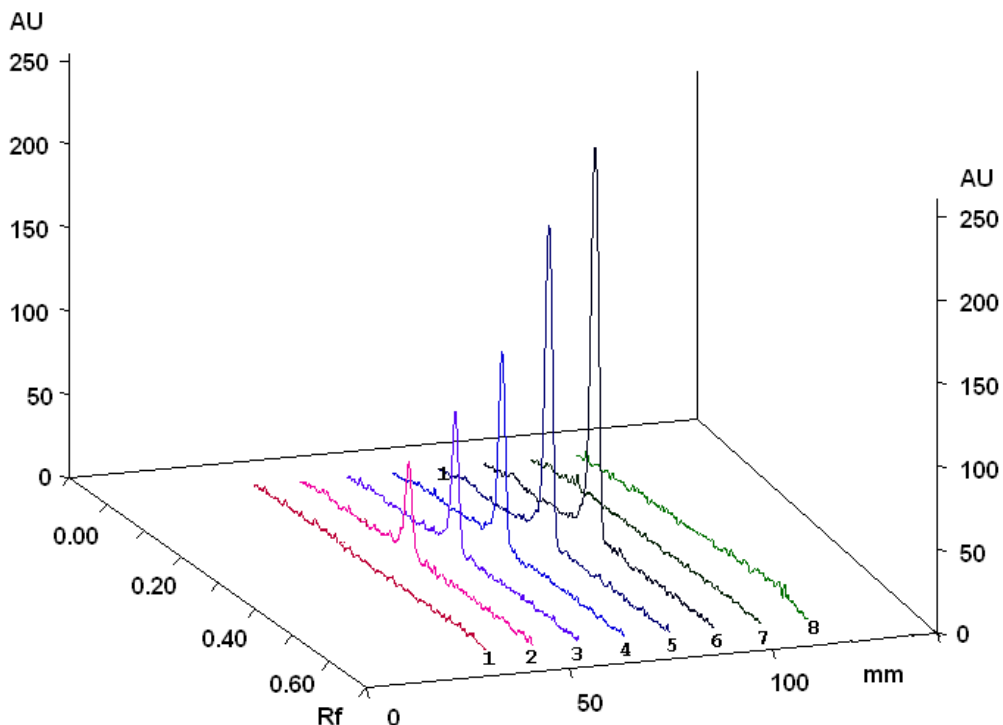


Рисунок 4.44. 3D хроматограми: 1 – промивного розчину з чистого аплікатору; 2 – 6 стандартних розчинів кверцетину (10, 20, 30, 40, 50 нг/пляму); 7,8 – розчинів після обробки свабів, якими робили змиви з поверхні фармацевтичного обладнання

На рисунку 4.45 наведена фотографія ВЕТШХ-пластини при 254 нм: треки 1 – 5 відповідають стандартному розчину кверцетину (10, 20, 30, 40, 50 нг/пляму), треки 6 – 10 (70, 90, 110, 150, 200 нг/пляму). В змивах кверцетин відсутній.

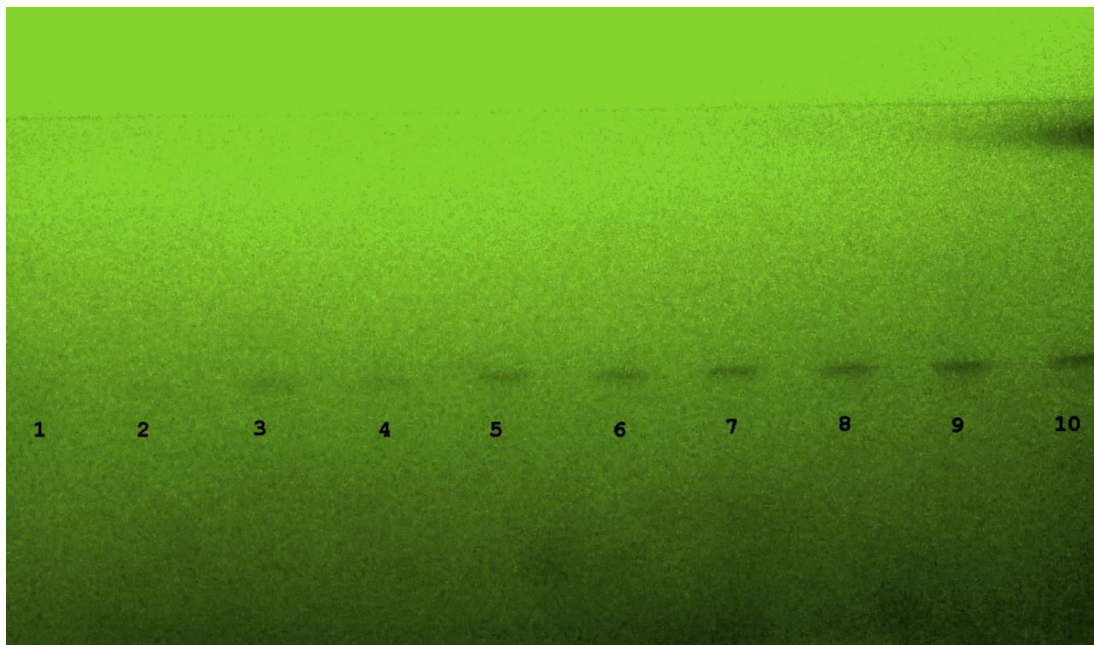


Рисунок 4.45 Фотографія ВЕТШХ-пластини

Випробовуваний розчин. Сваб зі змивом забруднення обладнання (площа змиву – 100,0 см²) поміщають в лабораторній стакан місткістю 25 мл, додають 5,0 мл розчину для пробопідготовки (100 мл метанолу, змішаного з 0,1 мл концентрованої фосфорної кислоти (85 %)), проводять десорбцію протягом 10 хв та наносять 40 мкл отриманого розчину на хроматографічну пластинку за допомогою напівавтоматичного аплікатору. Далі поступають як при побудові градувального графіка.

Вміст сухого екстракту листя гінкго білоба (X), в мкг/змив розраховують за формулою:

$$X = \frac{m_q \cdot 5 \cdot 10000}{40 \cdot P} = \frac{m_q \cdot 1250}{P},$$

де: m_q – маса кверцетину на хроматограмі випробовуваного розчину, отримана за градувальним графіком, нг/пляму;

P – вміст кверцетину в даній серії АФІ сухого екстракту листя гінкго-білоба, %.

Аналіз свабів.

З використанням розроблених методик проведено визначення залишкових кількостей деяких АФІ на поверхнях фармацевтичного обладнання при виробництві таблеток, саше, капсул, які містять даний АФІ, методом мазків (за допомогою свабів). На хроматограмах, спектрах поглинання та люмінесценції, отриманих при аналізі свабів, якими проводили вилучення залишкових кількостей АФІ з поверхні обладнання, часи утримування піків, максимумами поглинання та люмінесценції на хроматограмах та спектрах досліджуваних розчинів та модельних розчинів РСЗ для градуювальних графіків збігаються. Це підтверджує специфічність визначення АФІ, присутніх в змивах та в розчинах РСЗ, а також відсутність в змивах продуктів їх деградації.

Результати визначення залишкових кількостей АФІ з поверхні технологічного обладнання виробничої дільниці ГЛЗ підприємства ТДВ «ІНТЕРХІМ» представлені в підсумковій таблиці 4.4.

З таблиці 4.4 можна зробити висновок, що всі результати визначення залишкових кількостей АФІ не перевищують гранично допустиме значення залишків в змивах (таблиця 3.1 Д, додаток 3), що свідчить про задовільну якість очищення відповідного обладнання.

4.3 Висновки до розділу 4

У цьому розділі наведено результати щодо розробки та валідації хроматографічних та оптичних методик визначення залишкових кількостей деяких АФІ на поверхнях фармацевтичного обладнання. Для кожного препарату оптимізовані умови аналізу. Для ВЕРХ визначення залишкових кількостей ряду ЛП вперше були оптимізовані хроматографічні умови при використанні доступних рухомих фаз на сорбентах типу С8 та С18.

Показано, що аналітичні та валідаційні характеристики розроблених методик (діапазон лінійності методики, МКВ, ГДК) відповідають критеріям прийнятності визначення залишкових кількостей АФІ в змивах після очищення фармацевтичного обладнання. Для кожного препарату встановлено коефіцієнт ступеня вилучення (%).

Таблиця 4.4.

Результати визначення залишкових кількостей деяких АФІ

АФІ	залишкові кількості АФІ (мкг/мл)			
	Гранулятор -сушарка	Таблетковий прес	Машина для наповнення капсул	Машина для фасування порошку у саше
Тилорон	0,45	0,32		
L-5-гідрокситриптофан			0,68	0,72
Колаген			5,81	
Бензобітал	0,37	0,28		
Розувастатин кальцію (люм.)		0,10		
Ривастигміну гідротартрат (люм.)			1,68	
Глюкоза (поляриметрия)	0,95			1,04
Калій				0,63
Натрій				0,34
Силденафілу цитрат	0,11	0,08		
Фенспіриду гідрохлорид	1,45	1,30		
Клонідину гідрохлорид	0,05	0,04		
Левана	0,08	0,05		
Фенібут	0,25	0,27		
Парацетамол (АМЦИТРОН [®] , саше)	0,18			0,29
Парацетамол (АМЦИТРОН [®] ПЛЮС, саше)				0,15
Гвайфенезин				0,03
Парацетамол (ТЕОФЕДРИН ІС [®] , таблетки)	0,16	0,15		
Теофілін	0,14	0,13		
Парацетамол (АМЦИТРОН [®] ЕКСТРАТАБ, таблетки)	0,11	0,17		
Парацетамол (ПЕНТАЛГІН ІС [®] , таблетки)	0,18	0,23		
Деквалінію хлорид	0,14	0,08		
Цинхокаїну гідрохлорид	0,017	0,009		
Метамізол натрію	0,27	0,22		
L-лейцин		11,12		
L-валін		4,93		
L-ізолейцин		3,78		
сухий екстракт листя гінкго білоба (по кверцетину)			< МКВ	

ВИСНОВКИ

1. Методами математичної статистики з урахуванням вимог GMP розроблені підходи для визначення максимально допустимої невизначеності методик контролю якості очищення фармацевтичного обладнання та інших валідаційних критеріїв, які застосовані при створенні нових хроматографічних та оптичних методик аналізу для визначення залишкових кількостей ряду активних фармацевтичних інгредієнтів, необхідних для вітчизняного промислового випуску лікарських препаратів.

2. На прикладі АФІ деквалінію хлориду за методом «найгіршого випадку» запропановані критерії прийнятності валідації аналітичної методики контролю якості очищення обладнання та визначення рівня забруднення (максимальна невизначеність методики, лінійність градувального графіка, межа кількісного визначення, прецизійність та відтворюваність).

3. Розроблено та валідовано методики спектрофотометричного (тилорону, L-5-гідрокситриптофану, колагену, бензобіталу), поляриметричного (глюкози) та люмінесцентного (розувастатину кальцію, флупіртину малеату, абіратерону ацетату, ривастигміну гідротартрату) визначення залишкових кількостей АФІ на поверхнях фармацевтичного обладнання при виробництві відповідних лікарських препаратів.

4. Вперше застосовано атомно-емісійну спектрометрію з індуктивно зв'язаною плазмою для визначення мікрокількостей калію та натрію при виробництві багатокомпонентного засобу РЕГІСОЛ[®] НЕО, який містить натрію хлорид, калію хлорид, натрію цитрат.

5. Після оптимізації умов аналізу (тип сорбенту, геометрія колонки, температура колонки, склад елюенту, діапазон концентрацій органічного модифікатора у рухомій фазі, довжина хвилі та ін.) запропоновані нові методики визначення залишків силденафілу цитрату, фенспіриду гідрохлориду, клонідину гідрохлориду, левана, розувастатину кальцію, ривастигміну гідротартрату, даклатасвіру дигідрохлориду, фенібуту методом ВЕРХ.

6. Вперше розроблено та валідовано методику визначення залишкових кількостей L-валіну, L-лейцину та L-ізолейцину в змивах після очищення фармацевтичного обладнання методом обернено-фазової ВЕРХ з УФ-детектуванням з використанням для предколоночної дериватизації ди-трет-бутилдикарбонату, що застосовується в органічному синтезі для захисту аміногруп.

7. Високоєфективна тонкошарова хроматографія застосована для визначення залишкових кількостей сухого екстракту листя гінкго білоба (за вмістом кверцетину) на поверхнях фармацевтичного обладнання. Метод реалізован завдяки використанню фосфорної кислоти, яка перешкоджає комплексоутворенню кверцетину з силікатом цинку (II) (компонентом флуоресцентного індикатора хроматографічної пластинки).

8. Показано, що аналітичні та валідаційні характеристики розроблених методик (діапазон лінійності методики, МКВ, ГДК) відповідають критеріям прийнятності визначення залишкових кількостей АФІ в змивах після очищення фармацевтичного обладнання. Для кожного препарату встановлено коефіцієнт ступеня вилучення (%).

9. Показана можливість експресного внутрішньовиробничого контролю очищення фармацевтичного обладнання при виробництві лікарських препаратів. Методики визначення левана, флупіртину малеату, розувастатину кальцію, фенібуту та парацетамолу впроваджені у практику роботи фармацевтичного підприємства ТДВ «ІНТЕРХІМ».

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. ICH Good Manufacturing Practice Guideline for Active Pharmaceutical Ingredients. (July 23 1999).
2. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2011. Лікарські засоби. Належна виробнича практика. – К.: МОЗ України, 2011. – 261 с.
3. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use, EudraLex Volume 4. Annex 15: Qualification and Validation, Brussels, 2014.
4. Walsh A. Cleaning validation for the 21st century: acceptance limits for active pharmaceutical ingredients (APIs): Part I // *Pharmaceutical Engineering*, vol. 31, no. 4, pp. 78–83, 2011.
5. Guide to inspections validation of cleaning processes, U.S. Food and Drug Administration, Office of Regulatory Affairs, Washington, DC, 1993.
6. FDA “Guide to Inspection of Bulk Pharmaceuticals Chemicals” (1991)
7. FDA, “Guide to Inspection of Validation of Cleaning Processes,” July 2004.
8. Brewer R. Designing and documenting your cleaning validation program to meet FDA requirements, Washington Group International, Philadelphia. presented at cleaning validation and cleaning processes Feb 1-2 Philadelphia, PA (2001).
9. ICH Q2B, Validation of Analytical procedure: Methodology, ICH guideline, 2005.
10. Guide to Inspections Validation of Cleaning Processes 7/29, US Food and Drug Administration, (FDA), Office of Regulatory Affairs, Washington, DC, 2011. Cleaning Validation Guide- lines (GUIDE-0028).
11. Guidance on aspects of cleaning validation in active pharmaceutical ingredient plants; APIC. December, 2000.
12. Guidance on aspects of cleaning validation in active pharmaceutical ingredient plants; APIC. May, 2014.
13. Нурисламова Г. Р. Химический контроль чистоты оборудования фармацевтического производства и его валидация. : автореф. дис. на

соискание учен. степени канд. хим. наук / Г. Р. Нурисламова. — Казань, 2002. — 23 с.

14. Nassani M. Cleaning validation in the pharmaceutical industry / M. Nassani // *J. Valid. Tech.*. – 2005. – Vol. 8. – P. 11– 14.

15. Перекрестное загрязнение в химико-фармацевтическом производстве: проблемы стандартизации и унификации требований / С. Ю. Гармонов, Г. Р. Нурисламова, Р. Р. Фатхуллин, С. М. Горюнова // *Вест. Казан. технол. ун-та* – 2006.– №6. – С. 294-305.

16. Нурисламова Г. Р. Методы аналитического контроля перекрестного загрязнения лекарственных препаратов / Г. Р. Нурисламова, С. Ю. Гармонов // *Материалы II Международного форума «Аналитика и аналитики»*. Воронеж. – 2008. – Т. 2. – С. 527.

17. Current perspectives on cleaning validation in pharmaceutical industry: a scientific and risk based approach / H. A. Pawar, N. D. Banerjee, S. Pawar, P. Pawar // *Int. J. Pharm. Phytopharmacol. Res.* – 2011.– Vol. 1, № 1. – P. 8 – 16.

18. Ovais M. Setting cleaning validation acceptance limits for topical formulations / M. Ovais, L. Y. Lian // *Pharm. Tech.* – 2008. – Vol. 32, №1. – P 1 – 6.

19. Sharnez R. Setting rational MAC-based limits Part I – Reassessing the carryover criterion / R. Sharnez // *J. Validation Tech.* – 2010. – P. 71 – 74.

20. LeBlanc D. A. Establishing scientifically justified acceptance criteria for cleaning validation of finished drug products / D. A. LeBlanc // *Pharm Technol.* – 1998. – Vol. 22. – P. 136 – 148.

21. Fourman G. L. Determining cleaning validation acceptance limits for pharmaceutical manufacturing operations / G. L. Fourman, M. V. Mullen // *Pharm. Technol.* – 1993. –Vol. 17, № 4.– P. 54 – 60.

22. Cleaning Limits – Why the 10-ppm criterion should be abandoned / M. Crevoisier, E. Lovsin Barle, A. Flueckiger, D. G. Dolan, A. Ader, A. Walsh // *Pharm. Tech.* – 2016. – P. 52 – 56.

23. PIC/S 006-3 Validation master plan installation and operational qualification non-sterile process validation cleaning validation – 25 September. – 2007.
24. Шилова С.В. Проведение валидации очистки оборудования / С.В. Шилова // *Технология чистоты*. – 2002. – № 6. – С. 23.
25. A brief review on cleaning validation and its significance in pharmaceutical industry / P. V. Waghmare, A. S. Chinchole, B. N. Poul, O. G. Bhusnure // *Pharma Sci. Monitor* – 2013. – Vol. 4, № 4. – P. 165 – 171.
26. Maurya S. Cleaning Validation in Pharmaceutical Industry – An Overview / S. Maurya, D. Goyal, C. Verma // *PharmaTutor*. – 2016. – Vol. 4, № 9. – P. 14 – 20.
27. Ghosh A. Overview of cleaning validation in pharmaceutical industry / A. Ghosh, S. Dey // *Int. J. Pharm. Quality Assur.* – 2010. – Vol. 2, № 2. – P. 26 – 30.
28. McCormick P. Y., Cullen L. F.. Cleaning validation In: Berry, I. R., and Nash R. A. editor. *Pharmaceutical Process Validation*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker. – 1993. – P. 319 – 349.
29. Касимова А. О. Концепция процесса валидации очистки оборудования / А. О. Касимова, А. А. Егоров // *Фарм. технол. упаковка*. – 2013. – №. 1. – С. 40 – 43.
30. Venugopal S. Designing of cleaning validation program for active pharmaceutical ingredients / S. Venugopal // *WJPR*. – 2014. – Vol. 3, № 3. – P. 3819 – 3844.
31. Mamta G. Cleaning validation of pharmaceutical dosage forms / G. Mamta, B. Meenakshi // *WJPR*. – 2015. – Vol. 4, № 9. – P. 421 – 436.
32. Ghatpande K. S. Development and validation of analytical method for cleaning process – A Review / K. S. Ghatpande, Mr. S. R. Shrivastava // *Int. J. Pharm. Res. Develop.* – 2014. – Vol. 6, № 1. – P. 084 – 089.
33. Kumar S. A review on concept of cleaning validation in pharmaceutical industry / S. Kumar // *Int. Res. J. Pharm.* – 2012. – Vol. 3, № 7. – P. 17 – 19.

34. Lodhi B. Cleaning validation for the pharmaceuticals, biopharmaceuticals, cosmetic and nutraceuticals industries / B. Lodhi, P. Padamwar, A. Patel // JIPBS. – 2014. – Vol. 1, № 1. – P. 27 – 38.
35. Gee A. Cleaning procedures / A. Gee, D. L. Lyon // Cell Therapy. – 2009. – P. 135 – 144.
36. Федотов А.Е. Аттестация процессов очистки оборудования / А. Е. Федотов // Технология чистоты. – 2010. – Т. 1. – С. 21 – 32.
37. Bagade S. B. Cleaning validation: An important aspect in accessing pharmaceutical residues / S. B. Bagade, V. S. R. Krishna // Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. – 2014. – Vol. 5, № 2. – P.1572 – 1579.
38. Forsyth R. J. Swab recovery parameters are reviewed in detail to define best practices and highlight common mistakes to assure successful recovery studies using a risk-based approach / R. J. Forsyth // Pharm. Tech. – 2016. – Vol. 40, № 9. – P. 40 – 53.
39. Method development of swab sampling for cleaning validation of a residual active pharmaceutical ingredient / P. Yang, K. Burson, D. Feder, F. Macdonald // Pharm. Tech. – 2005 – P. 84 – 95.
40. Танагузова Б. М. К вопросу очистки фармацевтического оборудования / Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / под ред. М.В. Гаврилина. – Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2012. – Вып. 67. – С. 198 – 200.
41. Shifflet M. J. Development of Analytical Methods to Accurately and Precisely Determine Residual Active Pharmaceutical Ingredients and Cleaning Agents on Pharmaceutical Surfaces / M.J. Shifflet, M. Shapiro / Am. Pharm. Rev. – 2002. – Vol. 4. – P. 35 – 39.
42. Zaheer Z. Analytical Methods for Cleaning Validation / Z. Zaheer, R. Zainuddin // Der Pharmacia Lettre –2011. – Vol. 3, №6. – P. 232 – 239.
43. Chaudhary A. Technique development of cleaning validation for chlordiazepoxide IP tablets dosage form / A. Chaudhary, A. Chaudhary // IJPPR. – 2013. – Vol. 4, № 3. – P. 859 – 871.

44. Dry-swabbing/image analysis technique for the pharmaceutical equipment cleaning validation / P. Zamostny, K. Puncochova, Z. Vltavsky, J. Patera, Z. Belohlav // *Procedia Engineering* – 2012. – Vol. 42. – P.447 – 453.
45. Wiss J. Cleaning validation using thermogravimetry / J.Wiss, J. Schmuck // *J. Thermal Anal. Calorimetry.* – 2010. – Vol. 104, № 1. – P. 315 – 321.
46. Noncontact, real-time cleaning verification for pharmaceutical manufacturing. 2013. – Block Engineering, Inc. 5 p.
47. Mehta N. K. Development of an in situ spectroscopic method for cleaning validation using Mid-IR fiber optics / N. K. Mehta, J. Goenaga-Polo, S. P. Hernández-Rivera, D. Hernández, M. A. Thomson, P. J. Melling // *BioPharm.* – 2002. – Vol. 15, №5. – P. 36 – 42.
48. Residue analysis, direct potentiometric method for chloride ion applied to residues of chlorinated insecticides / G. K. Helmkamp, F. A. Gunther, J. P. Wolf, J. E. Leonard // *J. Agric. Food Chem.* – 1954. – Vol. 2, №16. – P. 836 – 839.
49. Milenović D. M. Non-specific methods for detecting residues of cleaning agents during cleaning validation / D. M. Milenović, D. S. Pešić, S. S. Mitić // *Chem. Ind. Chem. Eng. Quarterly* – 2011. – Vol. 17, № 1. – P. 39 – 44.
50. Cleaning validation and risk management in manufacturing pharmaceuticals forms with potent activity / M. Balmoş, M. I. Lazăr, G. Traian, A. B. Dragomiroiu // *Farmacia.* – 2014. – Vol. 62, №4. – P. 791 – 802.
51. Crone Ch. Cleaning validation: A timely solution for improving quality and containing cost / Ch. Crone // *Pharm. Eng.* – 2013. – № 11 – 12. – P. 52 – 58.
52. Total Organic Carbon (VCSN and VWP) and HPLC analysis for cleaning validation in a pharmaceutical pilot plant / M. Queralt, E. García-Montoya, P. Pérez-Lozano, J. M. Sune-Negre, M. Minarro, J. R. Tico // *J. Pharm. Sci. and Tech.* – 2009. – Vol. 63. – P. 42 – 57.
53. Контроль чистоты технологического оборудования методом определения общего органического углерода / А. Кравченко, И. Протасова, А. Захарова, И. Гринштейн // *Аналитика.* – 2014. – Т. 19, №6. – С. 74 – 80.

54. Cleaning validation: quantitative estimation of atorvastatin in production area / M. R. Moradiya, K. P. Solanki, P. A. Shah, K. G. Patel, V. T. Thakkar, T. R. Gandhi // J. Pharm. Sci. Tech. – 2013. – Vol. 67. – P. 164 – 171.

55. Sajid S. S. Validation of cleaning of pharmaceutical manufacturing equipment, illustrated by determination of cephadrine residues / S. S. Sajid, M. S. Arayne, N. Sultana // Anal. Methods. – 2010. – Vol. 2. – P. 397 – 401.

56. Juarbe N. Validation of a method for the determination of polysorbate 20 residue for the support of the cleaning of pharmaceutical vial closures / N. Juarbe, M. Strege // J. Valid. Technol. – 2007. – Vol. 13, № 2. – P. 114 – 123.

57. Cleaning validation of a multipurpose tank used for type B *haemophilus influenzae* and meningitis A and C vaccine formulation / B. C. Bago, L. Dolavale, A. S. Luna, A. C. A. Da Costa // Int. J. Life Sci. Pharm. Res. – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. L-116 – L-125.

58. Badawi A. A. Studies on cleaning validation for a cream and ointment manufacturing line / A. A. Badawi, K. Hegazy, D. Louis // Trop. J. Pharm. Res. – 2016. – Vol. 15, № 11. – P. 2329 – 2335.

59. Development and validation of cleaning procedure of mixing equipment used for manufacturing ceftriaxone and Sulbactam injection tablet by using total organic carbon / N. Patel, S. Jansari, A. Arvadiya, K. Panchal, H. Desai // J. Pharmacy – 2012. – Vol. 2, № 5. – P. 46 – 50.

60. Raghavan R. Low-Level (PPB) determination of cisplatinin cleaning validation (rinse water) samples. I. Atomic absorption spectrophotometric method / R. Raghavan, J. A. Mulligan // Drug Dev. Indust. Pharmacy – 2000. – Vol. 26, № 4. – P. 423 – 428.

61. Lewen N. The use of inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES) in the determination of lithium in cleaning validation swabs / N. Lewen, D. Nugent // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2010. – Vol. 52, № 5. – P. 652 – 655.

62. Quantitative determination of residual active pharmaceutical ingredients and intermediates on equipment surfaces by ion mobility spectrometry / C. Qin,

A. Granger, V. Papov, J. McCaffrey, D.L. Norwood // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – Vol. 51. – P. 107 – 113.

63. Ion mobility spectrometry for the simultaneous determination of diacetyl midcamycin and detergents in cleaning validation / S. Armenta, M. Alcalá, M. Blanco, J. M. Gonzalez // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2013. – Vol. 83. – P. 265 – 272.

64. Ion mobility spectrometry of talarozole, a new azole drug, in cleaning quality control / B. Baert, J. Boonen, C. Thierens, B. De Spiegeleer // *Int. J. Ion Mobility Spectrometry.* – 2011. – Vol. 14, № 2 – 3. – P. 109 – 116.

65. Кондратьева М. Л. Разработка аналитических методик для валидации очистки оборудования, используемого в производстве лекарственных средств / М. Л. Кондратьева, Е. Н. Наприенко, О. В. Шкуратова // *Сибир. мед. журн.* – 2011. – Т. 26, вып. № 2 – 2. – С. 94 – 97.

66. Development and validation of analytical method for estimation of diclofenac sodium in swab samples / P. P. Goti, J. J. Savsani, P. B. Patel // *Int J. Pharm. Sci. Res.* – 2013. – Vol. 4, № 2. – P. 741 – 744.

67. Росада М. В. Валідація методики визначення залишкових кількостей рибоксину на поверхні обладнання / М. В. Росада, Н. Ю. Бевз, В. А. Георгіянц // *Фармацевтичний часопис.* – 2016. – Vol. 2. – P. 35 – 38.

68. Quantitative determination of ciprofloxacin residues for cleaning validation in manufacturing equipment surface / P. Shah, N. Champaneri, K. Solanki, V. Thakkar, K. Patel, T. Gandhi // *Indian J. Chem. Technol.* – 2014. – Vol. 21. – P. 233 – 237.

69. Quantitative determination and sampling of valsartan residues for cleaning validation in production area / P. Jadhav, S. Jadhav, K. Mehra, H. Katre, C. Varkhade, H. Pawar // *Int. J. Chem. Pharm. Anal.* – 2014. – Vol. 1, № 2. – P. 63 – 66.

70. Validation of cleaning procedure for elimination of ofloxacin and metronidazole benzoate from mixing equipment by using UV spectroscopy /

N. B. Patel, S. K. Jansari, A. C. Arvadiya, H. T. Desai // Int. J. Pharm. Sci. Res. – 2015. – Vol. 3, № 7. – P. 2306 – 2309.

71. Rapid at-line pharmaceutical cleaning verification using a novel light induced fluorescence (LIF) sensor / D. N. Peles, K. J. Ely, T. M. Crowder, M. Ponstingl // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2013. – Vol. 72. – P. 1 – 7.

72. Determination of cefmetazole residue at pharmaceutical manufacturing facilities by chemiluminescence flow injection analysis/ N. Fakutsu, T. Konse, T. Kawasaki, K. Saito, H. Nakazawa // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2006. – Vol. 41, № 2. – P. 599 – 602.

73. Gas chromatography method of cleaning validation process for 2-propanol residue determination in pharmaceutical manufacturing equipment / L. Czubak, A. Krygier, B. Tejchman-Malecka // Int J. Pharm. Sci. Drug Res. – 2014. – Vol.6, №3. – P.243 – 245.

74. Capillary gas chromatographic assay of residual methenaminehippurate in equipment cleaning validation swabs / T. Mirza, Ron C George, J. R. Bodenmiller, S. A. Belanich // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1998. – Vol. 16, № 6. – P. 939 – 950.

75. Валидация очистки технологического оборудования с использованием ВЭТСХ // Компания Данау Лаб // Фармацевтическая отрасль – 2011. – Т. 29, № 6. – С. 98 – 100.

76. Cleaning validation procedure eased by using overpressured layer chromatography / Z. Katona, L. Vincze, Z. Vegh, A. Trompler, K. Ferenczi-Fodor // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2000. – Vol.22, №2. – P.349 – 353.

77. Liu L. Cleaning verification assays for highly potent compounds by high performance liquid chromatography mass spectrometry: strategy, validation, and long-term performance / L. Liu, B. W. Pack // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2007. – Vol. 43, № 4. – P. 1206 – 1212.

78. Schmidt A. H. UPLC-MS/MS in support of cleaning validation studies in an cephalosporin antibioticsproduction facility / A. H. Schmidt, M. Stanic // Режим доступа до журн.: <http://www.laboratory->

journal.com/applications/spectroscopy-elemental-analysis/uplc-msms-support-cleaning-validation-studies.

79. Schmidt A. H. Validated HPLC method for the determination of residues of acetaminophen, caffeine, and codeine phosphate on swabs collected from pharmaceutical manufacturing equipment in support of cleaning validation / A. H. Schmidt// J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. – 2006. – Vol. 29. – P. 1663 – 1673.

80. Pankaj P. Ch. Development and rapid method for estimation of low levels of docusate sodium from equipment surfaces / Pankaj P. Chandratreya., Hitendra S. Mahajan // Int. J. Chem. Tech. Res. – 2014. – Vol. 6, № 14. – P. 5680 – 5686.

81. Cleaning validation 2: Development and validation of an ion chromatographic method for the detection of traces of CIP-100 detergent / W. Resto, D. Hernandez, R. Rey, H. Colon, J. Zayas // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2007. – Vol.44, №1. – P.265 – 269.

82. Kumar Ch. N. Cleaning validation by advanced chromatographic separation optimized meyhod for the determination of diclophenac sodium residues on the surface of manufacturing equipments and study of its recovery from pharmaceutical dosage forms / Ch. N. Kumar , N. Kannappan // IJPRD – 2014. – Vol. 6, № 8. – P. 111 – 117.

83. Boca M. B. A validated HPLC method for determining residues of a dual active ingredient anti-malarial drug on manufacturing equipment surfaces/ M. B. Boca, Z. Apostolides, E. Pretorius // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2005. – Vol. 37, № 3. – P. 461 – 468.

84. Swab sampling for cleaning validation of digoxin residual on manufacturing equipment / L. Alagić-Džambić, A. Todorović, E. Ljekperić, D. Ramić, S. Omerović // Folia Medica. – 2013. – Vol. 48, № 2. – P. 119 – 123.

85. Validation of an HPCL-UV method for the determination of digoxin residues on the surface of manufacturing equipment / Z. B. Todorovic, M. L. Lazic, V. B. Veljkovic, D. M. Milenovic // J. Serb. Chem. Soc. – 2009. – Vol. 74, №10. – P. 1143 – 1153.

86. Validation of swab sampling and HPLC methods for determination of meloxicam residues on pharmaceutical manufacturing equipment surfaces for cleaning validation / I. Rubashvili, N. Karukhnishvili, K. Loria, N. Dvali // *Turk. J. Pharm. Sci.* – 2015. – Vol. 12, № 3. – P. 287 – 298.

87. Шкляєв С. А. Аналітичне забезпечення процедури очищення технологічного обладнання від залишків активних інгредієнтів на фармацевтичному підприємстві / С. А. Шкляєв // *Сучасна фармацевтична технологія.* – 2012. – №5. – С. 33 – 37.

88. Slivová Z. Determination of anthracycline drug residual in cleaning validation swabs of stainless-steel equipment after production of cytostatic injections using HPLC analytical method / Z. Slivová, R. Opatlilová // *J. Spectroscopy* – 2015. – Режим доступу до журн.: doi.org/10.1155/2015/847349.

89. Ayyappan J. Validated HPLC method for the fast and sensitive determination of few anti-diabetic drugs residues in support of cleaning validation in formulation area / J. Ayyappan, P. Umaphathi, S. Darlin Quine // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2011. – Vol 3, №5. – P. 372 – 374.

90. Residue determination of clindamycin phosphate and tretinoin on the surface of manufacturing equipment by RP-HPLC / C. Roy, J. Chakrabarty, S. Rao, P. B Modi, A. Vairale // *J. Pharm. Res.* – 2012. – Vol. 5, № 7. – P. 3665 – 3669.

91. Esmaeilpour M. A validated HPLC method for determining of inhaler residues on pharmaceutical manufacturing equipment surfaces / M. Esmaeilpour, H. Ahmad Panahi // *Res. Parm. Sci.* – 2012. – Vol. 7, №5. – P. S 697.

92. Dubey N. Cleaning level acceptance criteria and HPLC-DAD method validation for the determination of Nabumetone residues on manufacturing equipment using swab sampling / N. Dubey, M. Mandhanya, D. K. Jain // *J. Pharm. Anal.* – 2012. – Vol. 2, № 6. – P. 478 – 483.

93. Reddy P. S. A validated RP-HPLC method for the determination of Irinotecan hydrochloride residues for cleaning validation in production area /

P. S. Reddy, K. S. Babu, N. Kumar // *Revista Cubana de Farmacia* – 2013. – Vol. 47, № 1. – P. 41 – 50.

94. Akl A. M. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of cefdinir residues on manufacturing equipment surfaces / A. M. Akl, M. A. Ahmed, A. Ramadan // *J. Chromat. Separation Techniq.* – 2013. – Vol. 4, № 3. – P. 1 – 3.

95. Dubey N. Cleanig validation for residual estimation of olmesartan medoxomil on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments using swab sampling and HPLC-DAD method / N. Dubey, M. Mandhanya, D. K. Jain // *Bull. Faculty Pharm.* – 2013. – Vol. 51, № 1. – P. 95 – 100.

96. Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous determination of paracetamol and diclofenac potassium on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments / N. N. Sindhur, B. Gouthami, L. Madhuri, N. Krishnaveni, S. N. Meyyanathan, B. Suresh // *J. Chem. Pharm. Research.* – 2012. – Vol. 4, № 3. – P. 1670 – 1675.

97. Akl M. A .The Utility of HPLC-UV cleaning validation for the determination of tirofiban residues / M. A Akl, M. A. Ahmed, A. Ramadan // *J. Chromat. Separation Techniq.* – 2013. – Vol. 4, № 4. – P. 1 – 4.

98. Validation of the removal of acetylsalicylic acid. Recovery and determination of residues on various surfaces by high performance liquid chromatographic / M. J. Nozal, J. L. Bernal, L. Toribio, J. J. Jimenez, M. T. Martin // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – Vol. 870, № 1 – 2. – P. 69 – 75.

99. Development and validation of an HPLC method for the determination of verapamil residues in supports of cleaning procedure / D. M. Milenovic, S. P. Milosevic, S. Lj. Durie, D. C. Naskovic, S. S. Mitic // *J. Anal. Chem.* – 2013. – Vol. 68, № 6. – P. 545 – 551.

100. Cleaning validation of ofloxacin on pharmaceutical manufacturing equipment and validation of desired HPLC method / M. S. Arayne, N. Sultana, S. S. Sajid, S. S. Ali // *J. Pharm. Sci. Tech.* – 2008. – Vol. 62. – P. 353 – 361.

101. Development and validation of a liquid chromatographic method for determination of lacidipine residues on surfaces in the manufacture of pharmaceuticals / M. J. Nozal, J. L. Bernal, J. J. Jimenez, M. T. Martin, F. J. Diez // *J. Chromatogr. A* .– 2004. –Vol. 1024, № 1 – 2. – P. 115 – 122.

102. Klinkenberg R. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of the amlodipine residues on manufacturing equipment surfaces / R. Klinkenberg, B. Strel, A. Ceccato // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2003. –Vol. 32, № 2. – P. 345 – 352.

103. Cleaning validation method for residual estimation of AMC and rutin on surface of pharmaceutical manufacturing equipment with swab sampling technique by using HPLC UV method / N. S. Lakka, S. Y. Reddamoni, V. Prasad, K. Sivakumar // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2014. –Vol. 6, № 1. – P. 409 – 414.

104. Aki A. M. Validation of an HPLC–UV method for the determination of ceftriaxon sodium residues on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments / A. M. Aki, M. A. Ahmed, A. Ramadan // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2011. – Vol.55, № 2. – P. 247 – 252.

105. Bagade S. B. Validation of RP-HPLC method for the determination of phenytion sodium residues on surface of manufacturing equipments and study of its recovery from pharmaceutical formulations / S. B. Bagade, S. S. Deshpane, D. A. Shah // *Der Pharma Chemica.* – 2014. – Vol. 6, № 1. –P. 390 – 395.

106. Modi P. Cleaning method: a validation HPLC method for determination of clobetasol propionate residues on the surface of manufacturing equipment / P. Modi, A. Vairale // *Int. J. Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – Vol. 2, № 2. – P. 133 – 138.

107. Cleaning validation for residual determination of valganciclovir hydrochloride on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments using HPLC-DAD method / G. Yanamadala, V. R. Gupta, P. P. Kumar, N. Lavanya // *Int. J. Res. Parm. Chem.* – 2013. – Vol. 3, № 4. – P. 782 – 789.

108. A validated HPLC method for low determination of pramipexole dihydrochloride on the surface of manufacturing equipment / T. V. Raghava Raju, T.S.S. J. Mohan, P. S. Kumar, I. M. Rao, N. S. Rao // *J. Res. Innov. Pharm. Sci.* – 2013. – Vol. 1, № 2. – P. 19 – 29.

109. Quantitative determination and sampling of azathioprine residues for cleaning validation in production area / T. T. Fazio, A. K.Singh, E. R. M. Kedor-Hackmann, M. I. R. M. Santoro // *J. Pharm. Biomed.Anal.* – 2007. –Vol. 43, № 1. – P. 1495 – 1498.

110. Clening method: residue determination of terbinafine hydrochloride on the surface of manufacturing equipment by RP-UPLC / B. Vukkun, S. Raju, M. Bommagani, A. Vairale // *Int. J. Anal. Bioanal. Chem.* – 2013. – Vol. 3, № 1. – P. 36 – 41.

111. Development and validation of a UPLC method for the determination of duloxetine hydrochloride residues on pharmaceutical manufacturing equipment surfaces / N. Kumar, D. Sangeetha, P. Balakrishna // *Pharm. Methods.* – 2011. – Vol. 2, № 3. – P. 161 – 166.

112. Fekete S. Validated UPLC method of the fast and sensitive determination of steroid residues insupport of cleaning validationin formulation area / S. Fekete, J. Fekete, K. Ganzler // *J. Pharm. Biomed.Anal.* – 2009. – Vol. 49, № 3. – P. 833 – 838.

113. Validation of a liquid chromatographic method for the determination of ranitidine hydrochloride residues on surfaces in the manufacture of pharmaceuticals / M. J. Nozal , J. L. Bernal , L. Toribio , M. T. Martín , F. J. Diez // *J. Chromatogr. A* – 2001. – Vol. 919, № 1. – P. 87 – 93.

114. Development and validation of an LC assay for sumatriptan succinate residues on surfaces in the manufacture of pharmaceuticals / M. J. Nozal, J. L. Bernal, L. Toribio, M. T Martín, F. J. Diez // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2002. – Vol. 30, № 2. – P. 285 – 291.

115. Cleaning level acceptance criteria and a high pressure liquid chromatography procedure for the assay of meclizine hydrochloride residue in

swabs collected from pharmaceutical manufacturing equipment surfaces / T. Mirza, M. J. Lunn, F. J. Keeley, R. C. George, J. R. Bodenmiller // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1999. – Vol. 19. – P. 747 – 756.

116. Lambropoulos J. Development and validation of an HPLC assay for fentanyl, alfentanil, and sufentanil in swab samples / J. Lambropoulos, G.A. Spanos, N.V. Lazaridis // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2000. – Vol. 23. – P. 421 – 428.

117. Shabir G. A. Equipment cleaning validation: developing an HPLC method to determine contamination residues on equipment surfaces / G. A. Shabir // Am. Pharm. Rev. – 2008. – Vol. 11, № 3. – P. 16 – 22.

118. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014 – 2015.

119. Аналитическая химия в создании, стандартизации и контроле качества лекарственных средств: в 3-х томах / Под ред. В. П. Георгиевского – Харьков: изд. «НТМТ», 2011 г. т. 3. – 520 с.

120. Дрейпер Н., Смит Г. Прикладной регрессионный анализ: В 2-х кн. Кн. 1/ Пер. с англ. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: изд. «Финансы и статистика», 1986. – 366 с.

121. Гризодуб А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств/А. И. Гризодуб. – Харьков: Государственное предприятие «Украинский научный фармакопейный центр качества лекарственных средств», 2016. – 396 с.

122. Смирнов Н. В., Дунин-Барковский И. В. Краткий курс математической статистики для технических приложений. – М.: Гос. изд-во физико-математической литературы, 1959. – С. 305.

123. Шторм Р. Теория вероятностей. Математическая статистика. Статистический контроль качества. – М.: Мир, 1970. – С. 207.

124. Эрмер Иоахим, Миллер Джон Х. МакБ. Валидация методик в фармацевтическом анализе Примеры наилучших практик, 1-е изд.: Пер. с англ. – М.: Группа компаний ВИАЛЕК, 2013. – 512 с.
125. Введение в теорию порядковых статистик. Под. ред. А. Я. Боярского –М.: Статистика, 1970. – С. 94.
126. Кобзарь А. И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников. – М.: Гос. изд-во физико-математической литературы, 2006. – С. 399.
127. Новицкий П. В., Зограф И. А. Оценка погрешностей результатов измерений. – 2-е изд., перераб. и доп. Л.: Энергоатомиздат, 1970. – С. 15.
128. Bartolomeo M. P. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis / M. P. Bartolomeo, F. Maisano // J. Biomol. Techniq. – 2006. – Vol.17, №2. – P. 131 – 137.

«Утверждаю»

Директор ФХИ им. А. В. Богатского



[Signature] С.А. Андронати

2014 г.

«Утверждаю»

Генеральный директор ОДО



[Signature] А.С. Редер

2014 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящим актом подтверждается внедрение в практику работы фармацевтического предприятия ОДО «ИНТЕРХИМ» ВЭЖХ методики определения остаточных количеств циназема (левана) в промывных водах и смывах для контроля полноты его удаления при очистке технологического оборудования, используемого при производстве АФИ ЛЕВАНА® и готовых лекарственных средств ЛЕВАНА® IC, таблетки (МКК 06.5/1-205-467), разработанной в отделе аналитической химии и физико-химии координационных соединений ФХИ НАН Украины вед.н.с., д.х.н. А.В. Егоровой, н.с., к.х.н. Ю.В. Скрипинец, м.н.с., к.х.н. И.И. Леоненко и в ОДО «ИНТЕРХИМ» химиком-аналитиком А.А. Федосенко.

Методика отличается высокой чувствительностью и экспрессностью, позволяет определять микроколичества циназема в смывах.

От ФХИ НАН Украины

Вед.н.с., д.х.н.

[Signature] А.В. Егорова

Н.с., к.х.н.

[Signature] Ю.В. Скрипинец

М.н.с., к.х.н.

[Signature] И.И. Леоненко

От ОДО «ИНТЕРХИМ»

Зам. генерального директора по НИР

С.Н. Кашуцкий

Химик-аналитик

А.А. Федосенко

Копія вірна оригіналу з філімпосту
Заст. ген. директора по НДР



[Signature] С.Н. Кашуцкий

«Утверждаю»

Директор ФХИ им. А. В. Богатского

НАН Украины

Академии

НАН Украины

27 10 2015 г.



С.А. Андронати

«Утверждаю»

Генеральный директор ОДО

«ИНТЕРХИМ»

А.С. Редер

2015 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящим актом подтверждается внедрение в практику работы фармацевтического предприятия ОДО «ИНТЕРХИМ» методик люминесцентного (МКК 06.5/1-125.1-598) и ВЭЖХ (МКК 06.5/1-205-597) определения остаточных количеств АФИ флупиртина малеата в смывах для контроля полноты его удаления при очистке технологического оборудования, разработанных в отделе аналитической химии и физико-химии координационных соединений ФХИ НАН Украины вед. н.с., д.х.н. А.В. Егоровой, н.с., к.х.н. Ю.В. Скрипинец, н.с., к.х.н. И.И. Леоненко и в ОДО «ИНТЕРХИМ» старшим химиком-аналитиком А.А. Федосенко.

Методики отличаются высокой чувствительностью и экспрессностью, позволяют определять микроколичества флупиртина малеата в смывах.

От ФХИ НАН Украины

Вед.н.с., д.х.н. *Егорова* А.В. Егорова
 Н.с.; к.х.н. *Скрипинец* Ю.В. Скрипинец
 Н.с., к.х.н. *Леоненко* И.И. Леоненко

От ОДО «ИНТЕРХИМ»

Зам. генерального директора по НИР
Кашуцкий С.Н. Кашуцкий
 Старший химик-аналитик
 А.А. Федосенко

Заст. ген. директора по НИР

*С.Н. Кашуцкий*

«Утверждаю»

Директор ФХИ им. А. В. Богатского

НАН Украины

Академик

НАН Украины

«16»

2016 г.



С.А. Андронатис

«Утверждаю»

Генеральный директор

ОДО

«ИНТЕРХИМ»

А.С. Велер

«16-11»

2016



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящим актом подтверждается внедрение в практику работы фармацевтического предприятия ОДО «ИНТЕРХИМ» валидированной методики спектрофотометрического определения розувастатина кальция в лекарственном препарате Розувастатин IC, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, по 5 мг, 10 мг, 20 мг и 40 мг, разработанной в отделе аналитической химии и физико-химии координационных соединений ФХИ НАН Украины, вед. н.с., д.х.н. А.В. Егоровой, н.с., к.х.н. Ю.В. Скрипинец, н.с., к.х.н. И.И. Леоненко и в ОДО «ИНТЕРХИМ» старшим химиком-аналитиком А.А. Федосенко.

Методика отличается экспрессностью, позволяет количественно определять розувастатин кальция в лекарственном препарате Розувастатин IC, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, по 5 мг, 10 мг, 20 мг и 40 мг, а также может быть использована для исследования профилей растворения.

От ФХИ НАН Украины

Вед. н.с., д.х.н. *Егорова* А.В. ЕгороваН.с., к.х.н. *Скрипинец* Ю.В. СкрипинецН.с., к.х.н. *Леоненко* И.И. Леоненко

От ОДО «ИНТЕРХИМ»

Зам. генерального директора по НИР

С.Н. Кашуцкий

Старший химик-аналитик

А.А. Федосенко

Копія вірна згідно з оригіналом
Заст. ген. директора по НДР *С.Н. Кашуцкий*



«Утверждаю»

Директор ФХИ им. А. В. Богатского

НАН Украины
Академик НАН Украины

С.А. Андронати

2017 г.

«Утверждаю»

Генеральный директор ОДО

«ИНТЕРХИМ»



А.С. Редер

2017 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящим актом подтверждается внедрение в практику работы фармацевтического предприятия ОДО «ИНТЕРХИМ» методик (МКК 06.5/1-205-42; МКК 06.5/1-205-510; МКК 06.5/1-205-795; МКК 06.5/1-205-162; МКК 06.5/1-205-85) ВЭЖХ определения остаточных количеств АФИ парацетамола в смывах для контроля полноты его удаления при очистке технологического оборудования, разработанных в отделе аналитической химии и физико-химии координационных соединений ФХИ НАН Украины вед. н.с., д.х.н. А.В. Егоровой, н.с., к.х.н. Ю.В. Скрипинец и в ОДО «ИНТЕРХИМ» ведущим химиком-аналитиком А.А. Федосенко.

Методики отличаются высокой чувствительностью, экспрессностью и селективностью, позволяет определять микроколичества парацетамола в смывах после очистки технологического оборудования при производстве многокомпонентных лекарственных препаратов, содержащих данный АФИ (ТЕОФЕДРИН ІС, ПЕНТАЛГІН ІС, ПАРАКОД ІС®, АМЦИТРОН® ЕКСТРАТАБ, таблетки и АМЦИТРОН® ПЛЮС від кашлю, порошок для орального розчину по 5 г у саше).

От ФХИ НАН Украины

Вед. н.с., д.х.н. *Егорова* А.В. ЕгороваН.с., к.х.н. *Скрипинец* Ю.В. Скрипинец

От ОДО «ИНТЕРХИМ»

Зам. генерального директора по НИР

Ведущий химик-аналитик

С.Н. Капуцкий

А.А. Федосенко

*Копія вірна згідно з оригіналом
Заст. ген. директора по НДР*

*С.М. Капуцкий*

«Утверждаю»

Директор ФХИ им. А. В. Богатского

НАН Украины

* Академик НАН Украины



С.А. Андронати

2017 г.

«Утверждаю»

Генеральный директор ОДО

«ИНТЕРХИМ»



А.С. Редер

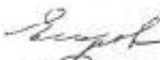
2017 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Настоящим актом подтверждается внедрение в практику работы фармацевтического предприятия ОДО «ИНТЕРХИМ» методики (МКК 06.5/1-205-600) ВЭЖХ определения остаточных количеств АФИ фенибута в смывах для контроля полноты его удаления при очистке технологического оборудования, разработанных в отделе аналитической химии и физико-химии координационных соединений ФХИ НАН Украины вед. н.с., д.х.н. А.В. Егоровой, н.с., к.х.н. Ю.В. Скрипинец и в ОДО «ИНТЕРХИМ» ведущим химиком-аналитиком А.А. Федосенко.

Методика отличаются высокой чувствительностью и экспрессностью, позволяет определять микроколичества фенибута в смывах после очистки технологического оборудования при производстве лекарственных препаратов, содержащих данный АФИ.

От ФХИ НАН Украины

Вед. н.с., д.х.н.  А.В. ЕгороваН.с., к.х.н.  Ю.В. Скрипинец

От ОДО «ИНТЕРХИМ»

Зам. генерального директора по ПИР

 С.Н. Кашуцкий

Ведущий химик-аналитик

А.А. Федосенко

*Юлия Сергеевна Зидно з Скрипинец
Заст. ген. директора по ПИР*

*С.Н. Кашуцкий*

Список публікацій здобувача:

1. Валидация методики ВЭЖХ определения остаточных количеств клофелина гидрохлорида с поверхностей фармоборудования / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Е. О. Витюкова, С. Н. Кашуцкий, Г. В. Мальцев // Вісник Одеського націон. ун-ту. Хімія. – 2014 – Т. 19, вип. 3(51). – С. 40 – 51.
2. Валидация методик контроля качества очистки фармацевтического оборудования / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Аналітика и контроль. – 2015. – Т. 19, № 4. – С. 387 – 395.
3. Определение остаточных количеств сухого экстракта листьев гинкго билоба на поверхностях фармацевтического оборудования методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, С. Н. Кашуцкий, В. П. Антонович // Methods and objects of chem. anal. – 2015. – Vol. 10, №. 4. – P. 183 – 188.
4. Визначення залишкових кількостей глюкози на поверхнях фармобладнання методами поляриметрії та ВЕРХ / **Г. О. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, І. І. Леоненко, А. В. Єгорова, С. М. Кашуцький, В. П. Антонович // Фармацевтичний журнал . – 2015. – № 5 – С. 83 – 89.
5. Определение остаточных количеств розувастатина кальция на поверхностях фармацевтического оборудования методами ВЭЖХ и люминесценции / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, І. І. Леоненко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Журн. анал. химии – 2016. – Т. 71, № 1. – С. 129 – 135.
6. Определение остаточных количеств ривастигмина гидротартрата на поверхностях фармоборудования методами ВЭЖХ и люминесценции / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинець, І. І. Леоненко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Вісник Одеського націон. ун-ту.

Хімія. – 2017. – Т. 22, вип. 1(61). – С. 67 – 78.

7. ВЭЖХ определение L-валина, L-лейцина и L-изолейцина с использованием предколоночной дериватизации ди-трет-бутилдикарбонатом / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, С. Н. Кашуцкий, В. П. Антонович // Methods and objects of chem. anal. – 2017. – Vol. 12, № 2. – P. 91 – 98.

8. Пат. 108176 Україна МПК G01N33/15, G01N33/50 Спосіб кількісного визначення кверцетину / Єгорова А. В., **Федосенко Г. О.**, Мальцев Г. В., Кашуцький С. М., Антонович В. П.; заявник та патентовласник Одеса, ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України, – № U 2015 12228; заявл. 10.12.2015; опубл. 11.07.2016, Бюл. № 13.

9. Пат. 120119 Україна МПК G01N30/00, G01N30/02, G01N33/15, Спосіб кількісного визначення амінокислот / Єгорова А. В., **Федосенко Г. О.**, Мальцев Г. В., Кашуцький С. М., Антонович В. П.; заявник та патентовласник Одеса, ФХІ ім. О.В. Богатського НАН України, – № U 2017 03754; заявл. 18.04.2017; опубл. 25.10.2017, Бюл. № 20.

10. Валідація люмінесцентної методики визначення флупіртину малеату в змивах з поверхні фармобладнання / І. І. Леоненко, Ю. В. Скрипинець, Г. В. Анельчик, А. В. Єгорова, **Г. О. Федосенко** // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції. – Київ, 9 – 12 червня, 2014. – С. 187.

11. Определение левана методом ВЭЖХ в смывах с поверхностей фармоборудования / Е. О. Витюкова, А. В. Егорова, О. Д. Войтюк, **А. А. Федосенко** // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції. – Київ, 9 – 12 червня, 2014. – С. 193.

12. **Федосенко А. А.** Валідація методики ВЭЖХ определения остаточных количеств клофелина гидрохлорида с поверхностей фармоборудования / **А. А. Федосенко**, Е. О. Витюкова, Г. В. Мальцев // Тези

доповідей VII Всеукраїнської наукової конференції студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання – 2015» – Харків, 20 – 22 квітня, 2015. – С. 100 – 101.

13. Определение остаточных количеств розувастатина кальция на поверхностях фармоборудования методами ВЭЖХ и люминесценции / **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинец, И. И. Леоненко, Г. В. Мальцев // Теоретическая и экспериментальная химия глазами молодежи – 2015. Тезисы докладов Международной научной конференции, посвященной 70-летию Победы в Великой Отечественной войне. Иркутск, 18 – 22 мая, 2015. – С. 105 – 106.

14. Luminescence method for determination of abiraterone acetate residues on the surface of manufacturing equipment / **G. Fedosenko**, I. Leonenko, Yu. Scrypynets, A. Yegorova // Abstracts and programme of 7th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry. – Varna, Bulgaria, 10 – 15 september, 2015. – P. 103.

15. Валидація методик контролю качества очистки фармацевтического оборудования / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції – Київ, 7 – 9 жовтня, 2015. – С. 142 – 143.

16. Валидація методики определения остаточных количеств цинхокаина гидрохлорида методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Управління якістю в фармації: збірник наукових робіт X Науково-практичної конференції – Харків, 20 травня, 2016. – С. 170 – 173.

17. Валидація методик высокочувствительного определения остаточных количеств ряда лекарственных препаратов на поверхностях фармацевтического оборудования / **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинец, И. И. Леоненко, А. В. Анельчик // Тезисы докладов XVII Конференции

молодых учёных и студентов-химиков южного региона Украины с международным участием. – Одесса, 28 – 30 апреля, 2015. – С. 28.

18. Контроль очистки поверхностей фармоборудования при производстве многокомпонентных препаратов / А. В. Егорова, **А. А. Федосенко**, Ю. В. Скрипинец, И. И. Леоненко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції – Київ, 18 – 22 жовтня, 2016. – С. 93 – 94.

19. Валидация ВЭЖХ и люминесцентной методик определения остаточных количеств ривастигмина гидротартрата на поверхностях фармоборудования / **А. А. Федосенко**, А. В. Егорова, Ю. В. Скрипинец, И. И. Леоненко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Тези доповідей ІХ Всеукр. наук. конф. студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання». – Харків, 18 – 20 квітня, 2017. – С. 83 – 84.

20. Determination of fenspiride hydrochloride residues on pharmaceutical manufacturing equipment surfaces by HPLC method / **G. Fedosenko**, A. Yegorova, Yu. Scrypynets, I. Leonenko, E. Vitukova // Abstracts of IXth International conference in chemistry Kyiv-Toulouse – Kyiv-Toulouse, 4 – 9 June, 2017. – P. 246.

21. Валідація АЕС-ІСП методики визначення калію та натрію в змивах з поверхонь фармобладнання / А. В. Єгорова, **Г. О. Федосенко**, І. П. Гончаренко, В. П. Антонович // Тези доповідей Київської конференції з аналітичної хімії. Сучасні тенденції – Київ, 18 – 21 жовтня, 2017. – С. 164 – 165.

Додаток 3

Таблиця 3.1 Д.

Аналітичні характеристики розроблених методик

АФІ	Метод	Діапазон методики, мкг/мл	ГДК, мкг/мл	МКВ, мкг/мл		SF, %
				вимога	факт.	
Тилорон	СФ	0,1 – 5,0	2,50	0,800	0,151	0,031
L-5-гідрокси триптофан	СФ	1,0 – 24,0	20,00	6,400	0,672	0,294
Колаген	СФ	2,0 – 30,0	20,00	6,400	5,690	0,037
Бензобітал	СФ	0,1 – 7,0	5,00	1,600	0,273	0,074
Розувастатин кальцію	ВЕРХ	0,01 – 1,0	0,50	0,160	0,016	0,035
	Люмінесценція	0,1 – 10,0	4,00	1,280	0,726	0,282
Флупіртину maleat	Люмінесценція	0,01 – 0,5	0,25	0,080	0,034	0,004
Абіратерону ацетат	Люмінесценція	0,05 – 7,0	5,00	1,600	0,390	0,029
Ривастигміну гідротартрат	Люмінесценція	0,5 – 20,0	7,00	2,240	1,527	0,515
	ВЕРХ	0,5 – 50,0	5,00	1,600	1,144	0,368
Глюкоза	поляриметрия	0,5 – 12,0	10,00	3,200	0,854	0,029
	ВЕРХ рефракт. детектор	0,005 – 2,0	0,55	0,176	0,042	0,002
Калій	АЕС-ІСП	50 – 5000*	2500*	800*	624*	0,074
Натрій	АЕС-ІСП	50 – 5000*	2500*	800*	268*	0,074
Силденафілу цитрат	ВЕРХ	0,1 – 10,0	8,00	2,560	0,080	0,084
Фенспіриду гідрохлорид	ВЕРХ	0,5 – 100,0	10,00	3,200	1,250	0,092
Клонідину гідрохлорид	ВЕРХ	0,1 – 6,0	0,40	0,128**	0,080**	0,980
Левана	ВЕРХ	0,1 – 1,2	0,80	0,256	0,033	0,294
Даклатасвіру дигідрохлорид	ВЕРХ	0,025 – 5,0	2,50	0,800	0,059	0,031
Фенібут	ВЕРХ	0,1 – 2,4	2,00	0,640	0,247	0,002
Парацетамол (АМЦИТРОН®, саше)	ВЕРХ	0,2 – 20,0	5,00	1,600	0,132	0,007
Парацетамол (АМЦИТРОН® ПЛЮС, саше)	ВЕРХ	0,05 – 5,0	2,50	0,800	0,050	0,007
Гвайфенезин	ВЕРХ	0,02 – 2,0	0,40	0,128	0,004	0,006

Таблиця 3.1 Д. (продовження)

АФІ	Метод	Діапазон методики мкг/мл	ГДК, мкг/мл	МКВ, мкг/мл		SF, %
				вимога	факт.	
Парацетамол (ТЕОФЕДРИН ІС [®] , таблетки)	ВЕРХ	0,05 – 10,0	5,00	1,600	0,080	0,007
Теофілін	ВЕРХ	0,05 – 10,0	2,00	0,640	0,127	0,029
Парацетамол (АМІЦИТРОН [®] ЕКСТРАТАБ, таблетки)	ВЕРХ	0,015 – 7,5	1,50	0,480	0,014	0,004
Парацетамол (ПЕНТАЛГІН ІС [®] , таблетки)	ВЕРХ	0,05 – 10,0	5,00	1,600	0,083	0,007
Деквалінію хлорид	ВЕРХ	0,05 – 0,75	0,50	0,160	0,080	0,998
Цинхокаїнугідр охлорид	ВЕРХ –масс- детектор	0,006 – 0,114	0,06	0,019	0,006	1,000
Метамізол натрію	ВЕРХ	0,025 – 3,5	2,50	0,800	0,208	0,015
L-лейцин	ВЕРХ	3,0 – 300	150,00	48,000	10,809	0,221
L-валін	ВЕРХ	1,5 – 150	75,00	24,000	4,892	0,221
L-ізолейцин	ВЕРХ	1,5 – 150	75,00	24,000	3,647	0,221
Кверцетин	ВЕТІХ	10,0 – 50,0 ^{***}	40,0	13,8	13,521	0,100

* – одиниця виміру –мкг/л.

** для клонідину наведено максимальне допустиме значення межі виявлення (МВ) оскільки чутливість методики дозволяє проводити тільки граничні випробування

*** – одиниця виміру – нг/пляму.

Слід звернути увагу, що в деяких випадках у розроблених методиках МКВ незначно перевищує нижню межу аналітичного діапазону концентрацій. Це, однак, не означає, що на відрізьку від МКВ до мінімальної концентрації діапазону не можна вести визначення аналіту. МКВ – це розрахункова величина, яка визначається з параметрів лінійної регресії та, таким чином, в загальному випадку залежить як від розкиду точок щодо всієї оціночної лінії регресії, так і від побудови діапазону визначення. По суті МКВ – є довірчий інтервал для статистично нульової концентраційної точки, розрахований з високою вірогідністю «10 сигма». Єдиною вимогою практичного застосування зазначених аналітичних діапазонів, є вимога того, щоб розраховане значення МКВ не перевищувало 32% від ГДК аналіту. У роботі доводиться, що така умова забезпечує кількісне визначення аналіту з встановленою прецизійністю та правильністю за регламентованих умов на всьому діапазоні застосування методики.

Валідаційні характеристики методик та їх критерії прийнятності

АФІ		$\Delta_x, \%$		r		$S_e, \%$		$ a , \%$			$ 1 - b , \%$	
		вимога	факт.	вимога	факт.	вимога	факт.	max $ a $	$\Delta_a, \%$	факт.	$\Delta_b, \%$	факт.
Тилорон		7,7	1,3	0,99626	0,99988	6,65	1,19	8,64	1,54	0,40	0,01775	0,00689
L-5-гідрокситриптофан		6,1	5,8	0,99261	0,99992	5,37	0,56	7,71	0,80	0,40	0,01124	0,00674
Колаген		4,4	0,9	0,99443	0,99576	5,22	4,37	7,49	6,26	3,45	0,07184	0,04604
Бензобітал		9,2	0,8	0,99212	0,99979	6,95	1,13	8,15	1,32	0,45	0,02029	0,01020
Розувастатин кальцію	ВЕРХ	7,9	2,0	0,99633	0,99997	6,80	0,64	8,66	0,81	0,50	0,00921	0,00882
	люм, [*]	4,7	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Флупіртину малеат (люм.)		5,7	0,7	0,99442	0,99905	6,80	2,74	7,56	3,05	1,77	0,03465	0,02668
Абіраторону ацетат		7,4	1,5	0,98855	0,99935	7,83	1,84	7,29	1,72	0,58	0,02505	0,01167
Ривастигміну гідротартрат	люм,	6,3	1,9	0,99885	0,99951	5,52	3,45	9,32	5,82	4,00	0,04162	0,03859
	ВЕРХ	7,0	1,3	0,99975	0,99988	8,22	5,56	7,91	5,34	2,97	0,01347	0,01307
Глюкоза	поляриметрія	4,9	1,5	0,99523	0,99967	4,66	1,22	7,98	2,09	0,07	0,02554	0,00099
	ВЕРХ	6,9	2,1	0,99885	0,99994	7,14	1,62	8,70	1,98	0,36	0,01254	0,00379
Калій		9,0	1,9	0,99823	0,99908	5,80	4,44	10,99	8,42	3,92	0,08374	0,05907
Натрій		9,0	1,0	0,99823	0,99983	5,80	1,83	10,99	3,48	1,22	0,03458	0,01831
Силденафілу цитрат		9,5	1,2	0,98733	0,99999	7,63	0,23	7,61	0,23	0,08	0,00392	0,00202
Фенспіриду гідрохлорид		6,5	1,4	0,99961	0,99994	8,95	3,36	7,49	2,81	1,03	0,00789	0,00500
Клонідину гідрохлорид		20,7	0,4	0,99945	0,99998	20,33	4,10	22,68	4,58	0,66	0,00547	0,00105
Левана		4,1	1,3	0,99582	0,99993	4,81	0,61	7,68	0,97	0,60	0,01034	0,00737
Даклатасвіру дигідрохлорид		8,8	3,6	0,99324	0,99997	8,24	0,58	7,91	0,56	0,03	0,00735	0,00064
Фенібут		6,3	1,2	0,99278	0,99897	5,65	2,13	7,73	2,91	0,20	0,04044	0,00336

Валідаційні характеристики методик та їх критерії прийнятності

АФІ	$\Delta_x, \%$		r		$S_e, \%$		$ a , \%$			$ 1 - b , \%$	
	вимога	факт.	вимога	факт.	вимога	факт.	max $ a $	$\Delta_a, \%$	факт.	$\Delta_b, \%$	факт.
Парацетамол (АМІЦИТРОН [®] , саше)	6,4	1,8	0,99866	0,99999	8,12	0,64	7,90	0,62	0,34	0,00365	0,00338
Парацетамол (АМІЦИТРОН [®] ПЛЮС, саше)	8,8	0,9	0,99156	0,99997	8,64	0,52	7,67	0,46	0,22	0,00637	0,00529
Гвайфенезин	6,3	1,2	0,99865	1,00000	8,64	0,25	7,67	0,22	0,06	0,00122	0,00056
Парацетамол (ТЕОФЕДРИН ІС [®] , таблетки)	7,9	1,9	0,99239	0,99998	8,15	0,39	7,64	0,37	0,02	0,00485	0,00032
Теофілін	6,0	1,5	0,99879	0,99996	8,15	1,57	7,64	1,47	0,19	0,00772	0,00162
Парацетамол (АМІЦИТРОН [®] ЕКСТРАТАБ, таблетки)	7,6	1,4	0,99922	1,00000	7,80	0,21	8,79	0,24	0,03	0,00125	0,00035
Парацетамол (ПЕНТАЛГІН ІС [®] , таблетки)	8,2	0,3	0,99066	0,99998	8,63	0,43	7,47	0,37	0,23	0,00513	0,00504
Деквалінію хлорид	5,6	5,5	0,99495	0,99875	5,02	2,65	7,83	3,99	3,92	0,05109	0,02381
Цинхокаїну гідрохлорид	3,9	1,5	0,99722	0,99971	4,90	1,56	7,69	2,45	2,06	0,02126	0,02062
Метамізол натрію	6,8	2,6	0,99055	0,99939	7,17	1,78	7,40	1,84	1,02	0,02575	0,01894
L-лейцин	6,7	1,3	0,99564	0,99979	7,45	1,62	7,85	1,71	0,10	0,01813	0,00155
L-валін	6,7	0,8	0,99564	0,99983	7,45	1,46	7,85	1,54	0,00	0,01638	0,00006
L-ізолейцин	6,7	1,2	0,99564	0,99991	7,45	1,10	7,85	1,16	0,44	0,01230	0,00708
Кверцетин	5,4	0,9	0,99766	0,99752	3,12	3,24	10,42	10,81	0,38	0,13040	0,00508

* – для люмінесцентної методики не розраховувалися валідаційні критерії, оскільки залежність аналітичного сигналу від концентрації нелінійна

Ступінь вилучення

АФІ	Ступінь вилучення (k), %					RSD, %	Δ_k
	1	2	3	4	5		
Тилорон	98,36	95,92	97,63	98,21	96,45	1,11	1,3
L-5-гідрокситриптофан	75,58	87,17	86,04	79,96	82,15	5,72	5,8
Колаген	92,18	90,78	90,45	91,26	92,04	0,83	0,9
Бензобітал	95,54	96,72	97,11	95,94	96,30	0,64	0,8
Розувастатин кальцію (люм.)	90,94	95,62	92,54	93,23	94,67	1,96	2,27
Розувастатин кальцію (ВЕРХ)	93,25	95,30	96,81	97,14	95,23	1,62	1,92
Флупіртин малеат	97,05	96,85	96,17	97,31	97,73	0,60	0,7
Абіраторону ацетат	82,34	85,11	82,93	82,65	81,97	1,48	1,5
Ривастигміну гідротартрат (люм.)	82,57	81,94	80,32	83,89	84,01	1,84	1,9
Ривастигміну гідротартрат (ВЕРХ)	82,57	83,14	84,32	84,89	85,01	1,29	1,3
Глюкоза (поляриметрия)	93,98	93,54	95,44	95,90	96,21	1,25	1,5
Глюкоза (ВЕРХ)	91,52	93,49	95,67	92,55	95,08	1,84	2,1
Калій	98,62	95,80	99,21	98,76	99,59	1,52	1,9
Натрій	97,51	99,63	98,40	98,33	99,15	0,83	1,0
Силденафілу цитрат	96,81	97,53	99,14	98,91	97,70	1,00	1,2
Фенспіриду гідрохлорид	92,09	92,49	93,01	90,04	91,82	1,23	1,4
Клофеліну гідрохлорид	95,49	95,83	96,28	95,74	96,12	0,33	0,4
Левана	92,84	94,12	95,73	93,95	93,59	1,13	1,3
Даклатасвіру дигідрохлорид	91,58	88,65	93,78	95,67	89,49	3,18	3,6
Фенібут	98,17	99,94	100,04	98,02	99,53	0,98	1,2
Парацетамол (АМЦИТРОН [®] , саше)	85,64	88,01	89,33	87,61	86,54	1,62	1,8
Парацетамол (АМЦИТРОН [®] ПЛЮС, саше)	96,97	98,59	96,84	97,43	97,60	0,71	0,9
Гвайфенезин	98,17	99,53	99,84	97,48	98,23	1,01	1,2
Парацетамол (ТЕОФЕДРИН ІС [®] , таблетки)	88,18	91,23	90,56	92,21	89,74	1,69	1,9
Теофілін	93,43	91,28	94,56	92,77	93,14	1,28	1,5
Парацетамол (АМЦИТРОН [®] ЕКСТРАТАБ, таблетки)	93,56	92,89	93,41	93,06	95,74	1,23	1,4
Парацетамол (ПЕНТАЛГІН ІС [®] , таблетки)	99,82	99,31	99,90	99,45	99,89	0,28	0,3
Деквалінію хлорид	74,47	80,07	74,47	79,23	68,99	5,90	5,5
Цинхокаїну гідрохлорид	85,21	86,32	87,12	87,55	88,41	1,40	1,5
Метамізол натрію	80,63	84,20	82,14	85,50	85,34	2,53	2,6
L-лейцин	90,02	92,61	90,34	91,50	90,81	1,13	1,3
L-валин	91,70	91,92	92,10	91,41	93,13	0,71	0,8
L-ізолейцин	91,21	93,20	91,72	93,52	92,81	1,07	1,2
Кверцетин	95,20	95,00	96,31	96,10	96,72	0,77	0,9