

Тернопільський національний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України

Тернопільський національний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГАВРИЛЕНКО Олександра Віталіївна

УДК 615.073/074:543.544.5.068.7:615.3(043.3)

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ АНАЛІТИЧНИХ МЕТОДИК
КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ
ІНГРЕДІЄНТІВ І СУПРОВІДНИХ ДОМІШОК У
БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА
ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ЗІ СКЛАДНОЮ МАТРИЦЕЮ**

226 «Фармація, промислова фармація»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О. В. Гавриленко

Науковий керівник: **Логойда Лілія Святославівна**, доктор фармацевтичних
наук, професор

Тернопіль – 2026

АНОТАЦІЯ

Гавриленко О. В. Розробка та оптимізація аналітичних методик кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів і супровідних домішок у багатокомпонентних лікарських засобах та лікарських засобах зі складною матрицею. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 «Охорона здоров'я»). – Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, 2026.

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України, Тернопіль, 2026.

У дисертаційній роботі наведено теоретичне та експериментальне вирішення актуального наукового завдання щодо удосконалення аналітичного контролю якості багатокомпонентних лікарських засобів та лікарських засобів зі складною матрицею шляхом розробки й оптимізації методик кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів, супровідних домішок та однорідності дозованих одиниць. Мета дослідження – розробка, оптимізація та валідація аналітичних методик кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів і супровідних домішок у багатокомпонентних лікарських засобах та лікарських засобах зі складною матрицею.

Першим етапом роботи була розробка хроматографічних методик для рутинного застосування у лабораторіях контролю якості для комбінованого порошку, що містить парацетамол, фенілефрину гідрохлорид та феніраміну maleat. Для визначення супровідної домішки парацетамолу (4-амінфенолу) було розроблено точну, селективну та «зелену» ВЕРХ-методику. Для розділення використовували колонку Zorbax SB-Aq (50 мм × 4,6 мм, 5 мкм). Рухома фаза складалася з 1,1 г/л розчину натрію октансульфонату (рН 3,2) та метанолу. Елюювання проводили у градієнтному режимі. Швидкість потоку

становила 1,0 мл/хв, температура колонки – 40 °С, об'єм інжекції – 10 мкл. Довжина хвилі детектування – 225 нм. Загальний час аналізу становив 20 хв. Встановлено, що використання іон-парного реагенту (натрію октансульфонату) забезпечує ефективне розділення полярних компонентів та покращення симетрії піків. Проведено валідацію методики. Даних щодо впливу компонентів плацебо не виявлено. Методика була лінійною у діапазоні застосування, прецизійність та правильність відповідали критеріям прийнятності. Межа кількісного визначення домішки 4-амінфенолу становила 0,02 %.

Для кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату в порошку було розроблено експресну ВЕРХ-методику з використанням тієї ж рухомої фази, але з модифікованим градієнтним режимом та довжиною хвилі 273 нм. Час утримування компонентів становив близько 2,6 хв для парацетамолу, 4,3 хв для фенілефрину гідрохлориду та 5,6 хв для феніраміну малеату. Загальний час аналізу становив 10 хв. Обрані хроматографічні умови дозволили значно скоротити час аналізу порівняно з розробленими раніше методиками. Проведено валідацію методики. Методика була специфічною, лінійною, точною та прецизійною. ВЕРХ-методика відповідає встановленим вимогам та може використовуватись для контролю якості комбінованого порошку за показниками «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць».

Проведено порівняльну оцінку тривалості аналітичного контролю комбінованого лікарського засобу до та після оптимізації методик. Для кількісного визначення скорочення часу одного хроматографування з 22 хв до 10 хв дозволило зменшити загальну тривалість аналізу з 352 хв до 160 хв, для випробування «Однорідність дозованих одиниць» – з 550 хв до 250 хв. Для визначення 4-амінфенолу скорочення часу хроматографування з 38 хв до 20 хв забезпечило зменшення загальної тривалості аналізу з 304 хв до 160 хв.

Сумарний час виконання зазначених випробувань скорочено з 1206 хв до 570 хв, тобто на 636 хв або 52,7 %.

Наступним етапом роботи була розробка методик для контролю якості нафтифіну гідрохлориду у лікарських формах розчину та крему. Для визначення супровідних домішок було розроблено градієнтну ВЕРХ-методику з використанням колонки Synergi Hydro-RP (250 мм × 4,6 мм, 4 мкм). Рухома фаза складалася з буферного розчину (рН 6,5), що містив натрію октансульфонат, та ацетонітрилу. Швидкість потоку становила 1,0 мл/хв, температура колонки – 40 °С, довжина хвилі детектування – 270 нм. Загальний час аналізу становив близько 55 хв. Встановлено, що вибір рН буферного розчину суттєво впливає на розділення домішок та симетрію піків. Проведено оптимізацію умов хроматографування, що дозволило досягти необхідної селективності навіть у присутності компонентів кремової матриці. Особливу увагу приділено вибору розчинника та пробопідготовці для крему, оскільки матриця значно впливає на результати аналізу. Встановлено, що ацетонітрil забезпечує стабільність розчину та відсутність деградації компонентів. Проведено валідацію методики. Методика відповідає вимогам щодо специфічності, лінійності, точності та прецизійності.

Порівняно з фармакопейною методикою USP запропоновані умови дозволили скоротити тривалість кондиціонування хроматографічної колонки з 240 хв до 30 хв, час хроматографування – з 10 хв до 6 хв та зменшити швидкість потоку рухомої фази з 2,0 мл/хв до 1,0 мл/хв. Оптимізація забезпечила зменшення витрат рухомої фази та органічних розчинників при збереженні належних метрологічних характеристик методики.

Для кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду у розчині та кремі було розроблено ізократичну ВЕРХ-методику з використанням колонки Gemini C18 (50 мм × 4,6 мм, 3 мкм). Рухома фаза складалася з розчину амонію ацетату та метанолу (30:70). Довжина хвилі детектування – 254 нм, швидкість потоку – 1,0 мл/хв. Час аналізу становив близько 6 хв. Проведено валідацію

методики. Методика відповідає встановленим вимогам та може використовуватись для контролю якості лікарських форм.

У роботі також проведено дослідження профілю деградації нафтифіну гідрохлориду як етап розробки методик визначення супровідних домішок. Встановлено, що найбільш значний вплив на деградацію чинять окиснювальні процеси. Виявлено утворення продуктів деградації та охарактеризовано зміни хроматографічного профілю. Отримані результати використано для розробки селективних методик контролю домішок.

Встановлено стійкість нафтифіну гідрохлориду за умов кислотного та лужного гідролізу, термічного і світлового впливу, тоді як найбільш виражені зміни спостерігали за окиснювального стресу. Проведені дослідження дозволили оцінити деградаційну поведінку нафтифіну гідрохлориду та підтвердити здатність розробленої методики розділяти основну речовину, супровідні домішки і продукти деградації.

Показано, що розробка аналітичних методик для багатокомпонентних лікарських засобів та лікарських форм зі складною матрицею потребує індивідуального підходу з урахуванням фізико-хімічних властивостей компонентів, їх концентрацій та складу допоміжних речовин. Особливі труднощі виникають при визначенні домішок на низьких рівнях у присутності компонентів плацебо, що можуть створювати інтерференції.

Екологічність розроблених методик оцінено із застосуванням сучасних підходів аналітичної «зеленої» хімії. Для методик контролю комбінованого лікарського засобу значення MoGAPI становили 82 бали для кількісного визначення та 80 балів для визначення супровідних домішок, а інтегральний показник AGREE – 0,79. Для розробленої методики кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду показник MoGAPI становив 82 бали порівняно з 64 балами для фармакопейної методики USP. Отримані результати підтверджують покращення екологічного профілю запропонованих аналітичних методик.

Усі розроблені методики були валідовані відповідно до вимог ІСН за показниками специфічності, лінійності, правильності, прецизійності та робастності. Отримані результати підтверджують їх придатність для рутинного застосування у лабораторіях контролю якості.

Для методики визначення 4-амінфенолу коефіцієнт кореляції становив 0,99949, а межа кількісного визначення – 0,02 %. Для методики одночасного кількісного визначення компонентів комбінованого препарату коефіцієнти кореляції становили 0,99982-0,99994, а відносне стандартне відхилення результатів 12 паралельних визначень – 0,8-1,2 %. Для кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду коефіцієнт кореляції становив 0,99954, а відносне стандартне відхилення – 0,558 % для розчину та 0,776 % для крему. Отримані результати підтвердили належні метрологічні характеристики розроблених методик.

Розроблені аналітичні методики є простими, експресними, економічно доступними та екологічно орієнтованими. Вони дозволяють скоротити час аналізу, зменшити витрати розчинників та підвищити ефективність контролю якості лікарських засобів. Практичне значення одержаних результатів підтверджено їх впровадженням у діяльність АТ «Фармак». Впроваджено методики кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату і визначення 4-амінфенолу у комбінованому лікарському засобі. Розроблені методики кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду та контролю його супровідних домішок у лікарських формах розчину та крему перебувають на етапі впровадження у практичну діяльність АТ «Фармак».

Ключові слова: аналіз, парацетамол, фенілефрину гідрохлорид, феніраміну малеат, нафтифіну гідрохлорид, лікарські форми, порошки, крем, валідація, високоефективна рідинна хроматографія.

ANNOTATION

Havrylenko O. V. Development and optimization of analytical methods for the quantitative determination of active pharmaceutical ingredients and related impurities in multicomponent medicinal products and medicinal products with complex matrices. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Dissertation for obtaining the degree of Doctor of Philosophy in specialty 226 “Pharmacy, Industrial Pharmacy” (22 “Healthcare”). – I. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, 2026.

I. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2026.

The dissertation presents a theoretical and experimental solution to a relevant scientific task aimed at improving the analytical quality control of multicomponent medicinal products and medicinal products with complex matrices through the development and optimization of methods for the quantitative determination of active pharmaceutical ingredients, related impurities, and uniformity of dosage units. The aim of the study was to develop, optimize, and validate analytical methods for the quantitative determination of active pharmaceutical ingredients and related impurities in multicomponent medicinal products and medicinal products with complex matrices.

The first stage of the work was the development of chromatographic methods for routine application in quality control laboratories for a combined powder containing paracetamol, phenylephrine hydrochloride and pheniramine maleate. For the determination of the related impurity of paracetamol (4-aminophenol), an accurate, selective and “green” HPLC method was developed. A Zorbax SB-Aq column (50 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for separation. The mobile phase consisted of a 1.1 g/L solution of sodium octanesulfonate (pH 3.2) and methanol. Elution was performed in a gradient mode. The flow rate was 1.0 mL/min, column temperature – 40 °C, injection volume – 10 μL. The detection wavelength was

225 nm. The total analysis time was 20 min. It was established that the use of an ion-pair reagent (sodium octanesulfonate) provides effective separation of polar components and improves peak symmetry. The method was validated. No interference from placebo components was observed. The method was linear within the application range, precision and accuracy met the acceptance criteria. The limit of quantification of 4-aminophenol impurity was 0.02 %.

For the quantitative determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride and pheniramine maleate in the powder, a rapid HPLC method was developed using the same mobile phase but with a modified gradient mode and detection wavelength of 273 nm. The retention times of the components were approximately 2.6 min for paracetamol, 4.3 min for phenylephrine hydrochloride and 5.6 min for pheniramine maleate. The total analysis time was 10 min. The selected chromatographic conditions made it possible to significantly reduce the analysis time compared to previously developed methods. The method was validated. The method demonstrated adequate specificity, linearity, accuracy, and precision. The HPLC method meets the established requirements and can be used for quality control of the combined powder according to the indicators “Assay” and “Uniformity of dosage units”.

A comparative assessment of the duration of analytical control of the combined medicinal product before and after method optimization was performed. For the assay, reducing the duration of a single chromatographic run from 22 min to 10 min decreased the total analysis time from 352 min to 160 min, while for the “Uniformity of Dosage Units” test it decreased from 550 min to 250 min. For the determination of 4-aminophenol, reducing the chromatographic run time from 38 to 20 min decreased the total analysis time from 304 min to 160 min. The total time required to perform these tests was reduced from 1206 min to 570 min, i.e., by 636 min or 52.7 %.

The next stage of the work was the development of methods for quality control of naftifine hydrochloride in dosage forms of solution and cream. For the

determination of related impurities, a gradient HPLC method was developed using a Synergi Hydro-RP column (250 mm × 4.6 mm, 4 µm). The mobile phase consisted of a buffer solution (pH 6.5) containing sodium octanesulfonate and acetonitrile. The flow rate was 1.0 mL/min, column temperature – 40 °C, detection wavelength – 270 nm. The total analysis time was about 55 min. It was established that the choice of buffer pH significantly affects the separation of impurities and peak symmetry. Optimization of chromatographic conditions was carried out, which made it possible to achieve the required selectivity even in the presence of components of the cream matrix. Particular attention was paid to the selection of solvent and sample preparation for the cream, since the matrix significantly affects the analysis results. It was established that acetonitrile ensures solution stability and absence of component degradation. The method was validated. The method meets the requirements for specificity, linearity, accuracy and precision.

For the quantitative determination of naftifine hydrochloride in solution and cream, an isocratic HPLC method was developed using a Gemini C18 column (50 mm × 4.6 mm, 3 µm). The mobile phase consisted of ammonium acetate solution and methanol (30:70). The detection wavelength was 254 nm, flow rate – 1.0 mL/min. The analysis time was about 6 min. The method was validated. The method meets the established requirements and can be used for quality control of dosage forms.

Compared with the USP compendial method, the proposed conditions reduced the chromatographic column conditioning time from 240 min to 30 min and the chromatographic run time from 10 min to 6 min, while the mobile-phase flow rate was reduced from 2.0 mL/min to 1.0 mL/min. The optimization resulted in reduced consumption of the mobile phase and organic solvents while maintaining appropriate metrological characteristics of the method.

The work also includes a study of the degradation profile of naftifine hydrochloride as a stage in the development of methods for determining related impurities. It was established that oxidative processes have the most significant

effect on degradation. Formation of degradation products was observed, and changes in the chromatographic profile were characterized. The obtained results were used for the development of selective methods for impurity control.

Naftifine hydrochloride was found to be stable under acidic and alkaline hydrolysis, thermal stress, and light exposure, whereas the most pronounced changes were observed under oxidative stress conditions. These studies enabled the degradation behavior of naftifine to be assessed and confirmed the ability of the developed method to separate the active substance, related impurities, and degradation products.

It was shown that the development of analytical methods for multicomponent medicinal products and dosage forms with complex matrices requires an individual approach taking into account the physicochemical properties of the components, their concentrations and the composition of excipients. Particular difficulties arise in the determination of impurities at low levels in the presence of placebo components that may cause interferences.

The environmental performance of the developed methods was assessed using modern green analytical chemistry assessment tools. For the methods used to control the combined medicinal product, the MoGAPI scores were 82 for the assay method and 80 for the related impurities method, while the overall AGREE score was 0.79. For the developed method for the assay of naftifine hydrochloride, the MoGAPI score was 82 compared with 64 for the USP compendial method. The obtained results confirm the improved environmental profile of the proposed analytical methods.

All developed methods were validated in accordance with ICH requirements for specificity, linearity, accuracy, precision and robustness. The obtained results confirm their suitability for routine application in quality control laboratories.

For the 4-aminophenol determination method, the correlation coefficient was 0.99949 and the limit of quantification was 0.02 %. For the simultaneous assay of the components of the combined medicinal product, the correlation coefficients

ranged from 0.99982 to 0.99994, while the relative standard deviation for 12 replicate determinations ranged from 0.8 % to 1.2 %. For the assay of naftifine hydrochloride, the correlation coefficient was 0.99954, while the relative standard deviation was 0.558 % for the solution and 0.776 % for the cream. These results confirmed the appropriate metrological characteristics of the developed methods.

The developed analytical methods are simple, rapid, cost-effective and environmentally friendly. They allow reducing the analysis time, decreasing solvent consumption and increasing the efficiency of quality control of medicinal products. The practical significance of the obtained results was confirmed by their implementation at JSC “Farmak”. The methods implemented included the assay of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, and pheniramine maleate and the determination of 4-aminophenol in the combined medicinal product. The developed methods for the quantitative determination of naftifine hydrochloride and the control of its related impurities in solution and cream dosage forms are currently at the stage of implementation into the routine practice of JSC “Farmak”.

Keywords: analysis, paracetamol, phenylephrine hydrochloride, pheniramine maleate, naftifine hydrochloride, dosage forms, powders, cream, validation, high-performance liquid chromatography.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Havrylenko O, Kondratova Y, Ivanets L, Berdey I, Logoyda L. Optimization of HPLC methods for the development of quality control methods of combined powder formulations with paracetamol, phenylephrine hydrochloride, pheniramine maleate. BMC Chemistry. 2025;19(1):145. doi: 10.1186/s13065-025-01488-0. **(SCOPUS, Q2)**. *(Havrylenko O. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала*

статтю; Kondratova Y., Ivanets L., Berdey I., Logoyda L. провели консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування статті).

2. Гавриленко ОВ, Логойда ЛС. Вивчення впливу стресових факторів на стабільність нафтифіну гідрохлориду у кремовій лікарській формі як частина розробки аналітичної методики контролю домішок. Медична та клінічна хімія. 2025;27(4):55-63. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2025.i4.15922. (Гавриленко О. В. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала статтю; Логойда Л. С. провела консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування статті).

3. Havrylenko O, Kondratova Y, Typlynska K, Logoyda L. Development and validation of HPLC methods for the quantitative determination and related impurities of naftifine hydrochloride in solution and cream dosage forms. Sci Pharm. 2026;94(1):5. doi: 10.3390/scipharm94010005. **(SCOPUS, Q2)**. (Havrylenko O. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала статтю; Kondratova Y., Typlynska K., Logoyda L. провели консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування статті).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

4. Гавриленко О. Оптимізація аналітичних методик кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів та супровідних домішок у багатокомпонентному лікарському засобі. В: Матеріали XII науково-практичної конференції Наука, інновації та якість в сучасному фармацевтичному виробництві школи молодих науковців АТ "Фармак"; 2024 листоп. 28-29; Київ. Київ; 2024. с. 46.

5. Havrylenko O, Kondratova Y, Logoyda L. Optimization of analytical methodologies for the quantitative determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, pheniramine maleate and 4-aminophenol in powder. In: Abstracts of the 20th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry; 2025 April 03-05; Ioannina, Greece. Ioannina; 2025. p. 70. (Havrylenko O. розробила концепцію і дизайн

дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала тези; Kondratova Y., Logoyda L. провели консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування тез).

6. Гавриленко О. Підходи до розробки аналітичних методик для контролю нафтифіну гідрохлориду у лікарських формах розчину та крему. В: Матеріали XXIX конгресу студентів та молодих учених Майбутнє за наукою; 2025 квіт. 9-11; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2025. с. 370.

7. Гавриленко ОВ, Кондратова ЮА, Логойда ЛС. Виклики при валідації аналітичної методики контролю супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду у лікарських формах розчину та крему: вибір хроматографічної колонки. В: Матеріали LXVIII підсумкової науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2025 черв. 12-13; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2025. с. 210. *(Гавриленко О. В. розробила концепцію і дизайн дослідження, провела експеримент, аналіз та інтерпретацію даних, написала тези; Кондратова Ю. А., Логойда Л. С. провели консультування щодо дизайну, мети, завдань та редагування тез).*

8. Гавриленко О. Вивчення профілю домішок та деградаційної поведінки нафтифіну гідрохлориду в кремі Естезифін, 1 %. В: Матеріали XIII науково-практичної конференції з міжнародною участю школи молодих науковців АТ «Фармак» Наука, інновації та якість в сучасному фармацевтичному виробництві, присвяченої 100-річчю компанії Farmak; 2025 листоп. 20-21; Київ. Київ; 2025. с. 195-196.

9. Гавриленко О. Розробка нової аналітичної стратегії контролю супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду після невдалої валідації. В: Матеріали Міжнародної internet-конференції Modern Chemistry of Medicines; 2025 листоп. 7; Харків. Харків; 2025. с. 96.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	17
ВСТУП	19
РОЗДІЛ 1 АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ЩОДО РОЗРОБКИ І ОПТИМІЗАЦІЇ АНАЛІТИЧНИХ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АФІ ТА СУПРОВІДНИХ ДОМШОК У БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ЗІ СКЛАДНОЮ МАТРИЦЕЮ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	28
1.1 Загальна характеристика активних фармацевтичних інгредієнтів	28
1.1.1 Загальна характеристика парацетамолу	28
1.1.2 Загальна характеристика фенілефрину гідрохлориду.....	30
1.1.3 Загальна характеристика феніраміну малеату	31
1.1.4 Загальна характеристика нафтифіну гідрохлориду.....	32
1.2 Огляд методик визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду, феніраміну малеату в лікарських формах	33
1.3 Огляд методик визначення нафтифіну гідрохлориду в лікарських формах	37
1.4 Застосування принципів «зеленої» хімії в розробці методик контролю якості комбінованих лікарських засобів і лікарських засобів зі складною матрицею	41
РОЗДІЛ 2 ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ’ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ	45
2.1 Методологія дослідження	45
2.2 Фізико-хімічні властивості об’єктів дослідження	47
2.3 Характеристика методик дослідження	49

2.3.1	ВЕРХ-методика визначення супровідних домішок парацетамолу в комбінованому порошку.....	49
2.3.2	ВЕРХ-методика кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду і феніраміну малеату в комбінованому порошку.....	51
2.3.3	ВЕРХ-методика визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату в комбінованому порошку для проведення тесту «Однорідність дозованих одиниць».....	53
2.3.4	ВЕРХ-методика визначення супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду в розчині та кремі.....	53
2.3.5	ВЕРХ-методика кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду в розчині та кремі.....	55
2.3.6	Методика визначення профілів деградації нафтифіну гідрохлориду у розчині.....	56
2.3.7	Методика визначення профілів деградації нафтифіну гідрохлориду у кремі	59
РОЗДІЛ 3 ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ПОРОШКУ ПАРАЦЕТАМОЛУ, ФЕНІЛЕФРИНУ ГІДРОХЛОРИДУ, ФЕНІРАМІНУ МАЛЕАТУ		63
3.1	Оптимізація та валідація методики визначення супровідних домішок парацетамолу в комбінованому порошку методом рідинної хроматографії.....	63
3.2	Оптимізація та валідація методики кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату в комбінованому порошку методом рідинної хроматографії.....	77
3.3	Оптимізація та валідація методики «Однорідність дозованих одиниць» парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату в комбінованому порошку методом рідинної хроматографії.....	104

РОЗДІЛ 4 РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ КРЕМУ ТА РОЗЧИНУ НАФТИФІНУ ГІДРОХЛОРИДУ	114
4.1 Розробка та валідація хроматографічної методики кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду у кремі та розчині методом рідинної хроматографії.....	115
4.2 Розробка та валідація хроматографічної методики визначення супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду у кремі та розчині методом рідинної хроматографії	138
4.3 Дослідження профілів деградації нафтифіну гідрохлориду як етап розробки методики визначення вмісту домішок у кремі та розчині .	148
ВИСНОВКИ	157
ДЕКЛАРАЦІЯ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ ШТУЧНОГО ІНТЕЛЕКТУ	160
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	162
ДОДАТКИ.....	178

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ	– активний фармацевтичний інгредієнт
АТ	– акціонерне товариство
ВЕРХ	– високоефективна рідинна хроматографія
ВР	– випробовуваний розчин
ДМД	– діодно-матричний детектор
ДФУ	– Державна Фармакопея України
КР	– контрольний розчин
НГХ	– нафтифіну гідрохлорид.
НМД	– нижче межі детектування
П	– парацетамол
РП	– розчин порівняння
СЗ	– стандартний зразок
УФ	– ультрафіолетовий
Ф г/х	– фенілефрину гідрохлорид
Ф м	– феніраміну малеат
ЦА	– транс-циннамальдегід
AGREE	– Analytical GREEnness Metric Approach and Software
GAPI	– Green Analytical Procedure Index
Eur.Ph.	– Європейська Фармакопея
ICH	– Міжнародна рада з гармонізації технічних вимог до лікарських засобів для людини (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use)
LOD	– межа виявлення (Limit of Detection)
LOQ	– межа кількісного визначення (Limit of Quantification)
MoGAPI	– Modified Green Analytical Procedure Index
N-M-1-HMA	– N-метил-1-нафтилметиламіну гідрохлорид

RRT	– відносний час утримування (Relative Retention Time)
RSD	– відносне стандартне відхилення (Relative Standard Deviation)
RT	– час утримування (Retention Time)
S/N	– співвідношення сигнал/шум (Signal-to-Noise Ratio)
USP	– Фармакопея США (United States Pharmacopeia)
USP RS	– стандартний зразок Фармакопеї США (United States Pharmacopeia Reference Standard).

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Показники якості лікарських засобів, що визначають їхню ефективність і безпечність, закріплюються у реєстраційних матеріалах та фармакопейних вимогах. Водночас формування якості відбувається ще на етапі фармацевтичної розробки, для якого існують як загальні методологічні підходи, так і специфічні рішення залежно від лікарської форми, складу та терапевтичного призначення лікарського засобу [1, 2]. Особливо складними для аналізу є багатокomпонентні лікарські засоби та форми зі складною матрицею, оскільки їх дослідження ускладнюється можливими взаємними впливами допоміжних речовин, подібністю фізико-хімічних властивостей компонентів, а також низьким вмістом окремих активних інгредієнтів і домішок [3].

Фармацевтичні підприємства з широкою номенклатурою продукції виконують значний обсяг рутинних аналітичних випробувань, що потребує суттєвих часових витрат, ресурсів та використання великої кількості аналітичного обладнання. При цьому наявні аналітичні методики не завжди є оптимальними, оскільки можуть характеризуватися тривалістю аналізу, високим споживанням та органічних розчинників. У зв'язку з цим виникає потреба в перегляді, удосконаленні та створенні нових аналітичних підходів, які відповідатимуть сучасним вимогам щодо ефективності, економічності та екологічної безпечності [4].

Оптимізація аналітичних методик дає змогу суттєво скоротити час хроматографічного аналізу, зменшити навантаження на обладнання, знизити витрати реагентів і підвищити продуктивність лабораторій контролю якості. Крім того, сучасні регуляторні підходи передбачають розробку аналітичних методик, придатних для їх цільового призначення, з належними характеристиками селективності, точності, прецизійності та робастності [1, 5].

Особливого значення набуває контроль якості комбінованих лікарських засобів, які містять парацетамол, фенілефрину гідрохлорид та феніраміну малеат і широко застосовуються для симптоматичного лікування гострих респіраторних інфекцій. Аналітичні труднощі таких препаратів пов'язані з різницею концентрацій компонентів, а також необхідністю контролю супровідних домішок, зокрема 4-амінфенолу, який є потенційно токсичним продуктом деградації парацетамолу [6, 7]. Для визначення компонентів комбінованих лікарських засобів та 4-амінофенолу запропоновано різні хроматографічні підходи, які відрізняються умовами розділення, способом детектування та тривалістю аналізу [6, 8]. Це обумовлює доцільність подальшої оптимізації методик з урахуванням складу конкретного лікарського засобу та їх придатності для рутинного контролю якості.

Окрему складну групу об'єктів становлять лікарські форми для місцевого застосування, зокрема препарати на основі нафтифіну гідрохлориду у вигляді кремів і розчинів. Напівтверді лікарські форми характеризуються складною багатокомпонентною структурою, властивості якої залежать від складу допоміжних речовин, фізичного стану АФІ та взаємодії компонентів препарату [9]. Особливості такої матриці необхідно враховувати під час пробопідготовки та розробки аналітичних методик кількісного визначення АФІ і контролю супровідних домішок. Важливим етапом розробки селективної методики контролю супровідних домішок є також дослідження профілю деградації нафтифіну гідрохлориду [5, 10]. Для кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду у готових лікарських засобах описані RP-HPLC підходи, однак кількість робіт, присвячених одночасному контролю АФІ та його супровідних домішок у різних лікарських формах, залишається обмеженою [11].

Аналіз наукових джерел свідчить, що розробка та оптимізація аналітичних методик для багатокомпонентних лікарських засобів і лікарських форм зі складною матрицею потребує врахування складу конкретного

препарату, фізико-хімічних властивостей його компонентів, особливостей пробопідготовки та мети аналізу [1, 3, 9]. Особливої уваги потребує визначення компонентів, присутніх у суттєво різних концентраціях, а також контроль супровідних домішок на низьких концентраційних рівнях. Це обумовлює необхідність оптимізації умов аналізу з урахуванням особливостей конкретного лікарського засобу та подальшого підтвердження придатності розробленої методики для її цільового призначення [1].

Таким чином, актуальність дослідження обумовлена необхідністю створення та вдосконалення сучасних аналітичних методик контролю якості багатокомпонентних лікарських засобів і складних лікарських форм, які забезпечують високу селективність, точність та експресність аналізу, відповідають сучасним регуляторним вимогам і можуть бути впроваджені у практику фармацевтичного виробництва.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідної роботи кафедри фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України «Розробка і валідація аналітичних та біоаналітичних методик визначення лікарських засобів; ідентифікація оригінальних функціональних похідних теофіліну з антирадикальними властивостями» (номер державної реєстрації 0124U000057).

Мета дослідження: обґрунтування аналітичних підходів, розробка та оптимізація методик кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів і супровідних домішок у багатокомпонентних лікарських засобах та лікарських засобах зі складною матрицею.

Завдання дослідження:

– провести огляд існуючих аналітичних методик кількісного визначення діючих речовин і домішок у лікарських засобах, визначити їх переваги і недоліки;

- оптимізувати методики для кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду і феніраміну малеату та визначення продукту деградації парацетамолу (4-амінофенолу);
- розробити методики кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду та його супровідних домішок у лікарських формах розчину та крему;
- дослідити профілі деградації нафтифіну гідрохлориду як етапу розробки методів визначення вмісту домішок у лікарському засобі;
- провести валідацію розроблених аналітичних методик;
- впровадити розроблені валідовані аналітичні методики у практичну діяльність АТ «Фармак».

Об'єкт дослідження – обґрунтування підходів, оптимізація та розробка аналітичних методик кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів і супровідних домішок у багатокомпонентних лікарських засобах та лікарських засобах зі складною матрицею.

Предмет дослідження – розробка, оптимізація та валідація аналітичних методик кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів і супровідних домішок у багатокомпонентних лікарських засобах та лікарських засобах зі складною матрицею.

Методи дослідження: високоефективна рідинна хроматографія з діодно-матричним детектуванням (ВЕРХ-ДМД); методи валідації аналітичних методик; методи статистичної обробки даних – регресійний та кореляційний аналіз; методи оцінювання екологічності аналітичних процедур із використанням GAPI, AGREE та MoGAPI.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі обґрунтовано підходи до розробки та оптимізації ВЕРХ-методик контролю якості багатокомпонентних лікарських засобів і лікарських форм зі складною матрицею з урахуванням особливостей їх складу та аналітичного завдання.

Для комбінованого лікарського засобу, що містить парацетамол, фенілефрину гідрохлорид, феніраміну малеат та аскорбінову кислоту,

оптимізовано умови хроматографічного розділення компонентів та кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду і феніраміну малеату. Встановлено вплив складу рухомої фази, рН та умов хроматографування на селективність розділення досліджуваних компонентів. Розроблено методику визначення 4-амінофенолу як супровідної домішки парацетамолу в умовах багатокomпонентної матриці.

Для лікарських засобів на основі нафтифіну гідрохлориду досліджено вплив складу лікарської форми на пробопідготовку та хроматографічне визначення АФІ. Розроблено та валідовано ВЕРХ-методику кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду в розчині та кремі.

За результатами дослідження профілю деградації нафтифіну гідрохлориду обґрунтовано умови хроматографічного розділення АФІ та його супровідних домішок і розроблено селективну ВЕРХ-методику їх визначення в лікарських засобах.

Проведено оцінювання екологічності розроблених аналітичних методик із використанням підходів GAPI, AGREE та MoGAPI, що дало змогу кількісно охарактеризувати їх вплив на навколишнє середовище.

Практичне значення одержаних результатів полягає у розробці, оптимізації та валідації сучасних аналітичних методик, які можуть бути безпосередньо впроваджені у діяльність лабораторій контролю якості фармацевтичних підприємств для аналізу багатокomпонентних лікарських засобів та лікарських форм зі складною матрицею. Запропоновані високоефективні рідинно-хроматографічні методики забезпечують кількісне визначення АФІ та контроль супровідних домішок з належним рівнем селективності, точності та прецизійності відповідно до вимог ІСН та фармакопейних підходів.

Розроблені методики для кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату у комбінованому лікарському засобі дозволяють суттєво скоротити тривалість аналізу та

підвищити пропускну здатність лабораторій контролю якості. Оптимізація умов хроматографування, зокрема складу рухомої фази, режиму елюювання та параметрів детектування, сприяє зменшенню витрат органічних розчинників і зниженню експлуатаційного навантаження на аналітичне обладнання. Це, у свою чергу, забезпечує можливість підвищення економічної ефективності впровадження запропонованих підходів у виробничу практику.

Запропоновані методики визначення супровідних домішок, зокрема 4-амінофенолу у препаратах, що містять парацетамол, дозволяють підвищити надійність контролю супровідних домішок, що має важливе значення для забезпечення якості та безпеки лікарських засобів. Встановлені підходи до використання іон-парного реагенту можуть бути застосовані при розробці аналогічних методик для інших багатокомпонентних систем.

Розроблені аналітичні методики для визначення нафтифіну гідрохлориду та його супровідних домішок у лікарських формах у вигляді розчину та крему враховують вплив складної матриці та забезпечують достовірність результатів аналізу навіть за наявності значної кількості допоміжних речовин. Запропоновані підходи до пробопідготовки та вибору розчинників можуть бути використані при аналізі інших лікарських засобів для місцевого застосування зі складною матрицею.

Отримані результати щодо дослідження профілю деградації нафтифіну гідрохлориду можуть бути використані при оцінці стабільності лікарських засобів у процесі їх розробки та виробництва. Запропоновані аналітичні підходи сприяють підвищенню селективності методик контролю супровідних домішок і можуть бути використані при формуванні аналітичної частини реєстраційної документації.

Розроблені методики можуть бути рекомендовані для використання у практиці фармацевтичних підприємств, аналітичних лабораторій та науково-дослідних установ, а також у навчальному процесі при підготовці фахівців за спеціальністю «Фармація, промислова фармація». Їх впровадження може

сприяти підвищенню ефективності контролю якості лікарських засобів та зменшенню витрат ресурсів при проведенні аналітичних досліджень.

Практичне значення одержаних результатів підтверджено впровадженням розроблених аналітичних методик у діяльність АТ «Фармак». Зокрема, впроваджено методики кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду і феніраміну малеату, а також визначення 4-амінофенолу у комбінованому лікарському засобі. Розроблені методики кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду та контролю супровідних домішок у лікарських засобах у формах розчину та крему перебувають на етапі впровадження у практичну діяльність АТ «Фармак».

Таким чином, результати дисертаційної роботи мають практичне значення для вдосконалення аналітичного забезпечення контролю якості лікарських засобів та можуть бути використані у фармацевтичній галузі для підвищення ефективності, надійності та економічності аналітичних досліджень.

Особистий внесок здобувача. Основні результати, представлені у дисертаційній роботі, отримані автором самостійно. Здобувачем проведено аналіз сучасного стану наукових досліджень і нормативної бази у сфері контролю якості лікарських засобів, визначено актуальні напрями досліджень, сформульовано мету та завдання роботи.

У ході виконання дисертаційної роботи автором самостійно розроблено, оптимізовано та валідовано аналітичні методики кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів і супровідних домішок у багатокомпонентних лікарських засобах та лікарських формах зі складною матрицею. Проведено підбір умов хроматографування, включаючи вибір колонок, складу рухомих фаз, режимів елюювання та параметрів детектування. Розроблено та оптимізовано умови пробопідготовки з урахуванням особливостей складу досліджуваних лікарських форм.

Автором виконано експериментальні дослідження з кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату у комбінованих порошках, а також кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду та визначення його супровідних домішок у лікарських формах розчину та крему. Здобувачем проведено валідацію розроблених методик відповідно до вимог міжнародних настанов, здійснено статистичну обробку одержаних результатів і їх інтерпретацію.

Крім того, автором досліджено профіль деградації нафтифіну гідрохлориду та встановлено основні напрями його деградації за різних стресових умов. Узагальнення результатів досліджень, формулювання висновків і основних положень дисертації виконано здобувачем самостійно.

Наукові публікації за темою дисертації підготовлені за безпосередньої участі автора, якій належить визначальна роль у плануванні досліджень, проведенні експериментів, обробці результатів та підготовці матеріалів до друку.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднено на XII науково-практичній конференції «Школа молодих науковців АТ «Фармак» (м. Київ, 28-29 листопада 2024 року), XXIX конгресі студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою» (м. Тернопіль, 9-11 квітня 2025 року), 20th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (Ioannina, Greece, 3-5 April 2025), LXVIII підсумковій науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 12-13 червня 2025 року), Міжнародній інтернет-конференції «Modern chemistry of medicines» (м. Харків, 7 листопада 2025 року), XIII спеціалізованій науково-практичній конференції з міжнародною участю школи молодих науковців АТ «Фармак» «Наука, інновації та якість у сучасному фармацевтичному виробництві», присвяченій 100-річчю компанії Farmak (м. Київ, 20-21 листопада 2025 року).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 9 наукових праць, із них 3 статті (2 – в іноземних періодичних виданнях, що індексуються наукометричною базою *Scopus*, 1 – у фаховому виданні України категорії Б), 6 публікацій в матеріалах вітчизняних і міжнародних конгресів та конференцій.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 182 сторінках, складається з анотації, вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел, що містить 121 найменування, та додатків. Робота ілюстрована 66 таблицями та 35 рисунками. Список використаних джерел та додатки викладено на 20 сторінках.

РОЗДІЛ 1

АНАЛІЗ ІСНУЮЧИХ ПІДХОДІВ ЩОДО РОЗРОБКИ І ОПТИМІЗАЦІЇ АНАЛІТИЧНИХ МЕТОДИК КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АФІ ТА СУПРОВІДНИХ ДОМІШОК У БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ЗІ СКЛАДНОЮ МАТРИЦЕЮ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Загальна характеристика активних фармацевтичних інгредієнтів

Комбіновані лікарські засоби широко застосовуються для симптоматичного лікування застуди та грипу, оскільки поєднання АФІ з різними механізмами фармакологічної дії дає змогу одночасно впливати на декілька симптомів захворювання [11]. Поєднання у складі таких лікарських засобів АФІ з різними механізмами фармакологічної дії забезпечує вплив на декілька симптомів захворювання. До складу досліджуваного комбінованого лікарського засобу входять парацетамол, фенілефрину гідрохлорид та феніраміну малеат. Окремим об'єктом дослідження є нафтифіну гідрохлорид, що застосовується у лікарських формах зі складною матрицею. Фізико-хімічні та фармакологічні характеристики досліджуваних АФІ наведено нижче.

1.1.1 Загальна характеристика парацетамолу

Парацетамол (ацетамінофен) є одним із найбільш широко застосовуваних активних фармацевтичних інгредієнтів у сучасній фармацевтичній практиці та входить до складу багатьох комбінованих лікарських засобів, зокрема для симптоматичного лікування гострих респіраторних захворювань. Парацетамол чинить знеболювальну та жарознижувальну дію, водночас його протизапальна активність є обмеженою [13]. Поєднання ефективності та сприятливого профілю переносимості

зумовлює його широке використання як у монотерапії, так і у складі багатокомпонентних лікарських засобів.

З хімічної точки зору парацетамол є похідним пара-амінфенолу та має хімічну назву N-(4-гідроксифеніл)ацетамід. Його структура представлена ароматичним кільцем із гідроксильною та ацетамідною групами, що визначають його основні фізико-хімічні властивості [14, 15] (рис. 1.1).

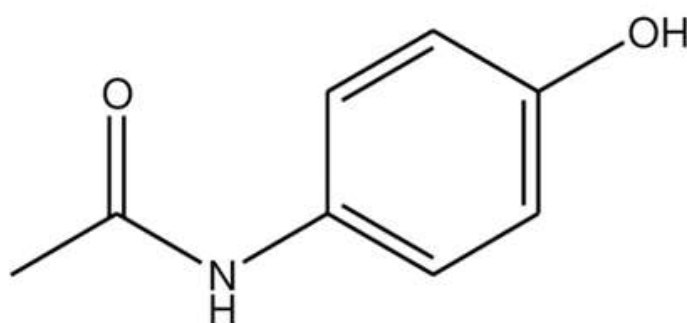


Рисунок 1.1 – Структурна формула парацетамолу

$C_8H_9NO_2$, $M_r = 151,17$ [15]

Парацетамол характеризується низькою розчинністю у воді, значенням pK_a 9,38 та коефіцієнтом розподілу $\log P$ 0,46 [14, 15]. Після перорального застосування він швидко абсорбується у шлунково-кишковому тракті та метаболізується переважно у печінці шляхом глюкуронування та сульфатування. Незначна частина парацетамолу зазнає окиснення з утворенням реактивного метаболіту N-ацетил-p-бензохіноніміну (NAPQI), який за терапевтичних доз знешкоджується шляхом кон'югації з глутатіоном [13, 16].

Однією з основних домішок парацетамолу є 4-амінофенол, який може утворюватися як у процесі синтезу, так і внаслідок гідролітичної деградації парацетамолу під час зберігання [7].

Фізико-хімічні властивості парацетамолу, а також його високий вміст у багатокомпонентних лікарських засобах порівняно з іншими компонентами створюють певні труднощі при аналітичному визначенні, особливо у поєднанні з речовинами, що мають відмінні фізико-хімічні властивості та значно нижчий вміст у лікарській формі.

1.1.2 Загальна характеристика фенілефрину гідрохлориду

Фенілефрину гідрохлорид є симпатоміметичним АФІ, який широко застосовується як судинозвужувальний компонент у складі комбінованих лікарських засобів для лікування симптомів застуди та грипу, зокрема закладеності носа. Його фармакологічна дія реалізується шляхом стимуляції α_1 -адренорецепторів судин слизової оболонки носової порожнини, що спричиняє вазоконстрикцію та зменшення її набряку [17].

Хімічна назва фенілефрину гідрохлориду – (1R)-1-(3-гідроксифеніл)-2-(метиламіно)етанолу гідрохлорид. Структура молекули включає ароматичне кільце, гідроксильні та аміногрупу, а наявність основного центру зумовлює її здатність до іонізації [18] (рис. 1.2).

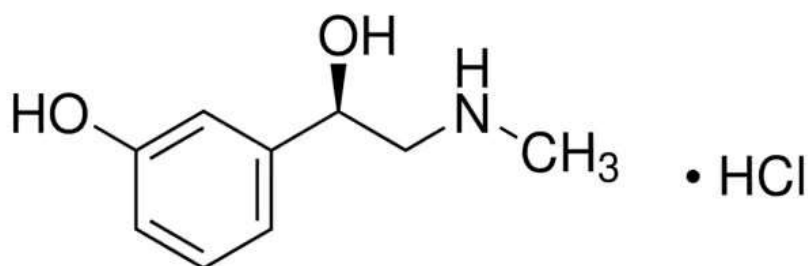
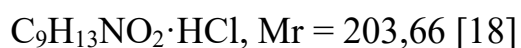


Рисунок 1.2 – Структурна формула фенілефрину гідрохлориду



Фенілефрину гідрохлорид добре розчинний у воді та етанолі (96 %) [14]. Для фенілефрину характерне значення pK_a близько 9,0, тому в умовах, типових для обернено-фазової ВЕРХ, він переважно перебуває в іонізованій

формі [18]. Водночас його низька концентрація у складі комбінованих препаратів порівняно з парацетамолом створює додаткові аналітичні труднощі, пов'язані з необхідністю забезпечення достатньої чутливості та селективності методик визначення.

Наявність іонізованої аміногрупи впливає на хроматографічне утримування фенілефрину, що необхідно враховувати при розробці аналітичних методик, зокрема при застосуванні іон-парної хроматографії [19].

1.1.3 Загальна характеристика феніраміну малеату

Феніраміну малеат належить до антигістамінних лікарських засобів першого покоління та використовується для зменшення симптомів алергії, таких як ринорея, чхання та свербіж. Фармакологічна дія феніраміну пов'язана з блокуванням H_1 -гістамінових рецепторів. Фенірамін також входить до складу комбінованих лікарських засобів, що застосовуються для симптоматичного лікування застуди [20].

Хімічна назва феніраміну малеату – (3RS)-N,N-диметил-3-феніл-3-(піридин-2-іл)пропан-1-амін (Z)-бутендіоат. Молекула феніраміну містить фенільний та піридиновий фрагменти і третинну аміногрупу [21] (рис. 1.3).

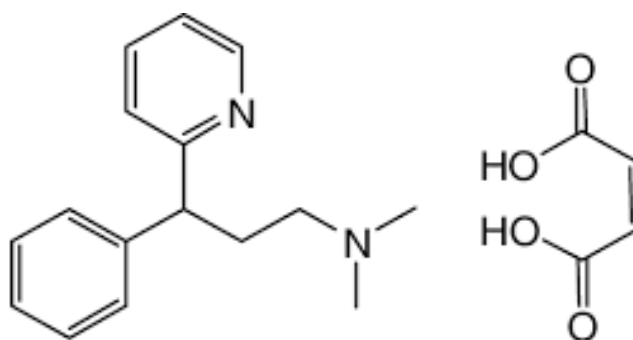


Рисунок 1.3 – Структурна формула феніраміну малеату

$$C_{16}H_{20}N_2 \cdot C_4H_4O_4, Mr = 356,4 [21]$$

Феніраміну малеат є дуже добре розчинним у воді, а також вільно розчинним у етанолі (96 %), метанолі та метиленхлориді [14]. Наявність третинної аміногрупи зумовлює здатність феніраміну до протонування, що впливає на його утримування в умовах обернено-фазової рідинної хроматографії [22].

Відмінності фізико-хімічних властивостей феніраміну малеату та інших АФІ, а також його значно нижчий вміст порівняно з парацетамолом у комбінованому лікарському засобі необхідно враховувати при виборі умов їх одночасного хроматографічного визначення [23].

1.1.4 Загальна характеристика нафтифіну гідрохлориду

Нафтифіну гідрохлорид є синтетичним протигрибковим лікарським засобом із групи аліламінів, який широко застосовується для лікування дерматомікозів, зокрема у вигляді кремів та розчинів для місцевого застосування [24]. Механізм протигрибкової дії нафтифіну гідрохлориду пов'язаний з інгібуванням скваленепоксидази – ферменту, що бере участь у біосинтезі ергостеролу. Це призводить до накопичення сквалену та порушення структури і функцій клітинної мембрани грибів [25].

Хімічна назва нафтифіну гідрохлориду – (E)-N-метил-N-(нафтален-1-ілметил)-3-фенілпроп-2-ен-1-аміну гідрохлорид. Структура нафтифіну містить нафталіновий та фенільний фрагменти, а також третинну аміногрупу, здатну до протонування залежно від рН середовища [26] (рис. 1.4).

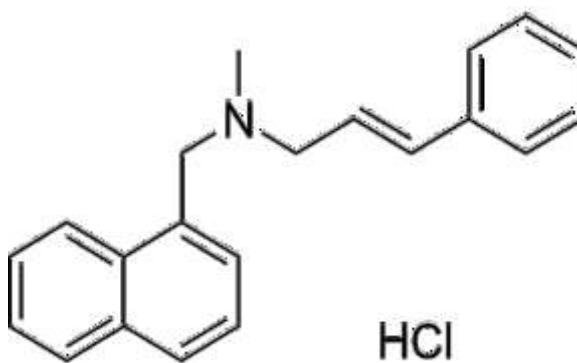


Рисунок 1.4 – Структурна формула нафтифіну гідрохлориду



Нафтифіну гідрохлорид характеризується обмеженою розчинністю у воді та доброю розчинністю в органічних розчинниках [27, 28]. Ці властивості необхідно враховувати при виборі розчинника для пробопідготовки та умов хроматографічного визначення.

Особливості пробопідготовки мають суттєве значення при аналізі напівтвердих лікарських форм нафтифіну гідрохлориду. Багатокомпонентна матриця крему, що містить допоміжні речовини з різними фізико-хімічними властивостями, ускладнює екстракцію АФІ та супровідних домішок і потребує ретельного вибору умов пробопідготовки [29].

1.2 Огляд методик визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду, феніраміну малеату в лікарських формах

Аналітичне забезпечення контролю якості багатокомпонентних лікарських засобів, що містять парацетамол, фенілефрину гідрохлорид та феніраміну малеат, є важливим етапом фармацевтичної розробки, оскільки такі препарати широко застосовуються для симптоматичного лікування застуди та грипу [12]. Розробка аналітичних методик для таких систем потребує забезпечення належної селективності, точності та прецизійності з урахуванням відмінностей фізико-хімічних властивостей і вмісту окремих компонентів [1, 3].

Відповідно до вимог Eur. Ph., для кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату в субстанціях застосовують титриметричні методи: цериметрію для парацетамолу, алкаліметрію для фенілефрину гідрохлориду та ацидиметрію для феніраміну малеату [14]. Застосування таких методів для багатокомпонентних лікарських засобів є обмеженим через відсутність селективності щодо окремого АФІ за наявності інших компонентів препарату.

В USP для кількісного визначення фенілефрину гідрохлориду передбачено метод ВЕРХ [27]. Методика призначена для визначення окремого АФІ та не передбачає одночасного аналізу інших компонентів комбінованого лікарського засобу. Тривалість одного хроматографування становить близько 16 хв, тому при розробці методики одночасного визначення декількох АФІ доцільним є пошук умов, що забезпечують скорочення загальної тривалості аналізу.

Для контролю супровідних домішок парацетамолу у фармакопейних монографіях Eur. Ph. та USP застосовують ВЕРХ [14, 27]. Передбачені умови забезпечують розділення парацетамолу та регламентованих домішок, однак характеризуються відносно тривалим хроматографуванням. З огляду на необхідність визначення 4-амінофенолу в комбінованому лікарському засобі доцільним є розгляд спеціалізованих методик, описаних для його визначення у багатокомпонентних препаратах.

Розробка, оптимізація та валідація аналітичних методик здійснюються з урахуванням міжнародних регуляторних настанов ІСН та вимог провідних фармакопей, зокрема Eur. Ph. та USP. Сучасні підходи охоплюють розробку аналітичної процедури, оцінювання її валідаційних характеристик та управління методикою протягом життєвого циклу [1, 30, 31]. Окремі регуляторні документи встановлюють підходи до дослідження стабільності та фотостабільності, контролю домішок і продуктів деградації та застосування хроматографічних методів [10, 14, 27, 32–34].

Аналіз сучасної наукової літератури свідчить про значну кількість досліджень, присвячених розробці та валідації аналітичних методик для визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду, феніраміну малеату та інших компонентів у лікарських засобах [35–51]. Найбільш поширеними є методи вискоєфективної рідинної хроматографії, які застосовуються як для аналізу однокомпонентних препаратів, так і для комбінованих лікарських форм. У роботах описано стабільно-індикативні методики [35], підходи до

аналізу рідких лікарських форм [37, 41, 48] і таблетованих препаратів [40, 42, 43], а також визначення домішок і продуктів деградації, зокрема 4-амінфенолу [44–46].

Окрім хроматографічних методів, у сучасних дослідженнях описано спектрофотометричні підходи та методи з використанням хемометричної обробки даних, які застосовують для одночасного визначення компонентів багатокомпонентних лікарських засобів [38, 46, 52]. Застосування хемометричних методів дає змогу аналізувати багатокомпонентні системи за умов перекривання спектральних характеристик окремих компонентів [53].

Разом з тим, аналіз літературних джерел показує, що описані методики суттєво відрізняються за складом аналізованих лікарських засобів, умовами хроматографічного розділення та тривалістю аналізу. Одночасне визначення компонентів багатокомпонентних препаратів ускладнюється відмінностями їх фізико-хімічних властивостей та значною різницею концентрацій окремих АФІ. Для досліджуваного комбінованого порошку це стосується парацетамолу, вміст якого значно перевищує вміст фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату.

Для одночасного визначення компонентів комбінованих протизастудних лікарських засобів описано низку ВЕРХ-методик. Marín A. et al. розробили та валідовали методику одночасного визначення парацетамолу, фенілефрину та хлорфеніраміну в капсулах і порошках у саше. Розділення проводили у градієнтному режимі з використанням фосфатного буферного розчину (pH 6,0) та ацетонітрилу; тривалість хроматографування становила 20 хв [54].

Heydari R. запропонував ВЕРХ-методику одночасного визначення парацетамолу, фенілефрину, декстрометорфану та хлорфеніраміну у фармацевтичних препаратах із тривалістю аналізу менше 12 хв [43].

Pirol O. et al. розробили швидку ВЕРХ-методику для одночасного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду, оксоламіну цитрату та

хлорфеніраміну малеату. Розділення проводили на колонці Zorbax SB-CN в ізократичному режимі з використанням фосфатного буферного розчину (рН 4,0) та ацетонітрилу (85:15); час утримування визначуваних компонентів не перевищував 3,5 хв [55].

Інші дослідники також застосовували ВЕРХ з УФ- або діодно-матричним детектуванням для одночасного визначення двох і більше АФІ у комбінованих лікарських засобах [56–58]. Запропоновані підходи забезпечують належні показники селективності, точності та прецизійності, однак здебільшого розроблені для інших комбінацій діючих речовин або окремих лікарських форм, що обмежує можливість їх безпосереднього застосування для контролю якості досліджуваного комбінованого препарату.

Високоєфективна рідинна хроматографія є одним із найбільш поширених інструментальних методів контролю якості лікарських засобів завдяки високій селективності, чутливості та універсальності. Можливість варіювання складу рухомої фази, характеристик нерухомої фази та умов елюювання забезпечує ефективне розділення як активних фармацевтичних інгредієнтів, так і їх супровідних домішок [59–62].

У кваліфікаційній науковій праці «Теоретичне та експериментальне обґрунтування створення та дослідження комбінованих твердих лікарських форм» [63] запропоновано ВЕРХ-методику для визначення зазначених компонентів та домішки 4-амінфенолу у комбінованих порошках. Тривалість хроматографування за описаних умов становить 22–38 хв, що обґрунтовує доцільність подальшої оптимізації методик у напрямі скорочення часу аналізу та підвищення їх придатності для рутинного контролю якості.

Таким чином, існує необхідність у розробці та оптимізації аналітичних методик, які б забезпечували швидке, точне та селективне визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату у багатокомпонентних лікарських засобах. Особливо актуальним є створення

методик, придатних для рутинного застосування у лабораторіях контролю якості, зі скороченим часом аналізу та витратами органічних розчинників.

1.3 Огляд методик визначення нафтифіну гідрохлориду в лікарських формах

Місцеві протигрибкові засоби широко застосовують для лікування поверхневих грибкових інфекцій шкіри [64]. Нафтифіну гідрохлорид застосовують у лікарських засобах для місцевого лікування поверхневих грибкових інфекцій шкіри, зокрема дерматофітії [24, 65]. Лікарські засоби на основі нафтифіну гідрохлориду представлені різними формами для місцевого застосування, зокрема кремами та розчинами, що необхідно враховувати при виборі умов їх аналітичного контролю.

Для контролю якості лікарських засобів на основі нафтифіну гідрохлориду застосовують хроматографічні методи, умови яких відрізняються залежно від аналітичного завдання та лікарської форми. При кількісному визначенні АФІ основними вимогами є специфічність, правильність і прецизійність методики, тоді як при контролі супровідних домішок особливого значення набувають селективність і чутливість, необхідні для визначення компонентів на низьких концентраційних рівнях [1, 5].

Згідно з фармакопейними вимогами, у монографії USP для кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду передбачено метод ВЕРХ у нормально-фазовому режимі [27]. Методика потребує тривалої підготовки хроматографічної системи: відповідно до монографії приготовлену рухому фазу необхідно витримувати протягом 12 год за кімнатної температури. Крім того, під час експериментального відтворення фармакопейної методики встановлено, що для досягнення стабільного стану хроматографічної системи врівноваження колонки потребувало понад 4 год. Це суттєво збільшує загальну тривалість підготовки до аналізу та витрати рухомої фази.

Для визначення супровідних домішок у монографії USP застосовують ті самі хроматографічні умови, що й для кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду [27]. Водночас можливості цієї методики щодо виявлення продуктів деградації є обмеженими, що має особливе значення при проведенні досліджень стабільності лікарських засобів. Тому для контролю супровідних домішок доцільним є застосування більш селективної методики, здатної відображати зміни профілю домішок нафтифіну гідрохлориду в умовах його деградації [66].

Китайська фармакопея [28] пропонує використання обернено-фазної ВЕРХ-методики для кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду, що є більш зручним для практичного застосування порівняно з нормально-фазовим підходом, наведеним у USP. Водночас у монографії не конкретизовано тип та розміри хроматографічної колонки, що потребує додаткового підбору хроматографічних умов при відтворенні методики. Для визначення супровідних домішок Китайська фармакопея передбачає застосування тієї самої методики, що й для кількісного визначення. Однак під час експериментального дослідження встановлено, що такий підхід не забезпечує виявлення всіх продуктів деградації нафтифіну гідрохлориду, що обґрунтовує необхідність оптимізації умов їх хроматографічного визначення [66].

Аналіз наукової літератури свідчить про обмежену кількість досліджень, присвячених безпосередньо нафтифіну гідрохлориду. При цьому значна кількість робіт стосується тербінафіну – представника тієї самої групи аліламінівих протигрибкових засобів [67–72]. Обидві речовини інгібують скваленепоксидазу на ранньому етапі біосинтезу ергостеролу, що зумовлює спорідненість механізму їх протигрибкової дії [25, 73]. Тербінафін є структурним аналогом нафтифіну гідрохлориду, отриманим у результаті модифікації структури аліламінів, що обґрунтовує інтерес до аналітичних підходів, розроблених для цієї сполуки, при виборі умов хроматографічного визначення нафтифіну гідрохлориду [74]. Відмінності у структурі аналітів,

складі лікарських форм та профілях супровідних домішок потребують окремої оптимізації та підтвердження придатності аналітичної методики для визначення нафтифіну гідрохлориду.

У сучасних дослідженнях запропоновано окремі ВЕРХ-методики для кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду у лікарських формах. Зокрема, Shinde K. S. et al. розробили та валідовали обернено-фазову ВЕРХ-методику кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду у кремі. Хроматографічне розділення проводили на колонці Inertsil ODS в ізократичному режимі з використанням рухомої фази, що містила ацетонітрил, метанол і воду з додаванням триетиламіну (рН 5,5); час утримування піку нафтифіну становив близько 4 хв [11]. Методика характеризувалася належними показниками лінійності, правильності та прецизійності та була запропонована авторами для рутинного кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду. Разом із тим у дослідженні не проводили випробувань в умовах примусової деградації, тому можливість застосування методики як стабільність-індикативної не була підтверджена.

При аналізі протигрибкових засобів у напівтвердих лікарських формах необхідно враховувати вплив компонентів кремової основи на визначення АФІ. Cardoso S. G. та Scharoval E. E. S. розробили ВЕРХ-методику кількісного визначення тербінафіну гідрохлориду в таблетках і кремах, яка забезпечувала його селективне визначення у присутності компонентів лікарської форми [75]. ВЕРХ також застосовували для одночасного визначення тербінафіну та інших АФІ і консервантів у багатокомпонентній кремовій лікарській формі [76].

Для контролю якості аліламінових протигрибкових засобів важливим є не лише кількісне визначення АФІ, але й розділення структурно споріднених домішок і продуктів деградації. Matysová L. et al. розробили RP-HPLC-методику одночасного визначення тербінафіну, технологічної домішки 1-метиламінометилнафталену та трьох продуктів деградації, виявлених у лікарських засобах під час довготривалих досліджень стабільності. Для

розділення використовували колонку Nucleosil 100-5-CN та рухому фазу на основі цитратного буферного розчину, тетрагідрофурану й ацетонітрилу; тривалість аналізу становила менше 32 хв [70].

Подальший розвиток аналітичних підходів до контролю аліламініових протигрибкових засобів пов'язаний із застосуванням стабільність-індикативних методик. Bhosale D. M. та Nikalje A. P. G. запропонували UPLC-методику одночасного визначення тербінафіну гідрохлориду разом з іншими АФІ та консервантами у комбінованій лікарській формі для місцевого застосування. Розділення проводили на короткій C18 колонці ($50 \times 2,1$ мм, 1,7 мкм) у градієнтному режимі, а специфічність методики оцінювали в умовах стресової деградації [77].

Окремим напрямом удосконалення хроматографічних методик є застосування підходів Analytical Quality by Design (AQbD), що дають змогу системно оцінювати вплив параметрів аналітичної процедури на її характеристики. У роботі, присвяченій визначенню тербінафіну гідрохлориду у кремах методом ВЕРХ, застосування AQbD дозволило встановити критичні джерела невизначеності та оптимізувати аналітичну процедуру з метою підвищення надійності результатів [78].

Дослідження стабільності нафтифіну гідрохлориду в кремових лікарських формах показало різну стійкість АФІ залежно від умов стресового впливу. За кислотного, лужного, термічного та світлового впливу суттєвих змін вмісту нафтифіну гідрохлориду не спостерігали, тоді як в окиснювальних умовах було встановлено утворення додаткових продуктів деградації та зміну профілю домішок. Такі результати необхідно враховувати при розробці хроматографічної методики контролю супровідних домішок, оскільки вона повинна забезпечувати виявлення змін їх профілю в умовах деградації [79].

Таким чином, аналіз фармакопейних і літературних даних показав, що кількість аналітичних методик, розроблених безпосередньо для нафтифіну гідрохлориду, залишається обмеженою. Описані підходи переважно

орієнтовані на кількісне визначення АФІ, тоді як методики контролю супровідних домішок і продуктів деградації у готових лікарських засобах представлені значно менше. При цьому склад матриці лікарської форми необхідно враховувати як при пробопідготовці, так і при виборі умов хроматографічного розділення. Це обґрунтовує необхідність розробки та оптимізації ВЕРХ-методик кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду та контролю його супровідних домішок, придатних для аналізу лікарських форм із різним складом матриці.

1.4 Застосування принципів «зеленої» хімії в розробці методик контролю якості комбінованих лікарських засобів і лікарських засобів зі складною матрицею

Принципи «зеленої» аналітичної хімії передбачають зменшення негативного впливу аналітичних процедур на довкілля та здоров'я людини шляхом мінімізації використання небезпечних реагентів, скорочення об'ємів органічних розчинників, енергоспоживання та кількості утворюваних відходів [80, 81]. Поряд із традиційними характеристиками аналітичних методик, такими як точність, прецизійність і специфічність, при їх розробці та оптимізації доцільно враховувати також обсяги використаних реагентів, їх небезпечність, енергетичні витрати та кількість відходів, що утворюються під час проведення аналізу [80, 82, 83].

Аналіз сучасних літературних джерел та фармакопейних підходів до визначення активних фармацевтичних інгредієнтів у багатокомпонентних лікарських засобах свідчить, що питання екологічності аналітичних методик тривалий час залишалося поза увагою дослідників. Більшість раніше запропонованих методик були орієнтовані насамперед на досягнення належних аналітичних характеристик, таких як специфічність, точність, прецизійність та чутливість, однак практично не враховували вплив

аналітичних процедур на навколишнє середовище. У рідинній хроматографії зменшення такого впливу пов'язують насамперед зі скороченням використання органічних розчинників і кількості утворюваних відходів, застосуванням безпечніших розчинників, мініатюризацією та скороченням тривалості аналізу [84–87]. Активний розвиток концепції зеленої аналітичної хімії та впровадження принципів екологічно безпечного аналітичного контролю [80] сприяли створенню сучасних підходів до оцінювання «зеленості» методик, зокрема із застосуванням інструментів GAPI, AGREE та MoGAPI, які дозволяють комплексно оцінити екологічний профіль аналітичних процедур [88–93].

При розробці та оптимізації ВЕРХ-методик для визначення компонентів комбінованого лікарського засобу – парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату враховували можливість зменшення екологічного впливу аналітичних процедур. Для одночасного визначення компонентів комбінованого порошку було оптимізовано умови хроматографування, що дозволило скоротити тривалість аналізу та витрати органічних розчинників порівняно з раніше описаними методиками [94]. Скорочення часу хроматографування та оптимізація складу рухомої фази сприяли зменшенню кількості утворюваних відходів і покращенню показників «зеленості» розробленої методики [94].

Аналогічний підхід було реалізовано при розробці аналітичних методик для контролю якості нафтифіну гідрохлориду у лікарських формах розчину та крему. Запропоновані обернено-фазові ВЕРХ-методики забезпечують селективне визначення нафтифіну гідрохлориду та його супровідних домішок у досліджуваних лікарських формах. Оптимізація складу рухомої фази та умов хроматографування дозволила скоротити тривалість аналізу та більш раціонально використовувати органічні розчинники порівняно з фармакопейними підходами [66]. Зменшення витрат рухомої фази та

тривалості роботи хроматографічної системи також сприяло покращенню екологічних характеристик розроблених методик [66].

Для кількісної оцінки екологічності аналітичних методик застосовували інструмент AGREE, який враховує всі 12 принципів «зеленої» аналітичної хімії та представляє результат у вигляді інтегрального показника в діапазоні від 0 до 1 [91]. За результатами оцінювання розроблені методики характеризувалися кращими показниками «зеленості» порівняно з відповідними фармакопейними підходами [66, 94]. Це пов'язано зі скороченням тривалості аналізу, зменшенням витрат рухомої фази та кількості утворюваних відходів.

Таким чином, проведений аналіз свідчить, що незважаючи на наявність значної кількості аналітичних методик для визначення активних фармацевтичних інгредієнтів, питання їх екологічної безпечності залишається актуальним. Запропоновані у роботі підходи до розробки та оптимізації ВЕРХ-методик із урахуванням принципів «зеленої» хімії дозволяють підвищити ефективність контролю якості лікарських засобів, зменшити витрати ресурсів та мінімізувати негативний вплив на довкілля, що відповідає сучасним тенденціям розвитку фармацевтичного аналізу.

Висновки до розділу I

1. Проаналізовано фізико-хімічні властивості та фармакологічні характеристики парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду, феніраміну малеату та нафтифіну гідрохлориду, що визначають особливості їх аналітичного визначення, зокрема полярність, розчинність, значення рКа та схильність до деградації.

2. Встановлено, що багатокomпонентні лікарські засоби, які містять парацетамол, фенілефрину гідрохлорид і феніраміну малеат, характеризуються значною різницею у концентраціях компонентів, що ускладнює їх одночасне визначення та потребує високоселективних аналітичних підходів.

3. Показано, що нафтифіну гідрохлорид як ліпофільна сполука у складі напівтвердих лікарських форм (кремів) створює додаткові труднощі для аналізу через вплив допоміжних речовин та необхідність оптимізації пробопідготовки.

4. Аналіз фармакопейних та літературних джерел свідчить, що існуючі методики визначення досліджуваних активних фармацевтичних інгредієнтів переважно базуються на ВЕРХ, однак мають ряд обмежень, зокрема тривалий час аналізу, значне споживання органічних розчинників та недостатню селективність щодо супровідних домішок.

5. Встановлено відсутність універсальних аналітичних методик, придатних для одночасного визначення активних компонентів і їх домішок у багатокомпонентних лікарських засобах та лікарських формах зі складною матрицею, що обумовлює необхідність їх розробки та оптимізації.

6. Показано, що сучасні підходи до оцінки «зеленості» аналітичних методик (AGREE, GAPI) дозволяють комплексно оцінити екологічний вплив аналітичних процедур, проте більшість існуючих методик не враховують принципи «зеленої» хімії.

7. Обґрунтовано доцільність розробки та оптимізації нових аналітичних методик контролю якості лікарських засобів із урахуванням сучасних вимог фармакопей та принципів «зеленої» аналітичної хімії, що забезпечить підвищення ефективності, економічності та екологічної безпечності фармацевтичного аналізу.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ’ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ

2.1 Методологія дослідження

Враховуючи проблемні аспекти, викладені у розділі 1, зокрема обмеження існуючих аналітичних методик для контролю якості багатокомпонентних лікарських засобів і лікарських форм зі складною матрицею, було сформовано загальну концепцію дослідження та розроблено дизайн експерименту, який наведено на рисунку 2.1. Під час планування досліджень враховували ризик-орієнтований підхід до визначення факторів, здатних впливати на якість результатів аналітичної процедури [95]. Такий підхід узгоджується із принципами фармацевтичної системи якості, спрямованими на забезпечення належного контролю протягом життєвого циклу лікарського засобу [96].

Методологічні підходи до розробки та оптимізації ВЕРХ-методик передбачають урахування фізико-хімічних властивостей аналітів, особливостей хроматографічного розділення та цільового призначення аналітичної процедури [97]. Придатність розробленої аналітичної методики до передбаченого застосування підтверджують шляхом її валідації [98].

Запропонований підхід передбачав послідовну реалізацію кількох взаємопов’язаних етапів, спрямованих на розробку, оптимізацію та валідацію аналітичних методик для різних об’єктів дослідження.

На першому етапі проводилась оптимізація аналітичних методик для контролю за показниками «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць» для комбінованого порошку, що містить парацетамол, фенілефрину гідрохлорид та феніраміну малеат. Оптимізація включала підбір хроматографічних умов (типу колонки, складу рухомої фази, режиму

елюювання) з метою забезпечення належної селективності, скорочення часу аналізу та зменшення витрат розчинників.

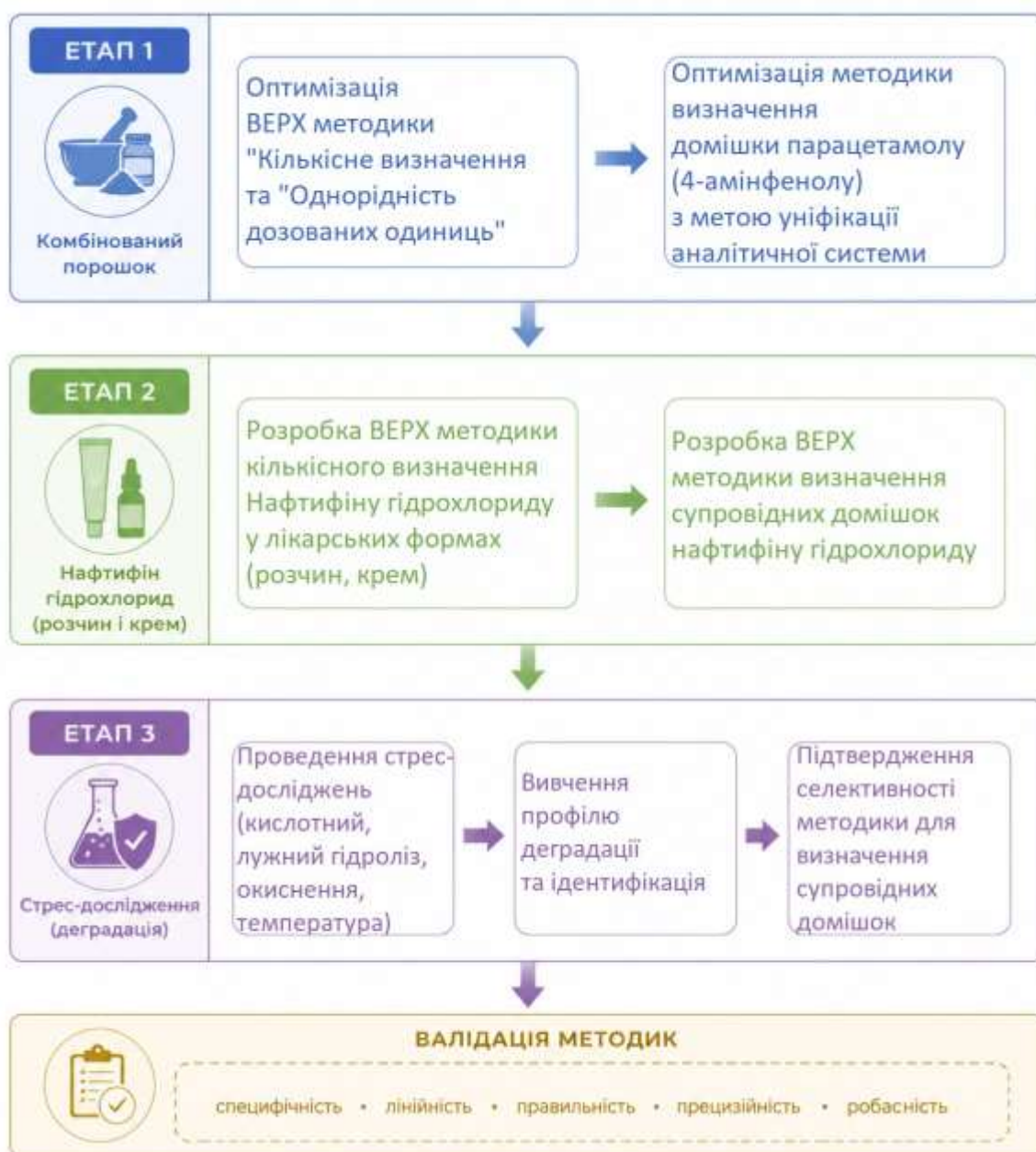


Рисунок 2.1 – Дизайн експерименту

Зважаючи на необхідність уніфікації аналітичних процедур, на наступному підетапі було проведено оптимізацію методики визначення супровідної домішки парацетамолу (4-амінфенолу) з використанням тієї самої хроматографічної колонки та рухомої фази. Такий підхід дозволив

уніфікувати частину хроматографічних параметрів методик кількісного визначення компонентів комбінованого препарату та контролю 4-амінофенолу, що спрощує їх застосування в умовах рутинного контролю якості.

Другий етап дослідження був присвячений розробці аналітичних методик для лікарських форм, що містять нафтифіну гідрохлорид. Спочатку було розроблено та оптимізовано ВЕРХ-методику кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду у лікарських формах розчину та крему з урахуванням особливостей їх матриці, зокрема впливу допоміжних речовин крему.

На наступному підетапі було розроблено градієнтну хроматографічну методику визначення супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду, яка забезпечує розділення основної речовини, супровідних домішок та продуктів деградації.

З метою підтвердження придатності розробленої методики для контролю домішок, на третьому етапі було проведено дослідження профілю деградації нафтифіну гідрохлориду. Стресові випробування включали вплив різних факторів (кислотного та лужного гідролізу, окиснення, температурного впливу) відповідно до загальних підходів ICH Q1A(R2) [32]. Стресові дослідження дозволили виявити продукти деградації та оцінити селективність аналітичної методики.

Усі розроблені методики підлягали валідації відповідно до вимог ICH Q2 (R2) за показниками специфічності, лінійності, правильності, прецизійності та робастності [5]. Додатково проводилась оцінка ефективності методик з урахуванням часу аналізу, витрат розчинників та можливості їх впровадження у рутинну практику.

2.2 Фізико-хімічні властивості об'єктів дослідження

Парацетамол (ацетамінофен) – це N-(4-гідроксифеніл)ацетамід (див. рис. 1.1).

Фізико-хімічні властивості: білий чи майже білий кристалічний порошок. Малорозчинний у воді, легко розчинний в етанолі (96%), дуже малорозчинний у метиленхлориді [14].

Фенілефрину гідрохлорид – це (1R)-1-(3-гідроксифеніл)-2-(метиламіно)етанолу гідрохлорид (див. рис. 1.2).

Фізико-хімічні властивості: білий чи майже білий кристалічний порошок. Легко розчинний у воді та етанолі (96%) [14].

Феніраміну малеат – це (3RS)-N,N-диметил-3-феніл-3-(піридин-2-іл)пропан-1-амін (Z)-бутендіоат (див. рис. 1.3).

Фізико-хімічні властивості: білий чи майже білий кристалічний порошок. Дуже розчинний у воді, легко розчинний в етанолі (96 %), у метанолі та в метиленхлориді [14].

При виконанні дослідження використовували стандартні зразки ацетамінофену (USP RS, 0.999 мг/г), фенілефрину гідрохлориду (USP RS, 0.999 мг/г), феніраміну малеату (USP RS, 0.999 мг/г), 4-амінофенолу (USP RS, 1.00 мг/г), порошок для орального розчину “Цитрік” (АТ «Фармак»).

Нафтифіну гідрохлорид – це (E)-N-метил-N-(нафтален-1-ілметил)-3-фенілпроп-2-ен-1-аміну гідрохлорид (див. рис. 1.4).

Фізико-хімічні властивості: білий чи майже білий кристалічний порошок. Малорозчинний у воді, добре розчинний в органічних розчинниках, таких як метанол, етанол [26].

При виконанні дослідження використовували стандартний зразок нафтифіну гідрохлориду (USP RS, 0.999 мг/г), цинамоновий альдегід (“Sigma-Aldrich”, 0.990 мг/г), (N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду (“Sigma-Aldrich”, 0.999 мг/г), крем 1% “Естезифін” (АТ «Фармак»), розчин нашкірний 1 % “Естезифін” (АТ «Фармак»).

Використані у роботі реактиви та розчинники: натрію гідроксид (“Sigma-Aldrich”), перекис водню 30 % (“Sigma-Aldrich”), кислота хлористоводнева (“Carlo Erba”), ацетонітрil (“Sigma-Aldrich”, “Honeywell”),

кислота фосфорна (“Sigma-Aldrich”), натрію октансульфонат (“Sigma-Aldrich”), метанол (“Sigma-Aldrich”), амонію ацетат (“Sigma-Aldrich”, “Merck”), кислота оцтова льодяна (“Sigma-Aldrich”), динатрію фосфат (“Sigma-Aldrich”).

2.3 Характеристика методик дослідження

Для проведення досліджень використовували метод високоефективної рідинної хроматографії з УФ- та діодно-матричним детектуванням.

Взяття наважок стандартних зразків, досліджуваних лікарських засобів та реагентів проводили з точністю $\pm 0,2$ мг. Для вимірювання об’ємів розчинів використовували піпетки, циліндри та мірні колби класу А.

2.3.1 ВЕРХ-методика визначення супровідних домішок парацетамолу в комбінованому порошку

Випробування проводять методом рідинної хроматографії з діодно-матричним детектуванням відповідно до вимог ДФУ [99].

Розчинник. Суміш метанолу Р і води Р (1:1), рН якої доведено до 3,5 кислотою фосфорною Р.

Випробовуваний розчин. Вміст 5 саше комбінованого порошку (еквівалентно 1625 мг парацетамолу, 50 мг фенілефрину гідрохлориду та 100 мг феніраміну малеату) переносять у мірну колбу місткістю 500 мл, розчиняють у відповідному розчиннику із застосуванням ультразвукової обробки та доводять об’єм до мітки. Після фільтрування 2,5 мл отриманого розчину доводять розчинником до 10,0 мл. Кінцева концентрація парацетамолу у випробовуваному розчині становить 812,5 мкг/мл.

Розчин порівняння. Розчин порівняння готують зі стандартних зразків парацетамолу та 4-амінофенолу з подальшим послідовним розведенням метанолом та водою, рН якої доведено до 3,5 кислотою фосфорною. Кінцева

концентрація парацетамолу та 4-амінофенолу у розчині порівняння становить 0,8 мкг/мл

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з спектрофотометричним детектором за таких умов (табл. 2.1):

- колонка ZORBAX SB-Aq розміром 4,6 x 50 мм заповнена сорбентом з розміром часток 5 мкм;
- рухома фаза А: 1,1 г натрію октансульфонату Р (1,19 г натрію октансульфонату моногідрату Р) розчиняють в 900 мл води Р, доводять рН фосфорною кислотою Р до $3,2 \pm 0,05$, доводять об'єм розчину водою Р до 1000,0 мл і перемішують;
- рухома фаза В: метанол Р;
- швидкість рухомої фази 1,0 мл/хв;
- температура колонки 40 °С;
- детектування за довжини хвилі 225 нм;
- об'єм інжекції 10 мкл;
- температура термостату автосамплеру 10 °С.

Таблиця 2.1 – Режим елюювання за умов ВЕРХ визначення 4-амінофенолу в комбінованому порошку

Час (хв)	Рухома фаза А, (% об/об)	Рухома фаза В, (% об/об)	Примітки
0	90	10	Реєстрація сигналу
7	90	10	Реєстрація сигналу
12	40	60	Реєстрація сигналу
15	40	60	Промивка колонки
17	90	10	Перехід на початкове співвідношення фаз
20	90	10	Урівноваження колонки

2.3.2 ВЕРХ-методика кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду і феніраміну малеату в комбінованому порошку

Випробування проводять методом рідинної хроматографії з діодно-матричним детектуванням відповідно до вимог ДФУ [99].

Розчинник. Суміш метанолу Р і води Р (1:1), рН якої доведено до 3,5 кислотою фосфорною Р.

Випробовуваний розчин. Вміст 5 саше комбінованого порошку (еквівалентно 1625 мг парацетамолу, 50 мг фенілефрину гідрохлориду та 100 мг феніраміну малеату) переносять у мірну колбу місткістю 500 мл, розчиняють у відповідному розчиннику із застосуванням ультразвукової обробки та доводять об'єм до мітки. Після фільтрування 2,0 мл отриманого розчину доводять розчинником до 25,0 мл. Кінцеві концентрації у випробовуваному розчині становлять: парацетамолу – 260 мкг/мл, фенілефрину гідрохлориду – 8 мкг/мл та феніраміну малеату – 16 мкг/мл.

Розчин порівняння (а). Розчин порівняння фенілефрину гідрохлориду готують шляхом розчинення 20,0 мг стандартного зразка фенілефрину гідрохлориду у мірній колбі місткістю 50 мл. Кінцева концентрація фенілефрину гідрохлориду у розчині становить 400 мкг/мл.

Розчин порівняння (b). Розчин порівняння феніраміну малеату готують шляхом розчинення 20,0 мг стандартного зразка феніраміну малеату у мірній колбі місткістю 25 мл. Кінцева концентрація феніраміну малеату у розчині становить 800 мкг/мл.

Розчин порівняння (с). Розчин порівняння готують шляхом розчинення 26,0 мг стандартного зразка парацетамолу у мірній колбі місткістю 100 мл з додаванням 2,0 мл розчину порівняння (а) та 2,0 мл розчину порівняння (b). Кінцеві концентрації у розчині становлять: парацетамолу – 260 мкг/мл, фенілефрину гідрохлориду – 8 мкг/мл та феніраміну малеату – 16 мкг/мл.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з спектрофото-метричним детектором за таких умов (табл. 2.2):

- колонка ZORBAX SB-Aq розміром 4,6 x 50 мм заповнена сорбентом з розміром часток 5 мкм;
- рухома фаза А: 1,1 г натрію октансульфонату Р (1,19 г натрію октансульфонату моногідрату) розчиняють в 900 мл води Р, доводять рН фосфорною кислотою Р до $3,2 \pm 0,05$, доводять об'єм розчину водою Р до 1000,0 мл і перемішують;
- рухома фаза В: метанол Р;
- швидкість рухомої фази 1,0 мл/хв;
- температура колонки 40 °С;
- детектування за довжини хвилі 273 нм;
- об'єм інжекції 10 мкл;
- температура термостату автосамплеру 10 °С.

Таблиця 2.2 – Режим елюювання за умов ВЕРХ-визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату в комбінованому порошку

Час (хв)	Рухома фаза А, (% об/об)	Рухома фаза В, (% об/об)	Примітки
0	90	10	Реєстрація сигналу
4	40	60	Реєстрація сигналу
6	40	60	Реєстрація сигналу
8	90	10	Перехід на початкове співвідношення фаз
10	90	10	Урівноваження колонки

2.3.3 ВЕРХ-методика визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату в комбінованому порошку для проведення тесту «Однорідність дозованих одиниць»

Випробування проводять методом рідинної хроматографії з діодно-матричним детектуванням відповідно до вимог ДФУ [99].

Розчинник. Суміш метанолу Р і води Р (1:1), рН якої доведено до 3,5 кислотою фосфорною Р.

Випробовуваний розчин. Вміст одного саше комбінованого порошку (еквівалентно 325 мг парацетамолу, 10 мг фенілефрину гідрохлориду та 20 мг феніраміну малеату) кількісно переносять у мірну колбу місткістю 200 мл, розчиняють у відповідному розчиннику із застосуванням ультразвукової обробки та доводять об'єм до мітки. Після фільтрування 4,0 мл отриманого розчину доводять розчинником до 25,0 мл. Кінцеві концентрації у випробовуваному розчині становлять: парацетамолу – 260 мкг/мл, фенілефрину гідрохлориду – 8 мкг/мл та феніраміну малеату – 16 мкг/мл.

Хроматографують розчин порівняння (с), приготований, як описано у підрозділі 2.3.2, та випробовуваний розчин за умов хроматографування, наведених у підрозділі 2.3.2.

2.3.4 ВЕРХ-методика визначення супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду в розчині та кремі

Випробування проводять методом рідинної хроматографії з діодно-матричним детектуванням відповідно до вимог ДФУ [99].

Буферний розчин 6,5. 0,4 г динатрію гідрофосфату безводного Р і 2,34 г натрію октансульфонату Р розчиняють у 1000 мл води Р доводять рН до $6,5 \pm 0,05$ 10 % розчином фосфорної кислоти Р.

Рухома фаза А. Буферний розчин рН 6,5 : Ацетонітрил Р (80:20).

Рухома фаза В. Буферний розчин рН 6,5 : Ацетонітрил Р (5:95).

Рухомі фази А і В фільтрують крізь фільтр розміром пор 0,45 мкм.

Розчинник. Ацетонітрил Р.

Випробовуваний розчин (для розчину). 2,0 мл препарату, що містить 10 мг/мл нафтифіну гідрохлориду, розчиняють у розчиннику та доводять об'єм тим самим розчинником до 50,0 мл. Кінцева концентрація нафтифіну гідрохлориду у випробовуваному розчині становить 400 мкг/мл.

Випробовуваний розчин (для крему). 2,0 г крему, що містить 10 мг/г нафтифіну гідрохлориду, розчиняють у 30 мл розчинника, витримують на ультразвуковій бані протягом 15 хв при температурі 45 °С, після чого охолоджують до кімнатної температури та доводять об'єм тим самим розчинником до 50,0 мл. Отриманий розчин перемішують та фільтрують крізь мембранний нейлоновий фільтр з розміром пор 0,22 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Кінцева концентрація нафтифіну гідрохлориду у випробовуваному розчині становить 400 мкг/мл.

Розчин порівняння. Розчин порівняння готують шляхом розчинення 20,0 мг стандартного зразка нафтифіну гідрохлориду, 20,0 мг цинамонового альдегіду та 20,0 мг N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду у 100,0 мл розчинника. 1,0 мл отриманого розчину доводять розчинником до 100,0 мл. Кінцеві концентрації нафтифіну гідрохлориду, цинамонового альдегіду та N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду становлять по 2 мкг/мл.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за таких умов (табл. 2.3):

- колонка Synergi Hydro-RP розміром 250 x 4,6 мм, заповнена сорбентом з розміром часток 4 мкм;
- швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі 270 нм;
- температура колонки: 40 °С;
- температура автосамплера: 25 °С;
- об'єм інжекції: 15 мкл.

Таблиця 2.3 – Режим елюювання за умов ВЕРХ-визначення супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду в розчині та кремі

Час (хв)	Рухома фаза А, (% об/об)	Рухома фаза В, (% об/об)	Примітки
0	55	45	Реєстрація сигналу
12	55	45	Реєстрація сигналу
35	10	90	Реєстрація сигналу
37	0	100	Реєстрація сигналу
45	0	100	Реєстрація сигналу
46	55	45	Перехід на початкове співвідношення фаз
55	55	45	Урівноваження колонки

2.3.5 ВЕРХ-методика кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду в розчині та кремі

Випробування проводять методом рідинної хроматографії з діодно-матричним детектуванням відповідно до вимог ДФУ [99].

Рухома фаза. 1,154 г амонію ацетату Р розчиняють у 300 мл води Р, додають 0,2 мл кислоти оцтової льодяної Р та перемішують. Отриманий розчин змішують з метанолом Р у співвідношенні 30:70.

Розчинник. Метанол Р.

Випробовуваний розчин (для розчину). 0,8 мл препарату відбирають у мірну колбу місткістю 100 мл та доводять об'єм розчинником до мітки. Кінцева концентрація нафтифіну гідрохлориду у випробовуваному розчині становить 80 мкг/мл.

Випробовуваний розчин (для крему). 0,8 г препарату, що містить 10 мг/г нафтифіну гідрохлориду, розчиняють у 50 мл розчинника та витримують на ультразвуковій бані протягом приблизно 5 хв при температурі 45 °С до

повного розчинення основи. Після охолодження до кімнатної температури об'єм розчину доводять тим самим розчинником до 100,0 мл та перемішують. Отриманий розчин фільтрують крізь фільтр з розміром пор 0,45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату. Кінцева концентрація нафтифіну гідрохлориду у випробовуваному розчині становить 80 мкг/мл.

Розчин порівняння. 40,0 мг стандартного зразка нафтифіну гідрохлориду розчиняють у 30,0 мл розчинника, доводять об'єм тим самим розчинником до 50,0 мл та перемішують. 10,0 мл отриманого розчину доводять тим самим розчинником до 100,0 мл. Кінцева концентрація нафтифіну гідрохлориду у розчині порівняння становить 80 мкг/мл.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за таких умов:

- колонка Gemini C18 розміром 50 x 4,6 мм, заповнена сорбентом з розміром часток 3 мкм або Luna C18 розміром 50 x 4,6 мм, заповнена сорбентом з розміром часток 3 мкм.

- швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;
- детектування за довжини хвилі 254 нм;
- температура колонки: 25 °C;
- об'єм інжекції: 10 мкл.

2.3.6 Методика визначення профілів деградації нафтифіну гідрохлориду у розчині

Дослідження профілів деградації проводили із застосуванням кислотного та лужного гідролізу, окиснення, температурного та світлового впливу відповідно до загальних підходів ICH Q1A(R2) [32].

Кислотний гідроліз

Випробовуваний розчин для контролю супровідних домішок. До 2,0 мл препарату додавали 1,0 мл 5 М розчину кислоти хлористоводневої та залишали на 24 години при кімнатній температурі. Через зазначений проміжок

часу розчин нейтралізували 1,0 мл розчину натрію гідроксиду відповідної концентрації. Об'єм розчину доводили ацетонітрилом Р до 50,0 мл та перемішували.

Випробовуваний розчин для контролю кількісного визначення. 2,0 мл випробовуваного розчину для контролю супровідних домішок доводили до 10,0 мл метанолом Р.

Розчин плацебо готували у такий самий спосіб, як і випробовувані розчини.

Лужний гідроліз

Випробовуваний розчин для контролю супровідних домішок. До 2,0 мл препарату додавали 1,0 мл 5 М розчину натрію гідроксиду та залишали на 24 години при кімнатній температурі. Через зазначений проміжок часу розчин нейтралізували 1,0 мл розчином хлористоводневої кислоти відповідної концентрації. Доводили об'єм розчину ацетонітрилом Р до 50,0 мл, перемішували.

Випробовуваний розчин для контролю кількісного визначення. 2,0 мл випробовуваного розчину для контролю супровідних домішок доводили до 10,0 мл метанолом Р.

Розчин плацебо готували у такий самий спосіб, як і випробовувані розчини.

Окиснення

Випробовуваний розчин для контролю супровідних домішок. До 2,0 мл препарату додавали 1,0 мл 9 % розчину пероксиду водню та залишали на 24 години при кімнатній температурі. Доводили об'єм розчину ацетонітрилом Р до 50,0 мл, перемішували.

Випробовуваний розчин для контролю кількісного визначення. 2,0 мл випробовуваного розчину для контролю супровідних домішок доводили до 10,0 мл метанолом Р.

Розчин плацебо готували у такий самий спосіб, як і випробовувані розчини.

Вплив температури

Випробовуваний розчин для контролю супровідних домішок. 2,0 мл препарату поміщали у флакон для парофазної приставки місткістю 20 мл, споряджений прокладкою та металевим обтискним ковпачком, герметично закривали і витримували при температурі 70 °С протягом 3 діб. Далі кількісно переносили у мірну колбу місткістю 50,0 мл за допомогою 30 мл розчинника, доводили об'єм розчину ацетонітрилом Р до 50,0 мл, перемішували.

Випробовуваний розчин для контролю кількісного визначення. 2,0 мл випробовуваного розчину для контролю супровідних домішок доводили до 10,0 мл метанолом Р.

Розчин плацебо готували у такий самий спосіб, як і випробовувані розчини.

Вплив УФ-світла.

Випробовуваний розчин для контролю супровідних домішок. 2,0 мл препарату поміщали у флакон для парофазної приставки місткістю 20 мл, споряджений прокладкою та металевим обтискним ковпачком, герметично закривали і витримували під дією світла протягом 7 діб. Далі кількісно переносили у мірну колбу місткістю 50,0 мл за допомогою 30 мл розчинника, доводили об'єм розчину ацетонітрилом Р до 50,0 мл, перемішували.

Випробовуваний розчин для контролю кількісного визначення. 2,0 мл кожного випробовуваного розчину для контролю супровідних домішок доводили до 10,0 мл метанолом Р.

Розчин плацебо готували у такий самий спосіб, як і випробовувані розчини.

Випробування проводять методом рідинної хроматографії з діодно-матричним детектуванням відповідно до вимог ДФУ [99].

Досліджувані зразки: розчин нашкірний 1% “Естезифін”, який зберігали протягом 12 місяців за температури 30 °С та відносній вологості 75 % та свіжоприготоване плацебо лікарського засобу.

Умови хроматографування. Супровідні домішки визначали за умов, описаних у підрозділі 2.3.4. Кількісне визначення проводили за умов, описаних у підрозділі 2.3.5.

Приготування розчинів порівняння. Для аналізу супровідних домішок готували розчин порівняння з концентрацією нафтифіну гідрохлориду, цинамонового альдегіду та N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду по 2 мкг/мл.

Для аналізу кількісного визначення готували розчин порівняння з концентрацією нафтифіну гідрохлориду 80 мкг/мл.

2.3.7 Методика визначення профілів деградації нафтифіну гідрохлориду у кремі

Кислотний гідроліз

Випробовуваний розчин для контролю супровідних домішок. До 2,0 г препарату додавали 20 мл ацетонітрилу Р, витримували на ультразвуковій бані протягом 15 хв при температурі 45 °С. Додавали 1,0 мл 5 М розчину кислоти хлористоводневої та залишали на 24 години при кімнатній температурі. Через зазначений проміжок часу розчин нейтралізували 1,0 мл розчину натрію гідроксиду відповідної концентрації. Далі доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл, перемішували. Отриманий розчин фільтрували крізь мембранний фільтр (NY) з розміром пор 0,22 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Випробовуваний розчин для контролю кількісного визначення. 2,0 мл випробовуваного розчину для контролю супровідних домішок доводили до 10,0 мл метанолом Р.

Розчин плацебо готували у такий самий спосіб, як і випробовувані розчини.

Лужний гідроліз

Випробовуваний розчин для контролю супровідних домішок. До 2,0 г препарату додавали 20 мл ацетонітрилу Р, витримували на ультразвуковій бані протягом 15 хв при температурі 45 °С. Додавали 1,0 мл 5 М розчину натрію гідроксиду та залишали на 24 години при кімнатній температурі. Через зазначений проміжок часу розчин нейтралізували 1,0 мл розчином хлористоводневої кислоти відповідної концентрації. Далі доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл, перемішували. Отриманий розчин фільтрували крізь мембранний фільтр (NY) з розміром пор 0,22 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Випробовуваний розчин для контролю кількісного визначення. 2,0 мл випробовуваного розчину для контролю супровідних домішок доводили до 10,0 мл метанолом Р.

Розчин плацебо готували у такий самий спосіб, як і випробовувані розчини.

Окиснення

Випробовуваний розчин для контролю супровідних домішок. До 2,0 г препарату додавали 20 мл ацетонітрилу Р, витримували на ультразвуковій бані протягом 15 хв при температурі 45 °С. Додавали 1,0 мл 9 % розчину пероксиду водню та залишали на 24 години при кімнатній температурі. Далі доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл, перемішували. Отриманий розчин фільтрували крізь мембранний фільтр (NY) з розміром пор 0,22 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Випробовуваний розчин для контролю кількісного визначення. 2,0 мл випробовуваного розчину для контролю супровідних домішок доводили до 10,0 мл метанолом Р.

Розчин плацебо готували у такий самий спосіб, як і випробовувані розчини.

Вплив температури

Випробовуваний розчин для контролю супровідних домішок. Препарат поміщали у флакон для парофазної приставки місткістю 20 мл, споряджений прокладкою та металевим обтискним ковпачком, герметично закривали і витримували при температурі 70 °С протягом 3 діб. 2,0 г переносили у мірну колбу місткістю 50,0 мл за допомогою 30 мл ацетонітрилу Р, витримували на ультразвуковій бані протягом 15 хв при температурі 45 °С. Отриманий розчин охолоджували до кімнатної температури, доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл, перемішували та фільтрували крізь мембранний фільтр (NY) з розміром пор 0,22 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Випробовуваний розчин для контролю кількісного визначення. 2,0 мл випробовуваного розчину для контролю супровідних домішок доводили до 10,0 мл метанолом Р.

Розчин плацебо готували у такий самий спосіб, як і випробовувані розчини.

Вплив УФ-світла.

Випробовуваний розчин для контролю супровідних домішок. Препарат поміщали у флакон для парофазної приставки місткістю 20 мл, споряджений прокладкою та металевим обтискним ковпачком, герметично закривали та витримували під дією світла протягом 7 діб. 2,0 г переносили у мірну колбу місткістю 50,0 мл за допомогою 30 мл ацетонітрилу Р, витримували на ультразвуковій бані протягом 15 хв при температурі 45 °С. Отриманий розчин охолоджували до кімнатної температури, доводили об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0 мл, перемішували та фільтрували крізь мембранний фільтр (NY) з розміром пор 0,22 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Випробовуваний розчин для контролю кількісного визначення. 2,0 мл кожного випробовуваного розчину для контролю супровідних домішок доводили до 10,0 мл метанолом Р.

Розчин плацебо готували у такий самий спосіб, як і випробовувані розчини.

Визначення проводили методом рідинної хроматографії з діодно-матричним детектуванням відповідно до вимог ДФУ [99].

Досліджувані зразки: крем 1% “Естезифін” (АТ «Фармак»), який зберігали протягом 24 місяців за температури 30 °С та відносній вологості 75 %, та свіжоприготоване плацебо лікарського засобу.

Умови хроматографування. Супровідні домішки визначали за умов, описаних у підрозділі 2.3.4. Кількісне визначення проводили за умов, описаних у підрозділі 2.3.5.

Приготування розчинів порівняння. Для аналізу супровідних домішок готували розчин порівняння з концентрацією нафтифіну гідрохлориду, цинамонового альдегіду та N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду по 2 мкг/мл кожного в ацетонітрилі.

Для аналізу кількісного визначення готували розчин порівняння з концентрацією нафтифіну гідрохлориду 80 мкг/мл в метанолі.

РОЗДІЛ 3

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ПОРОШКУ ПАРАЦЕТАМОЛУ, ФЕНІЛЕФРИНУ ГІДРОХЛОРИДУ, ФЕНІРАМІНУ МАЛЕАТУ

Початковим етапом дослідження була оптимізація ВЕРХ-методик, придатних для рутинного застосування у лабораторіях контролю якості, для комбінованого лікарського засобу у формі порошку, що містить парацетамол, фенілефрину гідрохлорид та феніраміну малеат. Розроблені методики призначені для використання при проведенні випробувань за показниками «Кількісне визначення», «Супровідні домішки» та «Однорідність дозованих одиниць».

3.1 Оптимізація та валідація методики визначення супровідних домішок парацетамолу в комбінованому порошку методом рідинної хроматографії

Оптимізація аналітичної методики для визначення супровідних домішок парацетамолу в комбінованому лікарському засобі проводилась з урахуванням сучасних вимог до методів контролю якості, зокрема щодо їх селективності, відтворюваності, експресності та придатності для рутинного застосування у виробничих лабораторіях. При оптимізації методики необхідно було забезпечити ефективне розділення парацетамолу та його домішки – 4-амінофенолу – у присутності інших активних фармацевтичних інгредієнтів і компонентів плацебо.

На першому етапі дослідження здійснювали підбір оптимальних умов хроматографування, включаючи вибір стаціонарної фази, складу рухомої фази та режиму елюювання. Встановлено, що використання колонки Zorbax SB-Aq (50 мм × 4,6 мм, 5 мкм) є доцільним для розділення досліджуваних компонентів [94]. Стаціонарна фаза Zorbax SB-Aq призначена для роботи з

рухомими фазами з високим вмістом води та забезпечує утримування полярних сполук і відтворюваність часу утримування без колапсу стаціонарної фази [100].

У ході оптимізації було проведено підбір хроматографічної колонки, що дало змогу підвищити ефективність розділення та покращити форму піків. Оптимізація умов хроматографування також дозволила скоротити загальний час аналізу більш ніж удвічі без погіршення роздільної здатності [94, 101].

Як рухому фазу було обрано систему, що складається з 1,1 г/л розчину натрію октансульфонату (з корекцією рН до 3,2 ортофосфорною кислотою) та метанолу. Використання іон-парного реагенту дозволило покращити утримування полярних компонентів та форму хроматографічних піків. Значення рН рухомої фази 3,2 було обрано за результатами оптимізації умов хроматографічного розділення.

Для досягнення необхідної селективності застосовано градієнтний режим елюювання, який дозволив ефективно розділити парацетамол та 4-амінофенол у матриці комбінованого порошку. Оптимальні параметри хроматографування включали швидкість потоку 1,0 мл/хв, температуру колонки 40 °С, об'єм інжекції 10 мкл та довжину хвилі детектування 225 нм. Загальний час хроматографування становив 20 хв. Типову хроматограму розчину порівняння за оптимізованих умов наведено на рисунку 3.1.

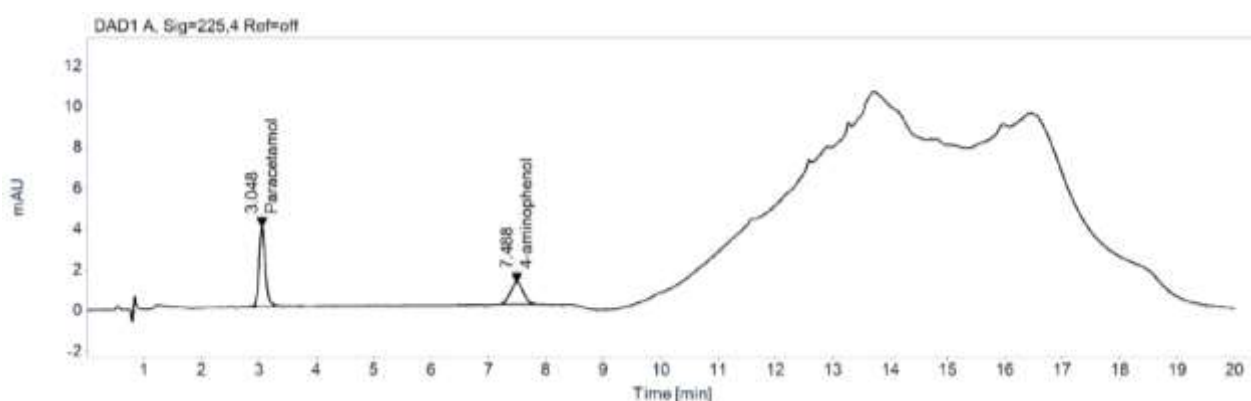


Рисунок 3.1 – Типова хроматограма розчину порівняння
(колонка Zorbax SB-Aq 50 мм × 4,6 мм, 5 мкм)

Хроматографічна система вважається придатною, якщо на хроматограмі розчину порівняння:

- коефіцієнт симетрії піку 4-амінофенолу має бути не більше 1,5;
- коефіцієнт розділення між піками парацетамолу та 4-амінофенолу має бути не менше 5.

Розраховують вміст 4-амінофенолу (X_{1i}) в препараті, у відсотках, за формулою:

$$X_{1i} = \frac{S_i \cdot m_0 \cdot DF_0 \cdot P_0 \cdot b}{S_0 \cdot m_i \cdot DF_1 \cdot X_{2i}} \quad (3.1)$$

де: S_i – середнє значення площ піків 4-амінофенолу, обчислене з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків 4-амінофенолу, обчислене з хроматограм розчину порівняння;

DF_0 – коефіцієнт розведення розчину порівняння;

DF_1 – коефіцієнт розведення випробовуваного розчину;

m_0 – маса наважки СЗ 4-амінофенолу, взятого для приготування розчину порівняння, в міліграмах;

m_i – маса наважки препарату, взята для приготування випробовуваного розчину, у грамах;

P_0 – вміст основної речовини в СЗ 4-амінофенолу, взятому для приготування розчину порівняння, у відсотках;

b – середня маса вмісту саше, в грамах;

X_{2i} – вміст парацетамолу в препараті, розрахований у розділі «Кількісне визначення. Парацетамол, фенілефрину гідрохлорид, феніраміну малеат», у міліграмах.

Нормування:

Вміст 4-амінофенолу має бути не більше 0,1 %.

Валідацію розробленої методики проводили за такими характеристиками: специфічність, лінійність у межах робочого

діапазону, правильність, прецизійність, межа виявлення та межа кількісного визначення [5].

На хроматограмах бланкового розчину та розчину плацебо не виявлено піків, що інтерферують з піком 4-амінофенолу. Специфічність методики підтверджено.

Придатність хроматографічної системи перевіряли кожного аналітичного дня. Отримані результати наведено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Оцінка придатності хроматографічної системи

Параметр	Критерій прийнятності	Результат
Коефіцієнт симетрії піку 4-амінофенолу з хроматограми розчину порівняння	$\leq 1,5$	1,0–1,1
Коефіцієнт розділення між піками парацетамолу та 4-амінофенолу з хроматограми розчину порівняння	≥ 5	13,7–14,4
Співвідношення сигнал/шум для піків 4-амінофенолу з хроматограми розчину для чутливості	≥ 10	10,8–34,3
Відносне стандартне відхилення (RSD) площ піків 4-амінофенолу, отриманих із хроматограм розчину порівняння	$\leq 10,0 \%$	1,074–3,299 %

Отримані результати відповідають встановленим критеріям придатності хроматографічної системи.

Для підтвердження коректності приготування розчинів готували розчин порівняння та контрольний розчин і розраховували фактор відгуку (RF) для кожного розчину за формулою:

$$RF_i = \frac{\overline{S_{0i}}}{C_{0i}} \quad (3.2)$$

де: C_i – концентрація 4-амінофенолу у відповідному розчині, мкг/мл;

$\bar{S}_i$ – середнє значення площ піків 4-амінофенолу у відповідному розчині.

Відношення факторів відгуку (RRF) розчину порівняння та контрольного розчину розраховували за формулою:

$$RRF = \frac{RF_2}{RF_1} \quad (3.3)$$

Результати наведено у таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Результати хроматографування розчинів порівняння та контрольного розчину

Параметр	Розчин порівняння	Контрольний розчин
Індивідуальні значення площ піків	16,997	17,767
	17,358	17,898
	18,127	17,320
Середнє значення площ піків	17,494	17,662
RSD, %	3,299	1,716
Концентрація 4-амінофенолу, мкг/мл	0,813	0,830
RF	21,53	21,28
RRF, %	98,830	

Отримане значення RRF становило 98,830 % та відповідало встановленому критерію прийнятно сті (93,0-107,0 %), що підтверджує коректність приготування розчинів.

Дослідження лінійності проводили в діапазоні концентрацій від 0,166 мкг/мл до 1,245 мкг/мл, що відповідає 0,020–0,153 % від номінального вмісту парацетамолу у випробовуваному розчині.

Параметри лінійної регресії розраховували відповідно до рекомендацій ДФУ 2.4, п. 5.3.N.1 [99]. За отриманим рівнянням регресії розраховували «знайдені» значення площ піків за формулою:

$$s_i = a + b \cdot C_i \quad (3.4)$$

де: s – значення площ піків, розраховане за рівнянням регресії;

C_i – концентрація 4-амінофенолу у відповідному розчині для дослідження лінійності, мкг/мл;

a – вільний член рівняння регресії;

b – кутовий коефіцієнт рівняння регресії.

Нормалізоване значення вільного члена рівняння регресії (у відсотках до сигналу, що відповідає номінальній концентрації аналіту в розчині) розраховували за формулою:

$$|a_i|, \% = \left| \frac{a \cdot X_{L5}}{\overline{S}_{L5} \cdot X_{nom}} \right| \cdot 100 \% \quad (3.5)$$

де: $\overline{S}_{L5}$ – середнє значення площі піку 4-амінофенолу з хроматограми розчину L5;

X_{L5} – відсоток концентрації 4-амінофенолу у розчині L5 від номінальної концентрації парацетамолу у випробовуваному розчині, %

X_{nom} – нормування вмісту 4-амінофенолу на момент випуску (0,1 %).

Результати хроматографування наведено в таблиці 3.3. Розраховані параметри лінійної регресії наведено в таблиці 3.4.

Таблиця 3.3 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії

Розчин	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
S_i	3,557	7,287	8,904	12,815	18,176	24,225	27,078
	3,764	7,113	9,357	13,231	17,500	23,510	27,201
$\overline{S}_l$	3,661	7,200	9,131	13,023	17,838	23,868	27,140
RSD, %	3,999	1,709	3,508	2,259	2,680	2,118	0,320
C_i , мкг/мл	0,166	0,332	0,415	0,623	0,830	1,079	1,245
s_i	3,515	7,151	8,968	13,513	18,057	23,510	27,145
$Res = \overline{S}_l - s_i$	0,145	0,049	0,162	-0,490	-0,219	0,358	-0,006

Таблиця 3.4 – Параметри лінійної регресії

Параметр	a	a , %	B	r	S ₀	S _a
Критерій	N/A	5,0	N/A	0,990	N/A	N/A
Результат	-0,120	0,688	21,900	0,99949	0,305	0,238

Графік залежності аналітичного сигналу від концентрації 4-амінофенолу в модельних розчинах наведено на рисунку 3.2, графік залишків – на рисунку 3.3. Розраховані параметри лінійної регресії відповідають встановленим критеріям прийнятності, а залишки випадковим чином розподілені відносно нульового значення. Лінійність методики підтверджено в досліджуваному діапазоні концентрацій.

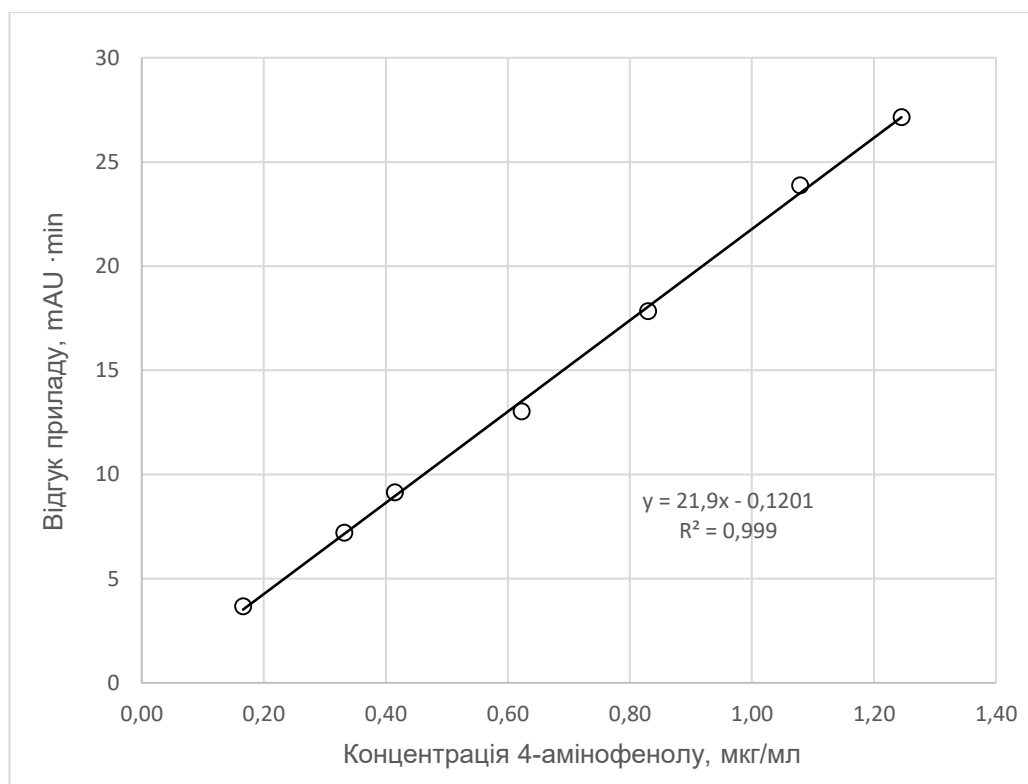


Рисунок 3.2 – Залежність аналітичного сигналу від концентрації 4-амінофенолу

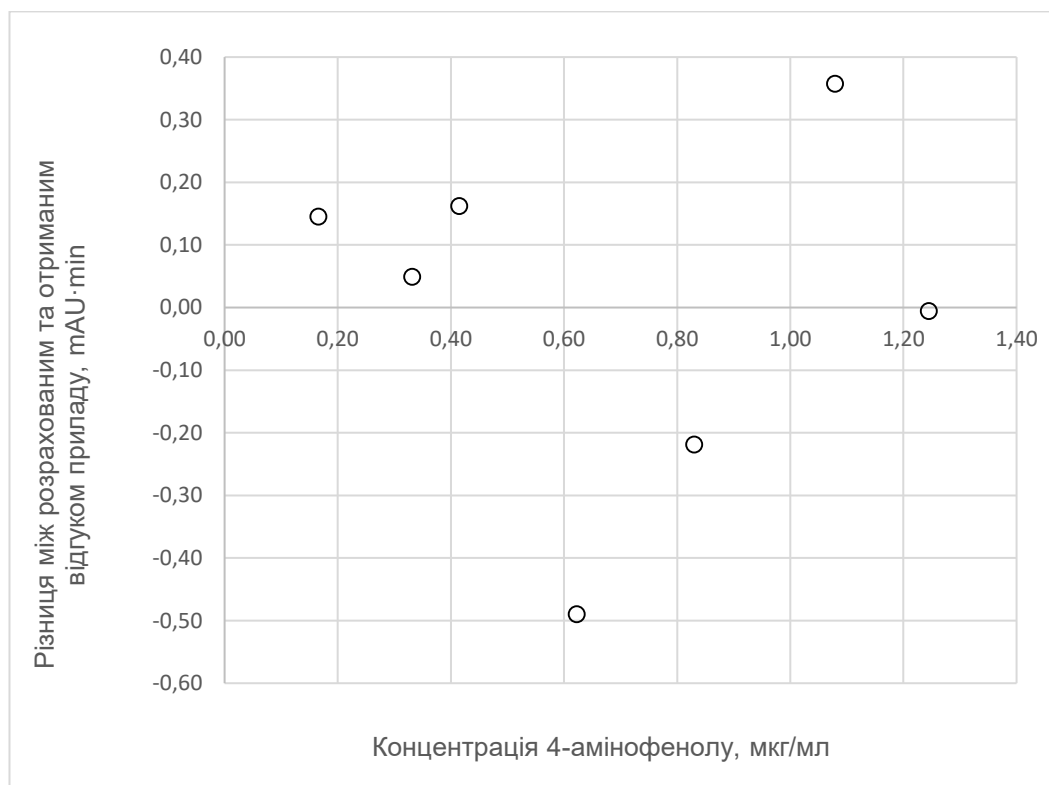


Рисунок 3.3 – Графік залишків

Для дослідження правильності методики готували 12 модельних розчинів із концентрацією 4-амінофенолу від 0,332 мкг/мл до 1,079 мкг/мл (відповідає 0,041 - 0,133 % від номінального вмісту парацетамолу у випробовуваному розчині) то 3 випробовувані розчини. Розчини готували 2 аналітики та аналізували їх з використанням різних одиниць обладнання та хроматографічних колонок. Такий підхід дає змогу оцінити прецизійність методики з урахуванням варіабельності результатів за різних внутрішньолабораторних умов [102].

У випробовуваному розчині 4-амінофенол не виявлено. Знайдену концентрацію 4-амінофенолу у модельних розчинах розраховували за формулою:

$$C_{m_i} = \frac{C_{01} \cdot \bar{S}_i}{\bar{S}_{01}} \quad (3.6)$$

де: $\bar{S}_i$ – середнє значення площ піків 4-амінофенолу з хроматограми відповідного модельного розчину;

$\bar{S}_{01}$ – середнє значення площ піків 4-амінофенолу з хроматограми розчину порівняння;

C_{01} – концентрація 4-амінофенолу у розчині порівняння.

Співвідношення «Знайдено C_{m_i} » / «Введено C_{t_i} » розраховували за формулою:

$$Recovery_i = \frac{C_{m_i}}{C_{t_i}} \cdot 100\% \quad (3.7)$$

Результати хроматографування та розрахунків для аналітика А наведено в таблиці 3.6, для аналітика Б – у таблиці 3.7. Оцінку результатів наведено в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5 – Оцінка правильності та прецизійності методики

Параметр		Критерій прийнятності	За результатами		
			Аналітик А	Аналітик Б	Обох аналітиків
Індивідуальні значення ступеня вилучення	M1	80,0 - 120,0 %	86,202-94,183 %	97,616 - 102,928 %	86,202 - 102,928 %
	M2-M4	90,0 - 110,0 %	93,689 - 101,568 %	100,959 - 104,465 %	93,689 - 104,465 %
Середнє значення ступеня вилучення	M1	90,0 - 110,0 %	90,765 %	100,957 %	95,861 %
	M2-M4	95,0 - 105,0 %	97,024 %	102,399 %	99,712 %
RSD для кожного з аналітиків	M1	$\leq 15,0$ %	4,530 %	2,882 %	н/в
	M2-M4	$\leq 10,0$ %	2,363 %	0,957 %	
RSD для обох аналітиків	M1	$\leq 20,0$ %	н/в		6,705 %
	M2-M4	$\leq 15,0$ %			3,261 %
Різниця між середніми результатами отриманими 2-ма аналітиками	M1	$\leq 20,0$ %			10,632 %
	M2-M4	$\leq 15,0$ %			5,390 %

Таблиця 3.6 – Експериментальні дані для розрахунку правильності та прецизійності отримані Аналітиком А

Розчин	M1-1	M1-2	M1-3	M2-1	M2-2	M2-3	M3-1	M3-2	M3-3	M4-1	M4-2	M4-3
S_i ,	6,413	5,944	6,653	8,746	9,184	8,501	17,184	16,778	17,166	22,582	22,278	22,434
	6,727	6,380	6,812	7,997	8,967	8,882	17,890	17,719	16,475	22,734	22,839	22,770
$\bar{S}_t$,	6,570	6,162	6,733	8,372	9,076	8,692	17,537	17,249	16,821	22,658	22,559	22,602
RSD, %	3,379	5,003	1,670	6,327	1,691	3,100	2,847	3,858	2,905	0,474	1,758	1,051
$C_{t\ i}$, мкг/мл	0,332	0,332	0,332	0,415	0,415	0,415	0,830	0,830	0,830	1,079	1,079	1,079
$C_{m\ i}$, мкг/мл	0,305	0,286	0,313	0,389	0,422	0,404	0,814	0,801	0,781	1,052	1,048	1,050
Recovery, %	91,91	86,20	94,18	93,69	101,57	97,27	98,13	96,52	94,12	97,53	97,10	97,29
$Recovery_{Av}$, %	90,76			97,51			96,26			97,31		
RSD, %	4,11			3,94			2,02			0,21		

Таблиця 3.7 – Експериментальні дані для розрахунку правильності та прецизійності отримані Аналітиком Б

Розчин	M1-1	M1-2	M1-3	M2-1	M2-2	M2-3	M3-1	M3-2	M3-3	M4-1	M4-2	M4-3
S_i ,	7,048	6,584	7,077	8,700	8,885	8,717	17,559	17,742	17,532	22,603	23,027	23,280
	7,174	6,904	7,062	9,048	9,158	8,957	17,316	17,694	17,781	23,321	23,066	22,239
$\bar{S}_t$,	7,111	6,744	7,070	8,874	9,022	8,837	17,438	17,718	17,657	22,962	23,047	22,760
RSD, %	1,253	3,355	0,150	2,773	2,140	1,920	0,985	0,192	0,997	2,211	0,120	3,234
$C_{t\ i}$, мкг/мл	0,332	0,332	0,332	0,415	0,415	0,415	0,830	0,830	0,830	1,079	1,079	1,079
$C_{m\ i}$, мкг/мл	0,342	0,324	0,340	0,426	0,434	0,425	0,838	0,851	0,848	1,103	1,108	1,094
Recovery, %	102,93	97,62	102,33	102,76	104,46	102,33	100,96	102,58	102,23	102,27	102,64	101,36
$Recovery_{Av}$, %	100,96			103,18			101,92			102,09		
RSD, %	2,91			1,13			0,85			0,66		

Отримані результати відповідають встановленим критеріям прийнятності. Правильність та прецизійність методики підтверджено.

Для підтвердження межі кількісного визначення розраховували співвідношення сигнал/шум, RSD між паралельними інжекціями та ступінь вилучення для піку 4-амінофенолу в модельних розчинах L1–L3. Результати наведено у таблиці 3.8.

Таблиця 3.8 – Оцінка чутливості методики

Розчин	Критерій	L1	L2	L3
Концентрація, мкг/мл	н/в	0,166	0,332	0,415
Концентрація, % від АФІ		0,020	0,041	0,051
S/N	≥ 10	12,8	12,7	33,9
S	н/в	3,661	7,200	9,131
RSD, %	$\leq 15,0 \%$	3,999	1,709	3,508
Recovery, %	80,0 - 120,0 %	102,42	100,72	102,18

Додатково межу кількісного визначення розраховували за параметрами калібрувальної прямої (таблиця 3.4) за формулою:

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_a}{b} = \frac{10 \cdot 0,238}{21,900} = 0,109 \frac{\text{мкг}}{\text{мл}} \quad (3.8)$$

Розраховане значення межі кількісного визначення становило 0,109 мкг/мл, що еквівалентно 0,013 % від вмісту парацетамолу у випробовуваному розчині.

Таким чином, можливість кількісного визначення 4-амінофенолу підтверджено на рівні 0,02 %.

Узагальнення результатів, отриманих у розділі 3.1 на основі проведених розрахунків, наведено у таблиці 3.9.

Таблиця 3.9 – Результати валідації ВЕРХ-методики визначення супровідної домішки парацетамолу (4-амінофенолу) в комбінованому порошку

Валідаційна характеристика	Параметр	Критерій прийнятності	Результат	Відповідність
1	2	3	4	5
Специфічність	Площа піку на хроматограмі бланкового розчину та розчину плацебо, що може інтерферувати з піком 4-амінофенолу	$\leq 0,005 \%$	Не виявлено	Відповідає
Придатність системи	Коефіцієнт симетрії піку 4-амінофенолу з хроматограми розчину порівняння	$\leq 1,5$	$\leq 1,1$	Відповідає
	Коефіцієнт розділення між піками парацетамолу та 4-амінофенолу з хроматограми розчину порівняння	≥ 5	$\geq 13,7$	Відповідає
	Співвідношення сигнал/шум для піків 4-амінофенолу з хроматограми розчину для чутливості	≥ 10	≥ 11	Відповідає
	RSD між паралельними інжекціями з хроматограми розчину порівняння	$\leq 10,0 \%$	$\leq 3,3 \%$	Відповідає
Лінійність	Коефіцієнт кореляції рівняння регресії	$\geq 0,990$	0,999	Відповідає
	Абсолютне значення вільного члена рівняння регресії у нормалізованих координатах	$\leq 5,0 \%$	0,7 %	Відповідає

Продовження таблиці 3.9

1	2		3	4	5
Діапазон застосування	Діапазон, у якому досліджено лінійність, прецизійність та правильність		0,05 - 0,12 % (0,41 – 0,78 мкг/мл)	0,04 - 0,13 % (0,33 – 1,08 мкг/мл)	Відповідає
Правильність	Індивідуальні значення ступеня вилучення	M1	80,0 - 120,0 %	86,202 - 102,928 %	Відповідає
		M2-M4	90,0 - 110,0 %	93,689 - 104,465 %	Відповідає
	Середнє значення ступеня вилучення	M1	90,0 - 110,0 %	95,861 %	Відповідає
		M2-M4	95,0 - 105,0 %	99,712 %	Відповідає
Прецизійність	RSD для кожного з аналітиків	M1	≤ 15,0 %	≤ 4,5 %	Відповідає
		M2-M4	≤ 10,0 %	≤ 2,4 %	Відповідає
	RSD для обох аналітиків	M1	≤ 20,0 %	≤ 6,7 %	Відповідає
		M2-M4	≤ 15,0 %	3,3 %	Відповідає
	Різниця між середніми результатами, отриманими 2-ма аналітиками	M1	≤ 20,0 %	10,6 %	Відповідає
		M2-M4	≤ 15,0 %	5,4 %	Відповідає
Межа кількісного визначення (0,02 %)	Індивідуальні значення ступеня вилучення		80,0 - 120,0 %	102,4 %	Відповідає
	RSD між паралельними інжекціями		≤ 15,0 %	4,0 %	Відповідає
	Співвідношення сигнал/шум		≥ 10	13	Відповідає

Екологічність розробленої ВЕРХ-методики визначення супровідної домішки парацетамолу – 4-амінофенолу – у комбінованому порошку оцінювали із застосуванням інструменту MoGAPI [92]. Відповідну піктограму «зеленості» наведено на рисунку 3.4.

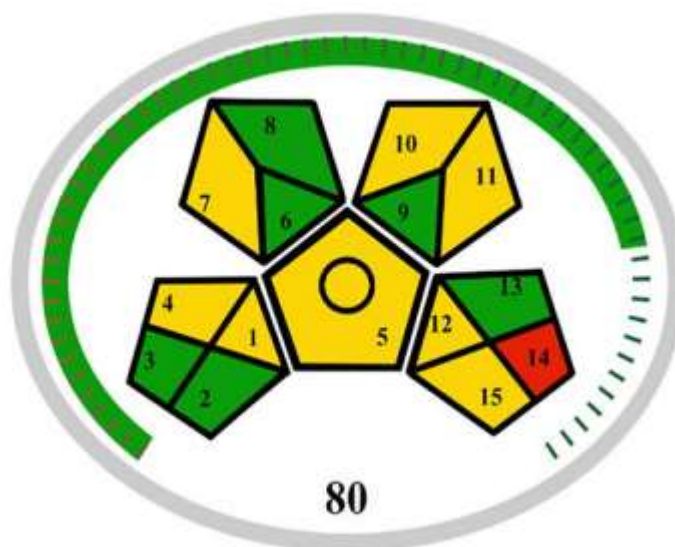


Рисунок 3.4 – Піктограма «зеленості» розробленої ВЕРХ-методики визначення супровідних домішок парацетамолу (4-амінофенолу) в комбінованому порошку інструментом MoGAPI

Згідно з отриманими результатами, представленими на рисунку 3.4, а також з урахуванням оцінки за інструментом AGREE, запропонована методика характеризується належним рівнем екологічної безпеки. Це свідчить про її відповідність сучасним підходам «зеленої» аналітичної хімії. Таким чином, розроблений метод має знижений екологічний вплив, що обумовлено раціональним використанням розчинників, скороченням часу аналізу та загальною оптимізацією аналітичної процедури [94].

За результатами проведених досліджень оптимізовано ВЕРХ-методику визначення супровідної домішки парацетамолу (4-амінофенол) у комбінованому лікарському засобі у формі порошку, яка характеризується високою селективністю, відтворюваністю та придатністю для рутинного

застосування у лабораторіях контролю якості. У ході оптимізації обґрунтовано вибір хроматографічних умов, зокрема типу колонки, складу рухомої фази та режиму елюювання, що дозволило досягти ефективного розділення аналітів у складній матриці препарату. Заміна стаціонарної фази та оптимізація градієнтного режиму забезпечили покращення симетрії піків і значне скорочення часу аналізу більш ніж у два рази порівняно з відомими підходами, що є важливим для умов промислового контролю.

Результати валідації підтвердили відповідність методики сучасним регуляторним вимогам: продемонстровано її специфічність, лінійність у заданому діапазоні, належні показники правильності та прецизійності, а також встановлено межу кількісного визначення, що дозволяє надійно контролювати вміст 4-амінофенол на низьких рівнях.

Отримані результати свідчать про те, що розроблена методика є ефективною, експресною та економічно доцільною, оскільки дозволяє зменшити тривалість аналізу та витрати розчинників. Це узгоджується із сучасними підходами до впровадження принципів «зеленої» аналітичної хімії, спрямованих на мінімізацію екологічного навантаження та раціональне використання ресурсів. Враховуючи отримані характеристики, методика може бути рекомендована для впровадження у практику фармацевтичних підприємств для контролю якості комбінованих лікарських засобів.

3.2 Оптимізація та валідація методики кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату в комбінованому порошку методом рідинної хроматографії

Розробка аналітичної методики кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів у багатокомпонентних лікарських засобах потребує врахування фізико-хімічних властивостей компонентів, їх концентрацій та можливих міжкомпонентних взаємодій. Для комбінованого

порошку, що містить парацетамол, фенілефрину гідрохлорид та феніраміну малеат, важливим є врахування відмінностей у фізико-хімічних властивостях зазначених АФІ [39].

З огляду на це, на першому етапі дослідження було поставлено завдання розробити та оптимізувати ВЕРХ-методику, придатну для одночасного кількісного визначення всіх трьох активних компонентів у комбінованому порошку, а також для подальшого використання у випробуваннях «Кількісне визначення» та «Однорідність дозованих одиниць» [103]. Додатково при розробці методики враховували можливість її уніфікації з методикою визначення супровідних домішок за типом хроматографічної колонки та складом рухомої фази. Це дозволяє спростити підготовку хроматографічної системи та зменшити кількість використовуваних рухомих фаз.

Під час розробки методики увагу приділяли вибору хроматографічної системи, зокрема стаціонарної фази та складу рухомої фази. З урахуванням попередніх досліджень та необхідності аналізу полярних сполук було обрано колонку типу Zorbax SB-Aq, придатну для роботи з рухомими фазами з високим вмістом води [100]. Використання іон-парного реагенту у складі рухомої фази сприяло покращенню утримування та форми піків фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату.

Було проведено оптимізацію градієнтного режиму елюювання, що дозволило досягти розділення компонентів за скороченого часу аналізу. Підібрані умови забезпечили розділення піків парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату без взаємного перекривання та впливу компонентів плацебо. Використання тієї самої хроматографічної колонки та рухомої фази, що й у методиці визначення супровідних домішок, дозволило уніфікувати підготовку хроматографічної системи.

Скорочення тривалості аналізу та використання однакових хроматографічної колонки і компонентів рухомої фази для декількох випробувань спрощує проведення аналізу та зменшує витрати розчинників.

Наступним етапом дослідження була валідація розробленої методики з оцінкою специфічності, лінійності, правильності, прецизійності та робастності відповідно до вимог ICH Q2(R2) [5].

Хроматографічне розділення здійснювали в умовах градієнтного елюювання з використанням рухомої фази, що складалася з компонента А – 1,1 г/л розчину натрію октансульфонату (рН 3,2), та компоненту В – метанолу. Аналіз проводили на колонці Zorbax SB-Aq (50 × 4,6 мм, 5 мкм) (рис. 3.5) за швидкості потоку 1,0 мл/хв. Обрані умови хроматографування забезпечували розділення компонентів суміші з урахуванням відмінностей їх фізико-хімічних властивостей.

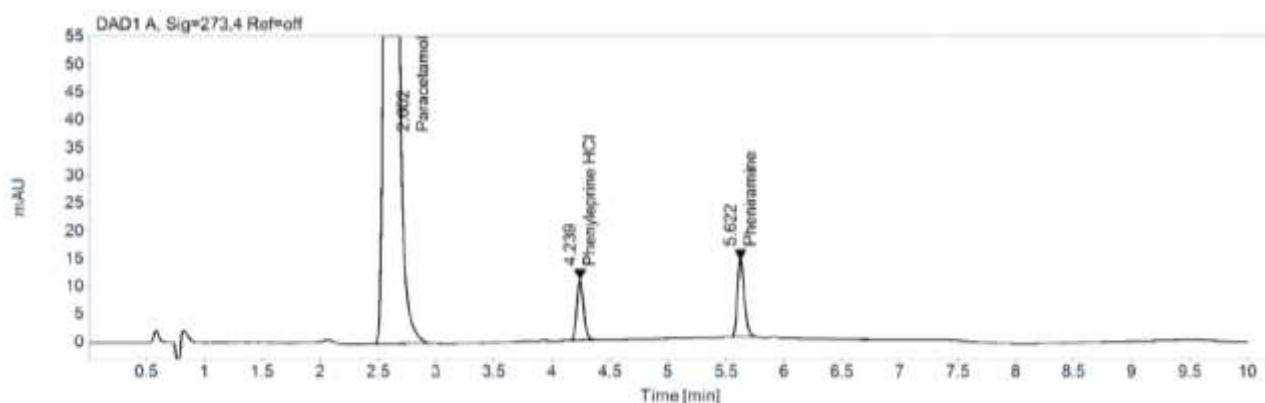


Рисунок 3.5 – Типова хроматограма розчину порівняння колонка Zorbax SB-Aq (50 мм × 4.6 мм, 5 мкм)

Використання іон-парного реагенту сприяло покращенню утримування фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату, а також забезпечувало належну симетрію піків. Значення рН 3,2 було обрано за результатами оптимізації умов хроматографічного розділення.

Особливістю розробленої методики є її уніфікація з умовами визначення супровідних домішок, що дозволяє використовувати одну і ту ж хроматографічну систему для декількох показників якості. Такий підхід

значно спрощує виконання аналізу, скорочує час підготовки обладнання та зменшує витрати розчинників.

Оптимізація градієнтного режиму елюювання дозволила досягти чіткого розділення піків парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату протягом короткого часу. Часи утримування компонентів становили близько 2,6 хв, 4,3 хв та 5,6 хв відповідно, при цьому загальний час аналізу не перевищував 10 хв.

Об'єм інжекції становив 10 мкл, довжина хвилі детектування – 273 нм, швидкість потоку рухомої фази – 1,0 мл/хв. За обраних умов забезпечувалося належне хроматографічне розділення досліджуваних компонентів.

Хроматографують розчин порівняння (с) і випробовуваний розчин.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо:

- коефіцієнт симетрії піку парацетамолу, фенілефрину, феніраміну, розрахований з хроматограм розчину порівняння (с), має бути не більше 1,5;
- відносне стандартне відхилення, розраховане для площ піку парацетамолу, фенілефрину, феніраміну з хроматограм розчину порівняння (с), має бути не більше 1,0 %.
- відношення факторів відгуку 1-ї та 2-ї паралелі розчину порівняння має бути у межах 98,0 % - 102,0 %;

Відношення факторів відгуку розчинів порівняння розраховують за формулою:

$$RRF = \frac{S_{01} \cdot m_{02}}{m_{01} \cdot S_{02}} \cdot 100\% \quad (3.9)$$

де: S_{01} – середнє значення площ піків парацетамолу, фенілефрину або феніраміну обчислене із хроматограм 1-ї паралелі розчину порівняння (с);

S_{02} – середнє значення площ піків парацетамолу, фенілефрину або феніраміну обчислене із хроматограм 2-ї паралелі розчину порівняння (с);

m_{01} – маса наважки СЗ парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду або феніраміну малеату взятого для приготування 1-ї паралелі розчину

порівняння (с), розчину порівняння (а) або розчину порівняння (b) відповідно, у міліграмах;

m_{02} – маса наважки СЗ парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду або феніраміну малеату взятого для приготування 2-ї паралелі розчину порівняння (с), розчину порівняння (а) або розчину порівняння (b) відповідно, у міліграмах.

Вміст парацетамолу (X_{2i}) в одному саше, в перерахунку на середню масу саше, у міліграмах, розраховують за формулою:

$$X_{2i} = \frac{S_i \cdot m_{0i} \cdot DF_0 \cdot P_0 \cdot b}{S_{0i} \cdot m_i \cdot DF_1} \quad (3.10)$$

де: S_i – середнє значення площ піків парацетамолу, обчислене із хроматограм випробовуваного розчину;

S_{0i} – середнє значення площ піків парацетамолу, обчислене із хроматограм розчину порівняння (с);

m_{0i} – маса наважки СЗ парацетамолу, взятого для приготування розчину порівняння (с), у міліграмах;

m_i – маса наважки вмісту саше, взятої для приготування випробовуваного розчину, у грамах;

DF_0 – коефіцієнт розведення парацетамолу в розчині порівняння;

DF_1 – коефіцієнт розведення випробовуваного розчину;

b – середня маса вмісту саше, у грамах;

P_0 – вміст основної речовини в СЗ парацетамолу, у відсотках.

Вміст фенілефрину гідрохлориду (X_{3i}) в одному саше, в перерахунку на середню масу саше, у міліграмах, розраховують за формулою:

$$X_{3i} = \frac{S_i \cdot m_{0i} \cdot DF_0 \cdot P_0 \cdot b}{S_{0i} \cdot m_i \cdot DF_1} \quad (3.11)$$

де: S_i – середнє значення площ піків фенілефрину гідрохлориду, обчислене із хроматограм випробовуваного розчину;

S_{0i} – середнє значення площ піків фенілефрину гідрохлориду, обчислене із хроматограм розчину порівняння (с);

m_{0i} – маса наважки СЗ фенілефрину гідрохлориду, взятої для приготування розчину порівняння (а), у міліграмах;

m_i – маса наважки вмісту саше, взятої для приготування випробовуваного розчину, у грамах;

DF_0 – коефіцієнт розведення фенілефрину гідрохлориду в розчині порівняння;

DF_1 – коефіцієнт розведення випробовуваного розчину;

b – середня маса вмісту саше, у грамах;

P_0 – вміст основної речовини в СЗ фенілефрину гідрохлориду, у відсотках.

Вміст феніраміну малеату (X_{4i}) в одному саше, в перерахунку на середню масу саше, у міліграмах, розраховують за формулою:

$$X_{4i} = \frac{S_i \cdot m_{0i} \cdot DF_0 \cdot P_0 \cdot b}{S_{0i} \cdot m_i \cdot DF_1} \quad (3.12)$$

де: S_i – середнє значення площ піків феніраміну малеату, обчислене із хроматограм випробовуваного розчину;

S_{0i} – середнє значення площ піків феніраміну малеату, обчислене із хроматограм розчину порівняння (с);

m_{0i} – маса наважки СЗ феніраміну малеату, взятої для приготування розчину порівняння (b), у міліграмах;

m_i – маса наважки вмісту саше, взятої для приготування випробовуваного розчину, у грамах;

DF_0 – коефіцієнт розведення феніраміну малеату в розчині порівняння;

DF_1 – коефіцієнт розведення випробовуваного розчину;

b – середня маса вмісту саше, у грамах;

P – вміст основної речовини в СЗ феніраміну малеату, у відсотках.

Валідацію розробленої методики проводили за такими характеристиками: специфічність, лінійність у межах робочого діапазону, правильність, прецизійність, межа виявлення та межа кількісного визначення [5].

На хроматограмах бланкового розчину та розчину плацебо не виявлено піків, що інтерферують з піками аналітів. Різниці між часами утримування аналітів на хроматограмах розчину порівняння та випробовуваного розчину не виявлено (табл. 3.10). Специфічність методики підтверджено.

Таблиця 3.10 – Часи утримування піків аналітів

Аналіт	RT _{Ref} , хв	RT _{test} , хв	ΔRT, %
Парацетамол	2,62	2,62	0,0
Фенілефрину гідрохлорид	4,27	4,27	0,0
Феніраміну малеат	5,64	5,64	0,0

Для підтвердження коректності приготування розчинів готували розчин порівняння та контрольний розчин і розраховували фактори відгуку для кожного розчину за формулою:

$$RF_i = \frac{\overline{S_{0i}}}{C_{0i}} \quad (3.13)$$

де: C_{0i} – концентрація аналіту у відповідному розчині, мкг/мл;

$\overline{S_{0i}}$ – середнє значення площі піку аналіту.

Також розраховували відношення факторів відгуку за формулою:

$$RRF = \frac{RF_2}{RF_1} \cdot 100\% \quad (3.14)$$

Результати хроматографування розчинів порівняння та контрольних розчинів, отримані під час проведення валідаційних досліджень, наведено в таблицях 3.11 та 3.12.

Таблиця 3.11 – Результати вимірювань розчину порівняння та контрольного розчину.

Розчин	Парацетамол		Фенілефрину гідрохлорид		Феніраміну малеат	
	РП	КР	РП	КР	РП	КР
Індивідуальні значення площ піків	2633,92	2647,24	43,70	44,40	57,25	56,75
	2630,24	2647,27	43,72	44,40	57,46	56,99
	2631,27	2647,61	43,79	44,41	57,21	57,16
Середнє	2631,81	2647,37	43,73	44,40	57,31	56,97
RSD, %	0,072	0,008	0,116	0,014	0,238	0,359
Концентрація, мкг/мл	259,480	261,083	7,952	8,072	16,144	16,053
RF	10,14	10,14	5,50	5,50	3,55	3,55
RRF	99,974		100,023		99,966	

Таблиця 3.12 – Результати вимірювань розчину порівняння та контрольного розчину

Розчин	Парацетамол		Фенілефрину гідрохлорид		Феніраміну малеат	
	РП	КР	РП	КР	РП	КР
Індивідуальні значення площ піків	2817,123	2653,511	45,776	46,624	56,115	55,586
	2827,524	2654,381	46,001	46,548	56,558	55,859
	2826,282	2656,284	45,873	46,623	56,312	55,665
Середнє	2823,643	2654,725	45,883	46,598	56,328	55,703
RSD, %	0,201	0,053	0,246	0,094	0,394	0,252
Концентрація, мкг/мл	276,546	262,549	8,184	8,451	16,096	15,974
RF	10,21	10,11	5,61	5,51	3,50	3,49
RRF	99,030		98,347		99,649	

Придатність системи встановлювали кожного аналітичного дня. Отримані результати наведено у таблиці 3.13.

Таблиця 3.13 – Оцінка придатності хроматографічної системи

Параметр		Критерій прийнятності	Результат
Коефіцієнт симетрії піку аналіту, розрахований з хроматограм розчину порівняння (с)	П	0,8 – 1,5	1,1 – 1,4
	Ф г/х		1,1 – 1,4
	Ф м		1,2 – 1,5
Відносне стандартне відхилення, розраховане для площ піку аналіт з хроматограм розчину порівняння (с)	П	$\leq 1,0 \%$	0,008 – 0,201 %
	Ф г/х		0,014 – 0,491 %
	Ф м		0,238 – 0,952 %
Відношення відгуку розчину порівняння та контрольного розчину	П	98,0 % – 102,0 %	99,0 – 100,0 %
	Ф г/х		98,3 – 100,0 %
	Ф м		99,6 – 100,0 %

Дослідження лінійності було проведено у таких діапазонах:

– Парацетамол: від 157,447 мкг/мл до 359,737 мкг/мл, що відповідає 60,56 - 138,36 % від номінального вмісту АФІ у випробовуваному розчині;

– Фенілефрину гідрохлорид: від 4,843 мкг/мл до 11,301 мкг/мл, що відповідає 60,54 - 141,26 % від номінального вмісту АФІ у випробовуваному розчині;

– Феніраміну малеат: від 9,632 мкг/мл до 22,474 мкг/мл, що відповідає 60,20 - 140,46 % від номінального вмісту АФІ у випробовуваному розчині;

Розраховували параметри лінійної регресії відповідно до рекомендацій ДФУ 2.4 п. 5.3.N1. За отриманим рівнянням регресії розраховували «знайдене» значення площ піків за формулою:

$$s_i = a + b \cdot C_i \quad (3.15)$$

де: s_i – площа піку аналіту, розрахована за рівнянням регресії;

C_i – концентрація аналіту у відповідному розчині для дослідження лінійності, мкг/мл;

a – вільний член рівняння регресії;

b – кутовий коефіцієнт рівняння регресії.

Розрахунок нормалізованого значення вільного члена рівняння регресії (у відсотках до сигналу, що відповідає номінальній концентрації аналіту у розчині) проводили за формулою:

$$|a_i|, \% = \left| \frac{a \cdot C_{01}}{\bar{S}_{01} \cdot C_{nom}} \right| \cdot 100 \% \quad (3.16)$$

де C_{nom} – номінальна концентрація відповідного аналіту у випробовуваному розчині.

Результати хроматографування наведено у таблицях 3.14–3.16. Розрахунки параметрів лінійної регресії наведено у таблиці 3.17.

Таблиця 3.14 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для парацетамолу

Розчин	L1	L2	L3	L4	L5
S_i	1606,42	2100,96	2666,96	3165,81	3666,62
	1603,80	2098,41	2665,82	3166,25	3675,05
	1606,02	2100,57	2661,10	3162,85	3671,97
$\bar{S}_i$	1605,41	2099,98	2664,63	3164,97	3671,21
RSD, %	0,088	0,065	0,117	0,058	0,116
C_i , мкг/мл	157,447	207,272	261,083	311,905	359,737
s_i	1599,91	2108,37	2657,51	3176,14	3664,26
$Res = \bar{S}_i - s_i$	5,50	-8,40	7,12	-11,17	6,95

Графік залежності відгуку обладнання від вмісту парацетамолу у модельних розчинах наведено на рисунку 3.6. Графік залишків наведено на рисунку 3.7.

Таблиця 3.15 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для фенілефрину гідрохлориду

Розчин	L1	L2	L3	L4	L5
S_i	26,73	35,43	44,69	53,08	62,35
	26,72	35,23	44,95	53,11	62,49
	26,70	35,40	44,75	53,00	62,67
$\bar{S}_i$	26,72	35,35	44,80	53,07	62,50
RSD, %	0,062	0,314	0,299	0,104	0,260
C_i , мкг/мл	4,843	6,458	8,072	9,686	11,301
s_i	26,63	35,56	44,49	53,42	62,34
$Res = \bar{S}_i - s_i$	0,09	-0,20	0,31	-0,35	0,16

Таблиця 3.16 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії для феніраміну малеату

Розчин	L1	L2	L3	L4	L5
S_i	34,21	45,38	57,65	68,42	80,14
	34,30	45,27	57,56	68,35	80,29
	34,26	45,30	57,55	68,41	80,33
$\bar{S}_i$	34,26	45,32	57,58	68,39	80,25
RSD, %	0,123	0,127	0,091	0,056	0,125
C_i , мкг/мл	9,632	12,842	16,053	19,263	22,474
s_i	34,15	45,65	57,16	68,67	80,17
$Res = \bar{S}_i - s_i$	0,11	-0,34	0,42	-0,27	0,08

Графік залежності відгуку обладнання від вмісту фенілефрину гідрохлориду у модельних розчинах наведено на рисунку 3.8. Графік залишків наведено на рисунку 3.9.

Таблиця 3.17 – Параметри лінійної регресії.

Параметр	a	a , %	b	r
Критерій	N/A	$\leq 1,0$	N/A	$\geq 0,998$
Парацетамол	-6,823	0,259	10,205	0,99994
Фенілефрину гідрохлорид	-0,155	0,353	5,531	0,99982
Феніраміну малеат	-0,374	0,659	3,584	0,99985

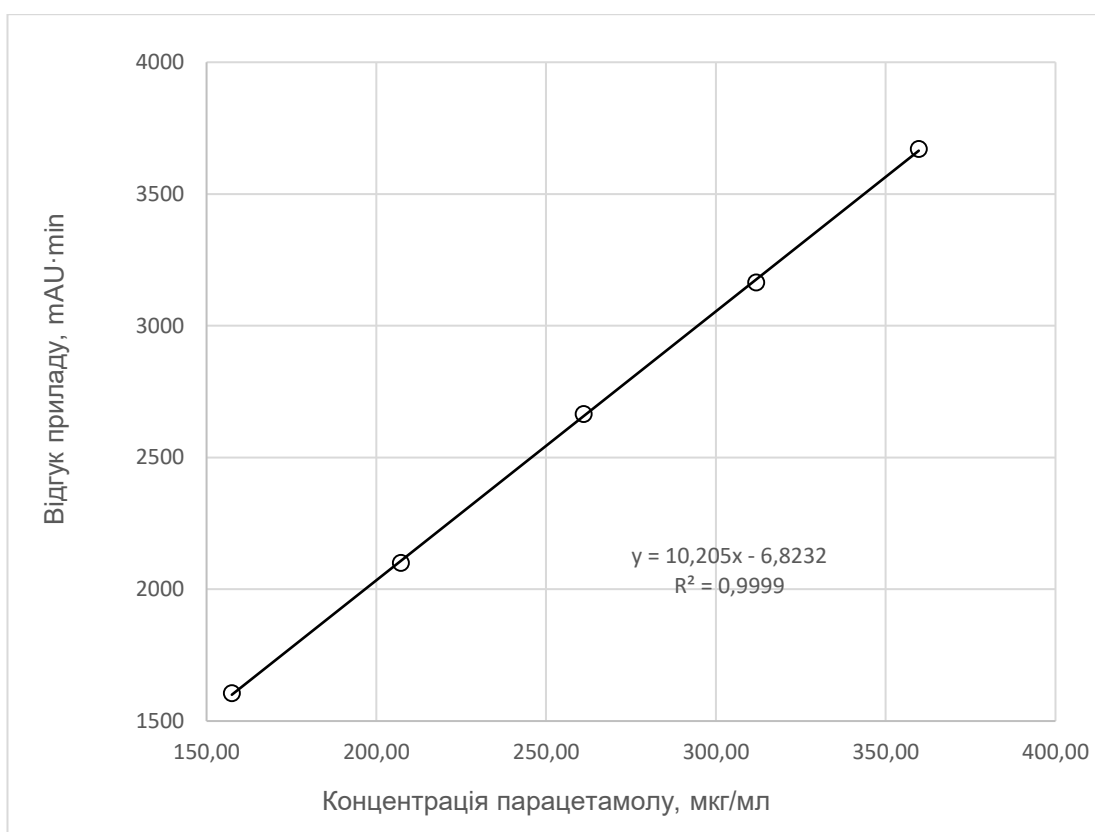


Рисунок 3.6 – Графік залежності аналітичного сигналу від концентрації парацетамолу

Графік залежності відгуку обладнання від вмісту феніраміну малеату у модельних розчинах наведено на рисунку 3.10. Графік залишків наведено на рисунку 3.11.

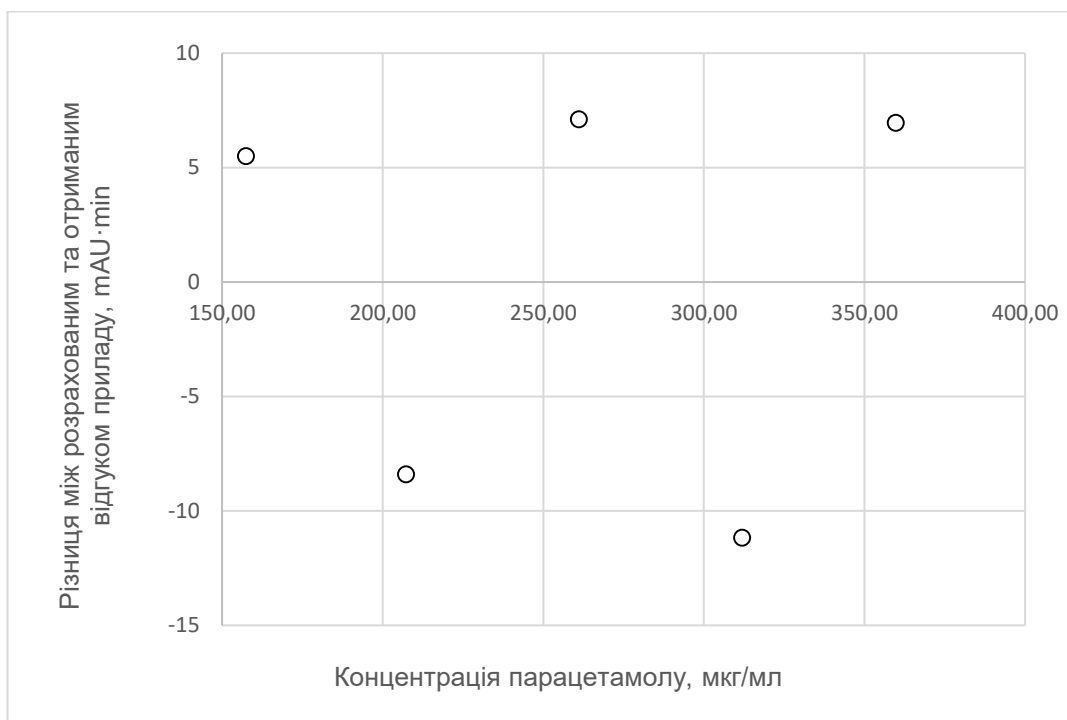


Рисунок 3.7 – Графік залишків

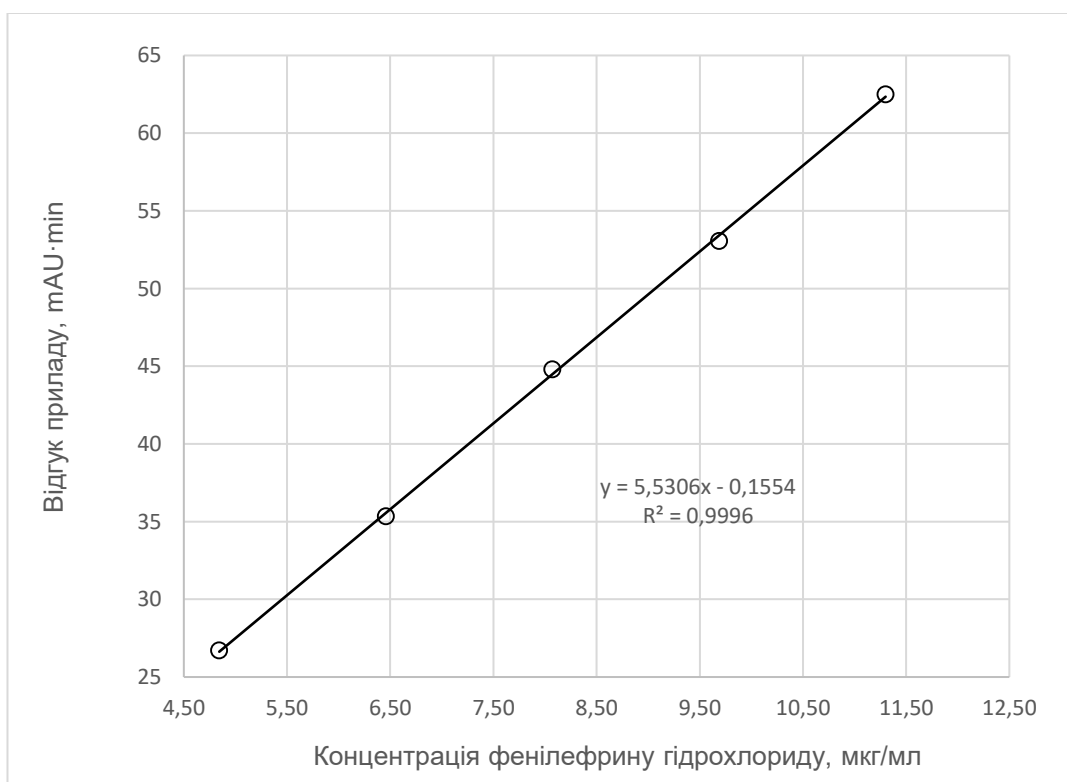


Рисунок 3.8 – Графік залежності аналітичного сигналу від концентрації фенілефрину гідрохлориду

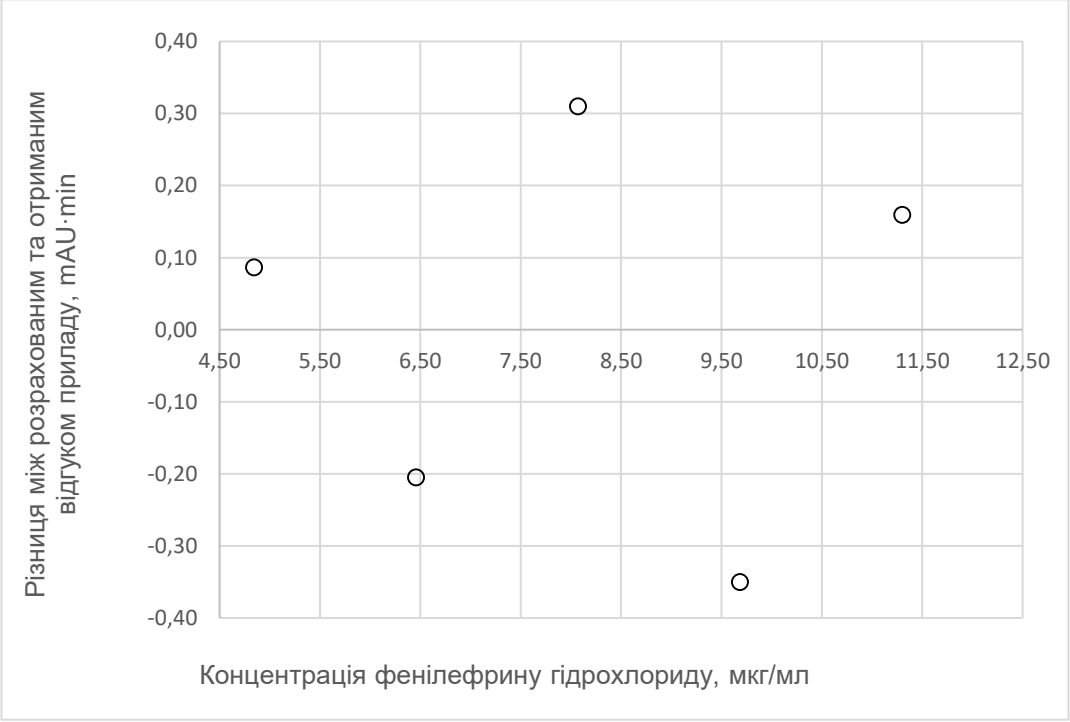


Рисунок 3.9 – Графік залишків

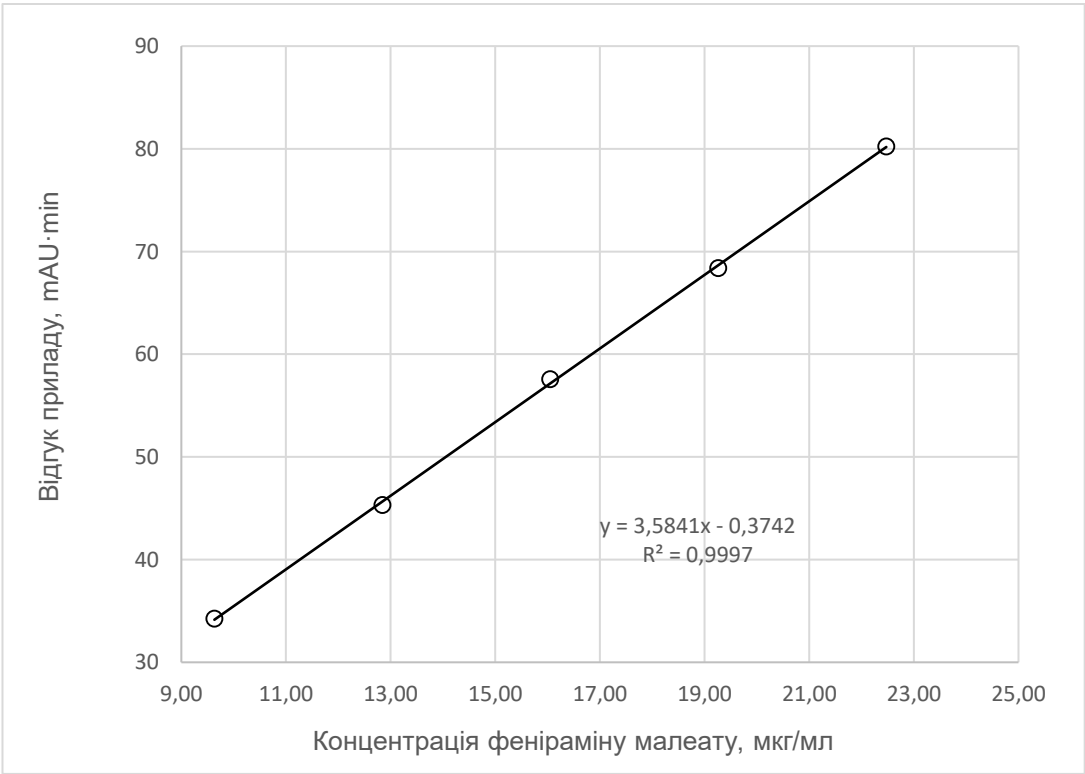


Рисунок 3.10 – Графік залежності аналітичного сигналу від концентрації феніраміну малеату

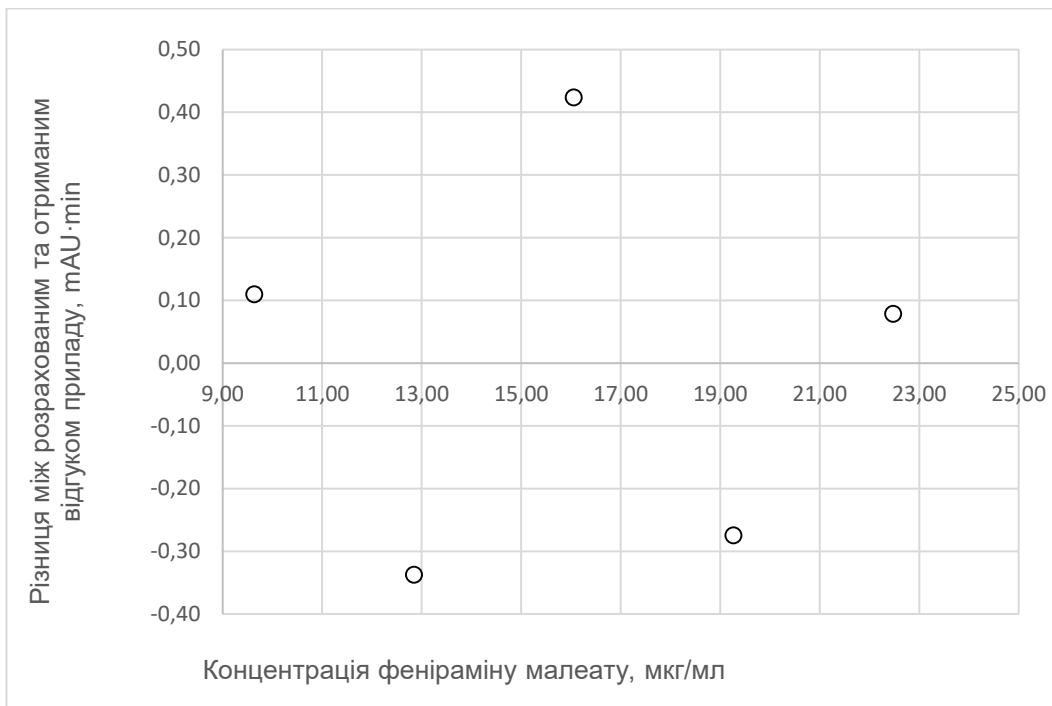


Рисунок 3.11 – Графік залишків

Розраховані параметри відповідають встановленим критеріям, а залишки випадковим чином розподілені відносно нульового значення. Лінійність методики підтверджено в досліджуваних діапазонах концентрацій.

Правильність методики досліджували з використанням 9 модельних розчинів що містили плацебо та досліджувані аналіти у наступному діапазоні концентрацій:

- Парацетамол: 168,101 мкг/мл до 349,993 мкг/мл, що відповідає 64,65 - 131,61 % від номінального вмісту у випробовуваному розчині;
- Фенілефрину гідрохлорид: 5,231 мкг/мл до 11,170 мкг/мл, що відповідає 65,39 - 139,62 % від номінального вмісту у випробовуваному розчині;
- Феніраміну малеат: 10,505 мкг/мл до 21,847 мкг/мл, що відповідає 65,66 - 136,55 % від номінального вмісту у випробовуваному розчині;

Знайдену концентрацію аналіту у модельних розчинах розраховували за формулою:

$$C_{m_i} = \frac{C_{01} \cdot \bar{S}_i}{\bar{S}_{01}} \quad (3.17)$$

де: $\bar{S}_i$ – середнє значення площ піків аналіту у відповідному модельному розчині;

$\bar{S}_{01}$ – середнє значення площ піків аналіту у розчині порівняння (с);

C_{01} – концентрація аналіту у розчині порівняння (с).

Співвідношення «Знайдено C_{m_i} »/«Введено C_{t_i} » розраховували за формулою:

$$Recovery_i = \frac{C_{m_i}}{C_{t_i}} \cdot 100\% \quad (3.18)$$

Результати хроматографування та розрахунки наведено у таблицях 3.18–3.20. Оцінку результатів наведено у таблиці 3.21.

Отримані результати задовольняють критерії прийнятності. Правильність методики достатня.

Дослідження прецизійності проводили на рівні збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності.

Для дослідження прецизійності два аналітики протягом двох аналітичних днів готували по 6 паралелей випробовуваного розчину для показника якості «Кількісне визначення».

Результати хроматографування наведено у таблицях 3.22 та 3.23, порівняння результатів – у таблиці 3.24.

Оцінку отриманих результатів відображено у таблиці 3.25.

За результатами оцінки прецизійності окремі значення RSD для 6 паралелей не відповідали встановленим критеріям прийнятності. Для забезпечення необхідної прецизійності при рутинному контролі запропоновано готувати дві паралелі випробовуваного розчину.

Таблиця 3.18 – Експериментальні дані для дослідження правильності для парацетамолу

Розчин	M1-1	M1-2	M1-3	M2-1	M2-2	M2-3	M3-1	M3-2	M3-3
S_i	1720,12	1715,25	1697,31	2621,45	2638,43	2710,38	3537,58	3530,72	3510,07
	1721,43	1732,84	1697,63	2629,35	2661,41	2715,65	3540,62	3538,56	3520,25
$\bar{S}_t$	1720,77	1724,05	1697,47	2625,40	2649,92	2713,01	3539,10	3534,64	3515,16
RSD, %	0,054	0,72	0,013	0,213	0,61	0,137	0,061	0,157	0,205
C_{t_i} , МКГ/МЛ	168,10	168,26	168,30	258,12	258,70	267,83	348,68	349,99	349,27
C_{m_i} , МКГ/МЛ	168,53	168,85	166,24	257,13	259,53	265,71	346,62	346,18	344,27
Recovery, %	100,26	100,35	98,78	99,62	100,32	99,21	99,41	98,91	98,57

Таблиця 3.19 – Експериментальні дані для дослідження правильності для фенілефрину гідрохлориду

Розчин	M1-1	M1-2	M1-3	M2-1	M2-2	M2-3	M3-1	M3-2	M3-3
S_i	29,85	31,356	28,89	45,83	44,88	44,17	62,31	59,91	60,32
	29,94	31,53	28,90	45,89	45,32	44,28	62,33	60,13	60,61
$\bar{S}_t$	29,90	31,44	28,89	45,86	45,09	44,23	62,32	60,02	60,46
RSD, %	0,213	0,396	0,017	0,102	0,704	0,185	0,015	0,253	0,33
C_{t_i} , МКГ/МЛ	5,38	5,65	5,23	8,26	8,04	7,97	11,17	10,82	10,94
C_{m_i} , МКГ/МЛ	5,33	5,61	5,15	8,18	8,04	7,89	11,12	10,71	10,78
Recovery, %	99,09	99,33	98,51	99,33	100,03	98,99	99,52	98,91	98,58

Таблиця 3.20 – Експериментальні дані для дослідження правильності для феніраміну малеат

Розчин	M1-1	M1-2	M1-3	M2-1	M2-2	M2-3	M3-1	M3-2	M3-3
S_i	36,908	38,429	36,716	56,922	57,201	55,425	75,869	75,923	76,387
	36,83	38,80	36,45	57,21	57,881	55,47	75,66	76,196	76,66
$\bar{S}_i$	36,87	38,61	36,58	57,07	57,541	55,45	75,77	76,060	76,52
RSD, %	0,152	0,676	0,520	0,356	0,836	0,055	0,191	0,254	0,251
C_{t_i} , мкг/мл	10,51	11,05	10,63	16,3	16,24	15,92	21,46	21,555	21,85
C_{m_i} , мкг/мл	10,55	11,03	10,45	16,31	16,44	15,84	21,65	21,734	21,87
Recovery, %	100,29	99,86	98,33	99,48	101,23	99,52	100,90	100,83	100,09

Таблиця 3.21 – Оцінка результатів Правильності

Параметр	Критерій	Парацетамол	Фенілефрину гідрохлориду	Феніраміну малеат
Мінімальне значення ступеня вилучення	$\geq 98,0 \%$	98,6 %	98,5 %	98,3 %
Максимальне значення ступеня вилучення	$\leq 102,0 \%$	100,3 %	100,0 %	101,2 %
Середнє значення ступеня вилучення	99,0 - 101,0 %	99,5 %	99,1 %	100,1 %

Таблиця 3.22 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих аналітиком 1

Показник	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6
Парацетамол						
S_i	2664,535	2547,104	2612,480	2631,303	2704,322	2640,941
	2679,623	2550,659	2606,864	2638,873	2679,238	2651,331
$\bar{S}_i$	2672,079	2548,882	2609,672	2635,088	2691,780	2646,136
RSD, %	0,399	0,099	0,152	0,203	0,659	0,278
Фенілефрину гідрохлорид						
S_i	43,789	44,138	43,448	43,312	44,582	43,995
	43,744	41,980	43,484	43,336	44,351	44,160
$\bar{S}_i$	43,767	43,059	43,466	43,324	44,467	44,078
RSD, %	0,073	3,544	0,059	0,039	0,367	0,265
Феніраміну малеат						
S_i	57,084	54,817	55,664	56,586	56,981	55,846
	56,811	55,469	55,560	56,697	57,076	56,288
$\bar{S}_i$	56,948	55,143	55,612	56,642	57,029	56,067
RSD, %	0,339	0,836	0,132	0,139	0,118	0,557

Таблиця 3.23 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих аналітиком 2

Показник	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6
1	2	3	4	5	6	7
Парацетамол						
S_i	2425,436	2325,098	2466,957	2404,189	2431,172	2432,794
	2423,497	2333,517	2455,691	2411,511	2427,467	2432,615
$\bar{S}_i$	2424,467	2329,308	2461,324	2407,850	2429,320	2432,705
RSD, %	0,057	0,256	0,324	0,215	0,108	0,005

Продовження таблиці 3.23

1	2	3	4	5	6	7
Фенілефрину гідрохлорид						
S_i	40,984	41,370	42,667	40,784	41,254	41,824
	40,772	41,405	42,180	40,329	41,159	41,466
$\bar{S}_t$	40,878	41,388	42,424	40,557	41,207	41,645
RSD, %	0,367	0,060	0,812	0,793	0,163	0,608
Феніраміну maleат						
S_i	53,250	52,084	51,553	51,881	52,741	52,677
	52,366	51,867	52,471	51,723	52,014	53,424
$\bar{S}_t$	52,808	51,976	52,012	51,802	52,378	53,051
RSD, %	1,184	0,295	1,248	0,216	0,981	0,996

Таблиця 3.24 – Порівняння результатів для валідаційної характеристики «Прецизійність»

Аналіт	Парацетамол		Фенілефрину гідрохлорид		Феніраміну maleат	
Аналітик	1	2	1	2	1	2
Індивідуальні значення вмісту аналіту, мг/саше	330,667	331,216	9,849	9,875	20,720	21,240
	323,630	317,951	9,942	9,990	20,585	20,888
	325,865	329,863	9,870	10,054	20,417	20,522
	328,581	329,561	9,824	9,816	20,766	20,874
	329,635	325,699	9,902	9,769	20,533	20,674
	328,001	328,269	9,936	9,937	20,433	21,076
Середнє для 6 паралелей, мг/саше	327,730	327,093	9,887	9,907	20,576	20,879
RSD для 6 паралелей, %	0,788	1,483	0,481	1,084	0,702	1,246
Середнє для 12 паралелей, мг/саше	327,411		9,897		20,727	
RSD для 12 паралелей, %	1,136		0,807		1,233	
Різниця між результатами (Δ), %	0,196		0,198		1,517	

Таблиця 3.25 – Оцінка результатів для валідаційної характеристики «Прецизійність»

Параметр	Критерій	Парацетамол	Фенілефрину г/х	Феніраміну малеат
RSD для 6-ти паралелей	$\leq 1,0 \%$	$\leq 1,5 \%$	$\leq 1,1 \%$	$\leq 1,2 \%$
RSD для 12-ти паралелей	$\leq 1,5 \%$	1,1 %	0,8 %	1,2 %
Різниця між середніми результатами, отриманими протягом 2-х днів	$\leq 2,0 \%$	0,2 %	0,2 %	1,5 %

Максимально припустиме RSD між результатами, отриманими двома аналітиками розраховували за формулою:

$$RSD_{12} = \sqrt{1,6^2 - u_{rec}^2} \cdot \sqrt{2} \quad (3.19)$$

де: $1,6^2$ – максимально припустима невизначеність контролю;

$\sqrt{2}$ – кількість паралелей випробовуваного розчину, що запропоновано готувати при рутинному контролі;

u_{rec}^2 – невизначеність зсуву;

$$u_{rec} = \frac{RSD_{rec}}{\sqrt{9}} \quad (3.20)$$

де: RSD_{rec} – відносне стандартне відхилення ступенів вилучення;

$\sqrt{9}$ – кількість розчинів, приготованих при оцінці правильності методики.

Максимально припустиме RSD між результатами, отриманими кожним з аналітиків розраховували за формулою:

$$RSD_6 = \frac{RSD_{12}}{\sqrt{2}} \quad (3.21)$$

де $\sqrt{2}$ – кількість вибірок.

Результати розрахунку критеріїв прийнятності наведено у таблиці 3.26.

Таблиця 3.26 – Розрахунок критеріїв прийнятності для показника «Кількісне визначення»

Аналіт	$RSD_{rec}, \%$	$u_{rec}, \%$	$RSD_{12}, \%$	$RSD_6, \%$
Парацетамол	0,688	0,229	2,2	1,6
Фенілефрину гідрохлорид	0,474	0,158	2,3	1,6
Феніраміну малеат	0,882	0,294	2,2	1,6

За умови приготування під час рутинного контролю двох паралелей розчину порівняння та випробовуваного розчину прецизійність методики відповідає розрахованим критеріям прийнятності.

Додатково рекомендовано ввести наступні критерії прийнятності для придатності хроматографічної системи:

- відношення факторів відгуку першої та другої паралелей розчину порівняння має бути у межах 98,0 %-102,0 %;
- відносна різниця між паралельними вимірюваннями має становити не більше 2,2 %.

Узагальнені результати валідації ВЕРХ-методики кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату у комбінованому порошку наведено в таблиці 3.27.

З метою оцінки екологічної безпеки розробленої методики проведено аналіз її «зеленості» із застосуванням інструменту GAPI [90]. Об'єктом оцінювання була ВЕРХ-методика визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату у комбінованому лікарському засобі. Для порівняння використано дані щодо існуючих методик, описаних у науковій літературі.

Результати оцінювання у вигляді відповідних піктограм «зеленості» наведено в таблиці 3.28.

Таблиця 3.27 – Результати валідації ВЕРХ-методики кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату в комбінованому порошку

Валідаційна характеристика	Параметр		Критерій прийнятності	Результат	Відповідність
Специфічність	Площа піку на хроматограмі бланку / плацебо, що може інтерферувати з піками парацетамолу, фенілефрину або феніраміну		$\leq 0,16 \%$	Не виявлено	Відповідає
	Різниця часу виходу піків з хроматограми випробовуваного розчину в порівнянні з хроматограмою розчину порівняння		$\leq 2,0 \%$	Не виявлено	Відповідає
Придатність системи	Коефіцієнт симетрії піку парацетамолу, фенілефрину, феніраміну, розрахований з хроматограм розчину порівняння (с)	П	0,8 – 1,5	1,1 – 1,4	Відповідає
		Ф г/х		1,1 – 1,4	Відповідає
		Ф м		1,2 – 1,5	Відповідає
	Відносне стандартне відхилення, розраховане для площ піку парацетамолу, фенілефрину, феніраміну з хроматограм розчину порівняння (с)	П	$\leq 1,0 \%$	$\leq 0,2 \%$	Відповідає
		Ф г/х		$\leq 0,5 \%$	Відповідає
		Ф м		$\leq 1,0 \%$	Відповідає
	Відношення відгуку розчину порівняння та контрольного розчину	П	98,0 – 102,0 %	99,0 – 100,0 %	Відповідає
		Ф г/х		98,3 – 100,0 %	Відповідає
		Ф м		99,6 – 100,0 %	Відповідає
Лінійність	Коефіцієнт кореляції рівняння регресії	П	$\geq 0,998$	0,99994	Відповідає
		Ф г/х		0,99982	Відповідає
		Ф м		0,99985	Відповідає
	Абсолютне значення вільного члена рівняння регресії у відсотках від номінальної концентрації	П	$\leq 1,0 \%$	0,3 %	Відповідає
		Ф г/х		0,4 %	Відповідає
		Ф м		0,7 %	Відповідає
Діапазон застосування	Діапазон, у якому досліджено лінійність, прецизійність та правильність		182,0 – 343,2 мкг/мл	168,1 – 350,0 мкг/мл	Відповідає

Продовження таблиці 3.27

		Ф г/х	5,6 – 10,6 мкг/мл	5,2 – 11,2 мкг/мл	Відповідає
		Ф м	11,2 – 21,1 мкг/мл	10,5 – 21,8 мкг/мл	Відповідає
Правильність	Індивідуальні значення ступенів вилучення	П	98,0 – 102,0 %	98,6 – 100,3 %	Відповідає
		Ф г/х		98,5 – 100,0 %	Відповідає
		Ф м		98,3 – 101,2 %	Відповідає
	Середнє значення ступеня вилучення	П	99,0 – 101,0 %	99,5 %	Відповідає
		Ф г/х		99,1 %	Відповідає
		Ф м		100,1 %	Відповідає
Прецизійність (Кількісне визначення)	RSD для 6 паралелей	П	≤ 1,6 %	≤ 1,5 %	Відповідає
		Ф г/х		≤ 1,1 %	Відповідає
		Ф м		≤ 1,2	Відповідає
	RSD для 12 паралелей	П	≤ 2,2 %	1,1 %	Відповідає
		Ф г/х		0,8 %	Відповідає
		Ф м		1,2 %	Відповідає
	Різниця між середніми результатами, отриманими протягом 2 днів	П	≤ 2,0 %	0,2 %	Відповідає
		Ф г/х		0,2 %	Відповідає
		Ф м		1,5 %	Відповідає
Прецизійність (Однорідність дозованих одиниць)	RSD для 10 паралелей	П	≤ 4,8 %	≤ 2,4 %	Відповідає
		Ф г/х		≤ 4,2 %	Відповідає
		Ф м		≤ 3,3 %	Відповідає
	RSD для 20 паралелей	П	≤ 5,1 %	1,9 %	Відповідає
		Ф г/х		4,1 %	Відповідає
		Ф м		2,5 %	Відповідає
	Різниця між середніми результатами, отриманими протягом 2 днів	П	≤ 5,3 %	1,7 %	Відповідає
		Ф г/х		3,5 %	Відповідає
		Ф м		0,05 %	Відповідає

Таблиця 3.28 – Огляд існуючих ВЕРХ-методик одночасного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів

ВЕРХ-метод одночасного визначення	Колонка	Рухома фаза	Швидкість елюювання, мл/хв	Час аналізу, хв	Обмеження існуючих методик та переваги запропонованого підходу	MoGAPI
1	2	3	4	5	6	7
Хлорфеніраміну малеат, парацетамол, фенілефрину гідрохлорид [39]	CN (250 × 4,6 мм, 5 мкм)	Фосфатний буфер (pH 6,2) : ацетонітрил (70:30, об/об)	1,0	15	Триваліший час аналізу та використання колонки довжиною 250 мм	78
Парацетамол, декстрометорфену гідробромід, фенілефрину гідрохлорид [41]	Luna C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм)	Ацетонітрил : буфер (20:80, об/об)	1,0	8	Використання колонки довжиною 250 мм; методика не передбачає одночасного визначення феніраміну малеату	80
Парацетамол, фенілефрину гідрохлорид, трипролідину гідрохлорид [42]	Prontosil C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм)	Ацетонітрил : 0,1 М буфер калію дигідрофосфату (52:48)	1,0	10	Використання колонки довжиною 250 мм; методика не передбачає одночасного визначення феніраміну малеату	80
Парацетамол, фенілефрин, декстрометорфан, хлорфенірамін [43]	C18 (250 мм)	Метанол : вода (з додаванням 6,0 г ацетату амонію та 10 мл триетиламіну на 1 л, pH 5,0), 95:5 (об/об)	1,0	15	Триваліший час аналізу та використання колонки довжиною 250 мм	80

Продовження таблиці 3.28

1	2	3	4	5	6	7
Парацетамол [47]	C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм)	Ацетонітрил : 0,1 М оцтова кислота (50:50, об/об)	1,2	10	Методика призначена для визначення парацетамолу та не передбачає одночасного визначення інших компонентів досліджуваної комбінації	78
Парацетамол, фенілефрину гідрохлорид, феніраміну малеат [63]	C18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм)	Метанол : 1,18 г/л натрію октансульфону (рН 3,2)	1,0	22	Тривалий час аналізу – 22 хв	80
Парацетамол, фенілефрину гідрохлорид, феніраміну малеат (запропонована методика) [94]	Zorbax SB-Aq C18 (50 × 4,6 мм, 5 мкм)	Метанол : 1,1 г/л натрію октансульфону (рН 3,2)	1,0	10	Скорочений час аналізу (10 хв), використання короткої колонки (50 мм) та одночасне визначення трьох АФІ	82

Аналіз отриманих даних свідчить, що запропонована ВЕРХ-методика характеризується більш сприятливими показниками екологічності порівняно з відомими аналогами. Це обумовлено, зокрема, скороченням часу аналізу, зменшенням витрат органічних розчинників та оптимізацією умов хроматографування.

Отримані результати GAPI-оцінювання підтверджують зменшення екологічного впливу розробленої методики порівняно з методиками, використаними для порівняння.

Екологічність розробленої ВЕРХ-методики визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату в комбінованому лікарському засобі оцінювали із застосуванням інструменту MoGAPI [92]. Результати візуалізовано у вигляді піктограми «зеленості», яку наведено на рисунку 3.12.

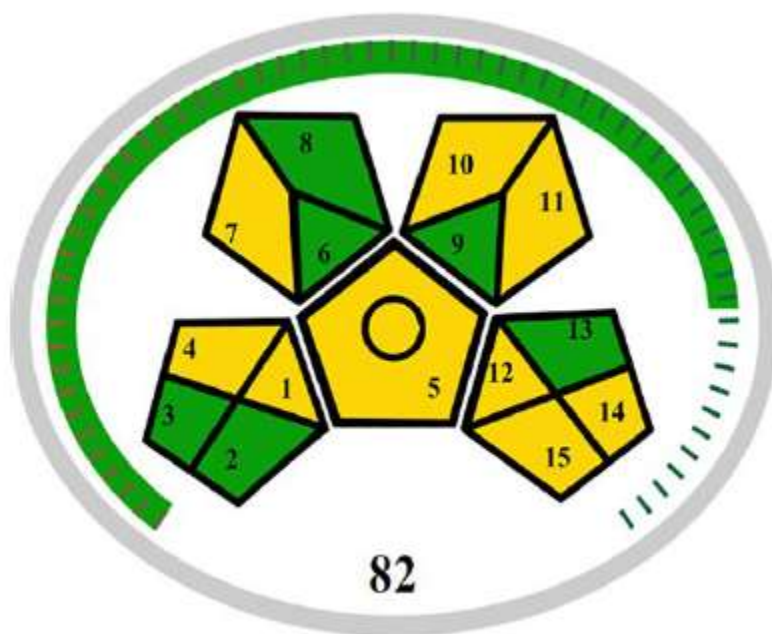


Рисунок 3.12 – Піктограма «зеленості» розробленої ВЕРХ-методики кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду, феніраміну малеату в комбінованому порошку інструментом MoGAPI

У результаті проведених досліджень оптимізовано ВЕРХ-методику кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів у комбінованому порошку, яка забезпечує їх одночасне визначення з високою селективністю та відтворюваністю. Підібрані хроматографічні умови, зокрема використання колонки типу Zorbax SB-Aq та оптимізованого градієнтного режиму елюювання, дозволили досягти ефективного розділення компонентів без взаємного перекривання піків та суттєво скоротити час аналізу порівняно з існуючими підходами.

Результати валідації підтвердили, що методика відповідає сучасним регуляторним вимогам за показниками специфічності, лінійності, правильності та прецизійності. Отримані дані свідчать про її придатність для застосування у рутинному контролі якості, а також про доцільність впровадження у практику фармацевтичних підприємств з урахуванням як аналітичної ефективності, так і екологічної складової.

3.3 Оптимізація та валідація методики «Однорідність дозованих одиниць» парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату в комбінованому порошку методом рідинної хроматографії

Наступним етапом дослідження стала валідація методики для проведення випробування «Однорідність дозованих одиниць» комбінованого порошку, що містить парацетамол, фенілефрину гідрохлорид та феніраміну малеат. З метою уніфікації аналітичного процесу та спрощення рутинного контролю якості для проведення даного випробування було використано ту саму хроматографічну систему, що і при кількісному визначенні активних фармацевтичних інгредієнтів. Зокрема, застосовували однакові умови хроматографування, склад рухомої фази, тип колонки, градієнтний режим елюювання та параметри детектування.

Основна відмінність методики полягала у підході до пробопідготовки, що обумовлено особливостями проведення випробування «Однорідність дозованих одиниць». Для кількісного визначення випробуваний розчин готували шляхом перенесення вмісту п'яти саше у мірну колбу місткістю 500 мл з подальшим відбором 2 мл отриманого розчину у мірну колбу місткістю 25 мл. Натомість для визначення однорідності дозованих одиниць використовували вміст одного саше, який переносили у мірну колбу місткістю 200 мл, після чого 4 мл отриманого розчину переносили у мірну колбу місткістю 25 мл.

Оскільки для методики кількісного визначення та випробування «Однорідність дозованих одиниць» використовували однакові хроматографічні умови, а концентрації аналітів у випробуваних розчинах були співставними з концентраціями, застосованими під час валідації методики кількісного визначення, окреме дослідження специфічності, лінійності правильності для методики «Однорідність дозованих одиниць» не проводили. Для підтвердження цих валідаційних характеристик використовували результати, отримані при валідації методики кількісного визначення. Водночас показник прецизійності оцінювали окремо з урахуванням особливостей пробопідготовки та аналізу індивідуальних дозованих одиниць.

Типову хроматограму розчину порівняння наведено на рисунку 3.5.

Хроматографують розчин порівняння (с), приготований як описано в розділі «Кількісне визначення. Парацетамол, Фенілефрину гідрохлорид, Феніраміну малеат», та випробовуваний розчин в умовах, зазначених у розділі «Кількісне визначення».

Розраховують вміст парацетамолу (X_{5i}) у кожному саше, в відсотках від номінального вмісту, за формулою:

$$X_{5i} = \frac{S_i \cdot m_{0i} \cdot DF_0 \cdot P_0}{S_{0i} \cdot DF_1 \cdot 325} \quad (3.22)$$

де: S_i – середнє значення площ піків парацетамолу, обчислене з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків парацетамолу, обчислене з хроматограм розчину порівняння (с);

m_0 – маса наважки СЗ парацетамолу, взятого для приготування розчину порівняння (с), в міліграмах;

DF_0 – коефіцієнт розведення парацетамолу в розчині порівняння;

DF_1 – коефіцієнт розведення випробовуваного розчину;

P_0 – вміст основної речовини в СЗ парацетамолу, взятому для приготування розчину порівняння (с), у відсотках;

325 – номінальний вміст парацетамолу в одному саше, в міліграмах.

Вимоги тесту вважаються виконаними, якщо приймальне число менше або дорівнює 15,0. Якщо приймальне число більше 15,0, виконують випробування, зазначені у ДФУ, Eur.Ph., 2.9.40.

Розраховують вміст фенілефрину гідрохлориду (X_{6i}) в кожному саше, в відсотках від номінального вмісту, за формулою:

$$X_{6i} = \frac{S_i \cdot m_{0i} \cdot DF_0 \cdot P_0}{S_{0i} \cdot DF_1 \cdot 10} \quad (3.23)$$

де: S_i – середнє значення площ піків фенілефрину, обчислене з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків фенілефрину обчислене з хроматограм розчину порівняння (с);

m_0 – маса наважки СЗ фенілефрину гідрохлориду, взятого для приготування розчину порівняння (а), в міліграмах;

DF_0 – коефіцієнт розведення фенілефрину гідрохлориду в розчині порівняння;

DF_1 – коефіцієнт розведення випробовуваного розчину;

P_0 – вміст основної речовини в СЗ фенілефрину гідрохлориду, взятому для приготування розчину порівняння (а), у відсотках;

10 – номінальний вміст фенілефрину гідрохлориду в одному саше, в міліграмах.

Вимоги тесту вважаються виконаними, якщо приймальне число менше або дорівнює 15,0. Якщо приймальне число більше 15,0, виконують випробування, зазначені у ДФУ, Eur.Ph., 2.9.40.

Розраховують вміст феніраміну малеату (X_{7i}) в кожному саше, в відсотках від номінального вмісту, за формулою:

$$X_{7i} = \frac{S_i \cdot m_{0i} \cdot DF_0 \cdot P_0}{S_{0i} \cdot DF_1 \cdot 20} \quad (3.24)$$

де: S_i – середнє значення площ піків феніраміну, обчислене з хроматограм випробовуваного розчину;

S_0 – середнє значення площ піків феніраміну обчислене з хроматограм розчину порівняння (с);

m_0 – маса наважки СЗ феніраміну малеату, взятого для приготування розчину порівняння (b), в міліграмах;

DF_0 – коефіцієнт розведення феніраміну малеату в розчині порівняння;

DF_1 – коефіцієнт розведення випробовуваного розчину;

P_0 – вміст основної речовини в СЗ феніраміну малеату, взятому для приготування розчину порівняння (b), у відсотках;

20 – номінальний вміст феніраміну малеату в одному саше, в міліграмах.

Вимоги тесту вважаються виконаними, якщо приймальне число менше або дорівнює 15,0. Якщо приймальне число більше 15,0, виконують випробування, зазначені у ДФУ, Eur.Ph., 2.9.40.

Дослідження прецизійності проводили на рівні збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності.

Для дослідження прецизійності два аналітики протягом двох аналітичних днів готували по 10 паралелей випробовуваного розчину.

Результати хроматографування наведено у таблицях 3.29 та 3.30. Оцінку отриманих результатів наведено в таблиці 3.31.

Таблиця 3.29 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих аналітиком 1

Показник	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6	BP7	BP8	BP9	BP10
Парацетамол										
S_i	2649,67	2672,19	2702,14	2648,64	2687,45	2680,36	2710,37	2660,78	2669,94	2715,93
	2650,47	2671,91	2699,11	2669,85	2688,87	2661,96	2694,45	2668,87	2677,69	2709,93
$\bar{S}_t$	2650,07	2672,05	2700,62	2659,24	2688,16	2671,16	2702,41	2664,83	2673,81	2712,93
RSD, %	0,021	0,007	0,079	0,564	0,037	0,487	0,416	0,215	0,205	0,157
Фенілефрину гідрохлорид										
S_i	48,142	44,345	44,298	44,370	42,693	46,216	44,619	44,643	42,495	44,642
	46,019	44,659	44,264	44,531	42,980	46,227	44,917	44,660	42,532	44,520
$\bar{S}_t$	47,081	44,502	44,281	44,451	42,837	46,222	44,768	44,652	42,514	44,581
RSD, %	3,189	0,499	0,054	0,256	0,474	0,017	0,471	0,027	0,062	0,194
Феніраміну малеат										
S_i	56,532	57,934	58,554	56,319	57,303	56,983	58,735	56,220	57,301	58,545
	56,986	58,268	58,238	55,848	57,257	57,328	58,865	56,615	57,134	58,406
$\bar{S}_t$	56,759	58,101	58,396	56,084	57,280	57,156	58,800	56,418	57,218	58,476
RSD, %	0,566	0,406	0,383	0,594	0,057	0,427	0,156	0,495	0,206	0,168

Таблиця 3.30 – Результати хроматографування випробовуваних розчинів приготованих аналітиком 2

Показник	BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6	BP7	BP8	BP9	BP10
Парацетамол										
S_i	2478,54	2355,69	2391,48	2466,23	2369,52	2480,79	2386,43	2496,38	2458,87	2484,70
	2473,85	2359,71	2393,58	2473,92	2363,79	2478,29	2382,53	2495,84	2454,18	2488,91
$\bar{S}_i$	2476,19	2357,70	2392,53	2470,07	2366,66	2479,54	2384,48	2496,11	2456,53	2486,81
RSD, %	0,134	0,121	0,062	0,220	0,171	0,071	0,116	0,015	0,135	0,120
Фенілефрину гідрохлорид										
S_i	42,364	39,571	39,830	43,055	39,816	42,984	40,394	42,092	42,730	41,633
	42,670	39,280	39,993	42,660	39,559	43,002	39,733	41,794	42,590	41,910
$\bar{S}_i$	42,517	39,426	39,912	42,858	39,688	42,993	40,064	41,943	42,660	41,772
RSD, %	0,509	0,522	0,289	0,652	0,458	0,030	1,167	0,502	0,232	0,469
Феніраміну малеат										
S_i	53,824	50,243	51,274	54,767	51,133	53,435	51,442	53,566	53,453	53,632
	54,389	50,563	51,512	54,280	51,296	53,961	51,697	53,573	53,025	53,538
$\bar{S}_i$	54,107	50,403	51,393	54,524	51,215	53,698	51,570	53,570	53,239	53,585
RSD, %	0,738	0,449	0,327	0,632	0,225	0,693	0,350	0,009	0,568	0,124

Таблиця 3.31 – Порівняння результатів для валідаційної характеристики «Прецизійність»

Аналіт	Парацетамол		Фенілефрину гідрохлорид		Феніраміну малеат	
Аналітик	1	2	1	2	1	2
Індивідуальні значення вмісту аналіту, мг/саше	100,240	101,552	105,432	100,041	102,519	106,495
	101,071	96,693	99,657	92,767	104,943	99,206
	102,152	98,121	99,162	93,910	105,476	101,154
	100,587	101,301	99,542	100,842	101,299	107,316
	101,681	97,060	95,928	93,383	103,460	100,803
	101,038	101,690	103,508	101,161	103,235	105,691
	102,220	97,791	100,253	94,268	106,206	101,502
	100,798	102,369	99,992	98,690	101,902	105,438
	101,138	100,746	95,204	100,378	103,347	104,788
	102,617	101,988	99,834	98,287	105,620	105,469
Середнє для 10 паралелей, мг/саше	101,128	99,403	100,538	97,018	103,489	103,444
RSD для 10 паралелей, %	0,692	2,378	3,378	4,171	1,488	3,336
Середнє для 20 паралелей, мг/саше	100,265		98,778		103,467	
RSD для 20 паралелей, %	1,885		4,058		2,462	
Різниця між результатами (Δ), %	1,725		3,521		0,045	

Для розрахунку критеріїв прийнятності розраховували відносне стандартне відхилення між масами 10 дозованих одиниць (RSD_m). Розраховане значення RSD_m становить 2,949 %.

Критерій прийнятності RSD для 10-ти паралелей становить $\leq \sqrt{4,388^2 + 2^2}$ ($\leq 4,8$ %).

Критерій прийнятності RSD для 20-ти паралелей становить $\leq \sqrt{4,388^2 + 2,5^2}$ ($\leq 5,1$ %).

Критерій прийнятності різниці між середніми результатами отриманими протягом 2-х днів становить $\leq \sqrt{4,388^2 + 3^2}$ ($\leq 5,3$ %).

Результати оцінки прецизійності методики відповідно до розрахованих критеріїв прийнятності наведено в таблиці 3.32.

Таблиця 3.32 – Оцінка результатів для валідаційної характеристики «Прецизійність»

Показник якості	Параметр	Критерій	Парацетамол	Фенілефрину гідрохлорид	Феніраміну малеат
Однорідність дозованих одиниць	RSD для 10 паралелей	$\leq 4,8$ %	$\leq 2,4$ %	$\leq 4,2$ %	$\leq 3,3$ %
	RSD для 20 паралелей	$\leq 5,1$ %	1,9 %	4,1 %	2,5 %
	Різниця між середніми результатам, отриманими протягом 2 днів	$\leq 5,3$ %	1,7 %	3,5 %	0,05 %

Прецизійність методики за показником «Однорідність дозованих одиниць» відповідає встановленим критеріям прийнятності.

Після підтвердження придатності розроблених методик за основними валідаційними характеристиками проведено порівняльну оцінку тривалості аналітичного контролю до та після оптимізації. Як вихідні для порівняння використовували раніше розроблені та впроваджені методики контролю

якості комбінованого лікарського засобу, наведені в роботі О. В. Тригубчак [63].

Тривалість виконання кожного випробування розраховували за кількістю інжекцій, необхідних для контролю однієї серії лікарського засобу, та тривалістю одного хроматографування. Для кількісного визначення розрахунок проводили для 16 інжекцій, для випробування «Однорідність дозованих одиниць» – для 25 інжекцій, для визначення 4-амінофенолу – для 8 інжекцій. До оптимізації тривалість одного хроматографування становила відповідно 22, 22 та 38 хв, після оптимізації – 10, 10 та 20 хв. Результати розрахунку наведено в таблиці 3.33.

Таблиця 3.33 – Порівняльна оцінка тривалості аналізу до та після оптимізації аналітичних методик

Аналітична методика	Кількість інжекцій	До оптимізації, хв/інж	До оптимізації, хв	Після оптимізації, хв/інж	Після оптимізації, хв	Економія часу, хв
Кількісне визначення	16	22	352	10	160	192
Однорідність дозованих одиниць	25	22	550	10	250	300
Визначення 4-амінофенолу	8	38	304	20	160	144
Загалом	-	-	1206	-	570	636

За результатами проведеної оцінки встановлено, що оптимізація аналітичних методик дозволила скоротити сумарну тривалість хроматографічного аналізу, необхідного для виконання зазначених випробувань при контролі однієї серії лікарського засобу, з 1206 хв до 570 хв, тобто на 636 хв або 52,7 %. Найбільше абсолютне скорочення тривалості

аналізу досягнуто для випробування «Однорідність дозованих одиниць» – на 300 хв.

Висновки до розділу 3:

1. Оптимізовано умови ВЕРХ-аналізу та розроблено методики одночасного кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду і феніраміну малеату та визначення 4-амінофенолу як продукту деградації парацетамолу у комбінованому порошку для орального розчину. Застосування колонки Zorbax SB-Aq ($50 \times 4,6$ мм, 5 мкм) та натрію октансульфонату як іон-парного реагенту забезпечило необхідне хроматографічне розділення компонентів; тривалість хроматографування становить 10 хв для кількісного визначення АФІ та 20 хв для визначення 4-амінофенолу.

2. За результатами валідації підтверджено відповідність розроблених методик встановленим критеріям прийнятності та їх придатність для контролю якості досліджуваного лікарського засобу.

3. За результатами оцінки екологічності значення MoGAPI становило 82 бали для методики кількісного визначення та 80 балів для методики визначення супровідних домішок; значення AGREE – 0,79.

4. Проведено порівняльну оцінку тривалості аналітичних випробувань до та після оптимізації розроблених методик. Встановлено, що сумарний час виконання кількісного визначення, випробування «Однорідність дозованих одиниць» та визначення 4-амінофенолу скоротився з 1206 до 570 хв, тобто на 636 хв (52,7 %). Отримані результати підтверджують суттєве підвищення ефективності аналітичного контролю внаслідок оптимізації методик.

5. Розроблені та валідовані методики кількісного визначення діючих речовин та 4-амінофенолу впроваджено у практичну діяльність АТ «Фармак».

Результати досліджень, що наведені у розділі 3, опубліковано у наукових працях автора [94, 101, 103].

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ КРЕМУ ТА РОЗЧИНУ НАФТИФІНУ ГІДРОХЛОРИДУ

Розробка методик контролю якості лікарських засобів для зовнішнього застосування, зокрема кремів та розчинів, є важливим етапом забезпечення їх якості протягом терміну придатності. Особливу складність становить аналіз препаратів зі складною матрицею, таких як креми, оскільки допоміжні речовини можуть впливати на селективність методики, форму піків та відтворюваність результатів. У випадку розчинів додаткової уваги потребує контроль супровідних домішок і продуктів деградації, що можуть утворюватися під впливом зовнішніх факторів.

Нафтифіну гідрохлорид є синтетичним протигрибковим засобом групи аліламінів, який широко застосовується для лікування поверхневих грибкових інфекцій шкіри, зокрема дерматофітій, оніхомікозу та різнобарвного лишая [24, 64, 65, 104–107]. Незважаючи на значний прогрес у лікуванні мікозів, поширеність грибкових інфекцій залишається високою [105, 106], а збільшення кількості рецидивів і випадків розвитку резистентності до протигрибкових препаратів залишається актуальною проблемою [108]. Це зумовлює необхідність забезпечення належної якості лікарських засобів та застосування сучасних аналітичних методик їх контролю [59–61].

Незважаючи на наявність окремих фармакопейних та літературних методик його визначення, більшість із них характеризуються тривалим часом аналізу, значним використанням органічних розчинників або недостатньою придатністю для аналізу лікарських форм зі складною матрицею [27, 28]. Подібні підходи до розробки та оптимізації ВЕРХ-методик також описані для інших представників групи аліламінових протигрибкових засобів, зокрема тербінафіну гідрохлориду, що свідчить про актуальність удосконалення

методів контролю якості препаратів цієї фармакологічної групи [11, 67–72, 75–78].

У зв'язку з цим метою даного розділу стала розробка та оптимізація ВЕРХ-методик для контролю якості крему та розчину нафтифіну гідрохлориду за показниками «Кількісне визначення» та «Супровідні домішки». При розробці методик особливу увагу приділяли забезпеченню селективності, експресності та придатності для рутинного застосування у лабораторіях контролю якості. Додатковим завданням було скорочення часу аналізу, зменшення витрат розчинників та врахування підходів «зеленої» аналітичної хімії.

Подальші дослідження включали оптимізацію умов хроматографування, вибір складу рухомої фази, оцінку впливу матриці лікарських форм, а також проведення валідації розроблених методик відповідно до сучасних регуляторних вимог [66]. Окремим етапом роботи стало проведення стресових досліджень нафтифіну гідрохлориду для підтвердження стабільності-індикативних властивостей методики визначення супровідних домішок [79].

4.1 Розробка та валідація хроматографічної методики кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду у кремі та розчині методом рідинної хроматографії

Для забезпечення належного контролю якості лікарських засобів у формі крему та розчину, що містять нафтифіну гідрохлорид, було розроблено ВЕРХ-методику кількісного визначення активного фармацевтичного інгредієнта. Під час розробки методики зосереджувалися на досягненні селективності, відтворюваності та швидкості аналізу, а також можливості подальшого застосування методики у рутинній практиці лабораторій контролю якості [66].

З огляду на різний склад лікарських форм, особливу увагу приділяли вибору умов пробопідготовки, які б забезпечували повне вилучення

нафтифіну гідрохлориду з матриці крему та відсутність впливу допоміжних речовин на результати аналізу. Водночас хроматографічні умови були уніфіковані для обох лікарських форм, що дозволило спростити аналітичний процес та підвищити ефективність виконання аналізу.

Для кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду використовували рухому фазу, що складалася із суміші розчину амонію ацетату та метанолу у співвідношенні 30:70 (v/v). Розчин амонію ацетату готували шляхом розчинення 1,154 г амонію ацетату у 300 мл води для хроматографії з подальшим додаванням 0,2 мл льодяної оцтової кислоти. Як розчинник використовували метанол.

Випробуваний розчин для крему готували шляхом розчинення точної наважки препарату, еквівалентної 80 мкг/мл нафтифіну гідрохлориду, у метанолі. Для повного руйнування основи крему та екстракції діючої речовини суміш обробляли в ультразвуковій бані протягом приблизно 5 хв при температурі 45 °С. Після охолодження розчин доводили до мітки метанолом, перемішували та фільтрували крізь мембранний фільтр з розміром пор 0,45 мкм, відкидаючи перші 5 мл фільтрату.

Випробуваний розчин для лікарської форми у вигляді розчину готували шляхом розчинення препарату у метанолі до концентрації 80 мкг/мл. Розчин порівняння готували аналогічно з використанням стандартного зразка нафтифіну гідрохлориду.

Хроматографування проводили на рідинному хроматографі, оснащеному спектрофотометричним детектором, використовуючи колонку типу C18 розміром 50 × 4,6 мм, 3 мкм (Gemini C18 або Luna C18). Швидкість потоку рухомої фази становила 1,0 мл/хв, детектування проводили при довжині хвилі 254 нм, температура колонки – 25 °С, об'єм інжекції – 10 мкл. Елюювання проводили в ізократичному режимі.

Придатність хроматографічної системи оцінювали за такими параметрами: коефіцієнт симетрії піка нафтифіну гідрохлориду – від 0,8 до

1,8; відносне стандартне відхилення площі піка – не більше 1,0 %; кількість теоретичних тарілок – не менше 2000.

На етапі оптимізації методики досліджували вплив розчинника на хроматографічні характеристики піка нафтифіну гідрохлориду. Як розчинники випробовували метанол та рухома фаза. Результати порівняння наведено в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1 – Вплив розчинника на хроматографічні характеристики нафтифіну гідрохлориду

Розчинник	Кількість теоретичних тарілок	Симетрія піка
Метанол	5174	1,0
Рухома фаза	5735	1,1

Отримані результати показали, що обидва розчинники забезпечують належну ефективність хроматографічної системи та симетрію піка. Метанол було обрано як розчинник для подальших досліджень, оскільки він забезпечував кращу форму піка та ефективне розчинення основи крему, що дозволило уніфікувати підготовку проб для обох лікарських форм.

Особливу увагу приділяли розробці процедури пробопідготовки крему, оскільки після розчинення препарату у випробовуваному розчині залишалися нерозчинні компоненти основи, здатні впливати на роботу хроматографічної системи. Для їх видалення досліджували різні типи мембранних фільтрів із різними матеріалами та розмірами пор. Під час випробувань перші 5 мл фільтрату відкидали. Результати дослідження наведено в таблиці 4.2.

Усі досліджені фільтри забезпечували ступінь вилучення нафтифіну гідрохлориду близько 100 %, що свідчить про відсутність сорбції аналіту на матеріалі мембрани. Найкращі результати щодо чистоти фільтрату та зручності використання були отримані при застосуванні нейлонових

мембранних фільтрів із розміром пор 0,45 мкм, які були обрані для подальшого використання.

Таблиця 4.2 – Порівняльна оцінка мембранних фільтрів для підготовки проб крему

Тип фільтра	Матеріал фільтра	Розмір пор, мкм	Ступінь вилучення, %	Коментарі
NY	Нейлон (Nylon)	0,22	100,4	Забезпечує чистоту проби, але може знижувати швидкість фільтрації
		0,45	99,9	Висока ефективність видалення кремової основи
RC	Регенована целюлоза (Regenerated Cellulose)	0,45	100,4	Забезпечує чистоту проби, підходить для фільтрації водних і органічних розчинників
PTFE	Політетрафторетилен (Polytetrafluoroethylene)	0,22	99,8	Висока хімічна стійкість, підходить для агресивних середовищ, забезпечує високий рівень очищення від дрібних часток
		0,45	99,8	Висока хімічна стійкість, підходить для агресивних середовищ

Оскільки у фармакопейних джерелах для аналізу нафтифіну гідрохлориду регламентовано лише тип стаціонарної фази (C18), було проведено експериментальне порівняння декількох хроматографічних колонок різних виробників та геометричних параметрів. Оцінювання здійснювали за показниками симетрії піка та ефективності колонки. Результати наведено в таблиці 4.3 [66].

Таблиця 4.3 – Порівняльна характеристика досліджених C18-колонок

Хроматографічна колонка	Кількість теоретичних тарілок	Симетрія піка
Poroshell 120 SB C18 75×4.6 мм, 2,7 мкм	7962	0,8
Zorbax SB Aq C18 50×4.6 мм, 5 мкм	1696	1,2
XBridge C18 50×4.6 мм, 3.5 мкм	9904	1,6
Hypersil ODS 100×4.6 мм, 5 мкм	605	1,9
Partisil ODS 100×4.6 мм, 5 мкм	3088	1,7
Aquasil C18 50×4.6 мм, 3 мкм	3044	1.1
Nucleodur C18 iris 50×4.6 мм, 3 мкм	3397	1,0
Luna C18 50×4.6 мм, 3 мкм	5725	1,0
Gemini C18 50×4.6 мм, 3 мкм	5735	1,0

Встановлено, що належні хроматографічні характеристики забезпечували колонки Gemini C18 (50 × 4,6 мм; 3 мкм) та Luna C18 (50 × 4,6 мм; 3 мкм). Для піка нафтифіну гідрохлориду на зазначених колонках спостерігалися високі значення числа теоретичних тарілок та коефіцієнта симетрії, що відповідали вимогам системної придатності. Крім того, використання коротких колонок дозволило скоротити тривалість аналізу без втрати ефективності розділення.

Оптимальними було визначено такі умови хроматографування: колонка Luna C18 (50 × 4,6 мм; 3 мкм), швидкість потоку рухомої фази 1,0 мл/хв, температура колонки 25 °С, об'єм інжекції 10 мкл та довжина хвилі детектування 254 нм. За таких умов час утримування нафтифіну гідрохлориду становив близько 4,8 хвилини, при цьому не спостерігалось інтерференції з боку компонентів розчинника або допоміжних речовин лікарських форм.

Для доведення специфічності методики аналізували розчинник, розчин плацебо, розчин порівняння та випробовуваний розчин з використанням двох хроматографічних колонок. Типові хроматограми, отримані зі використанням хроматографічної колонки Gemini C18 наведено на рисунках 4.1–4.4.

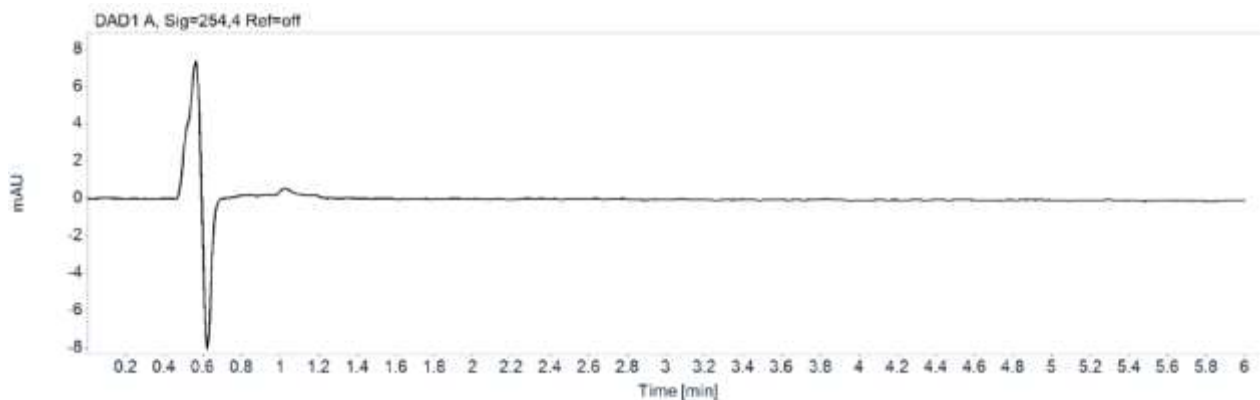
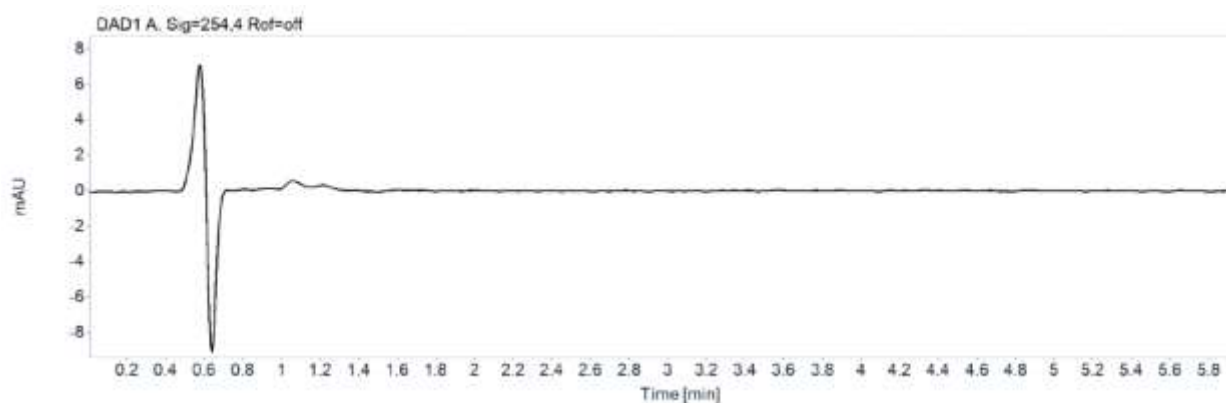
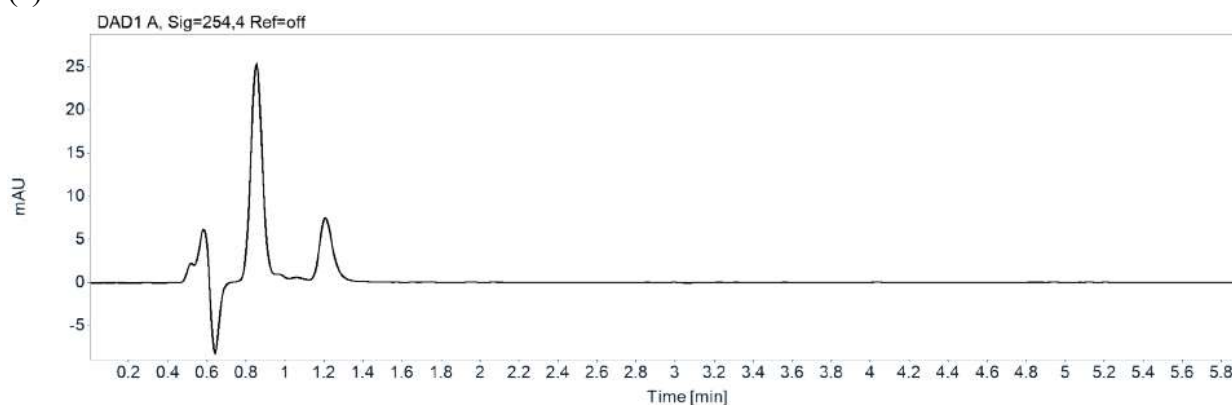


Рисунок 4.1 – Хроматограма розчинника
(колонка Gemini C18, 4,6 × 50 мм, 3 мкм)



(а)



(б)

Рисунок 4.2 – Хроматограми розчинів плацебо:

(а) – лікарська форма розчину; (б) – лікарська форма крему
(колонка Gemini C18, 4,6 × 50 мм, 3 мкм)

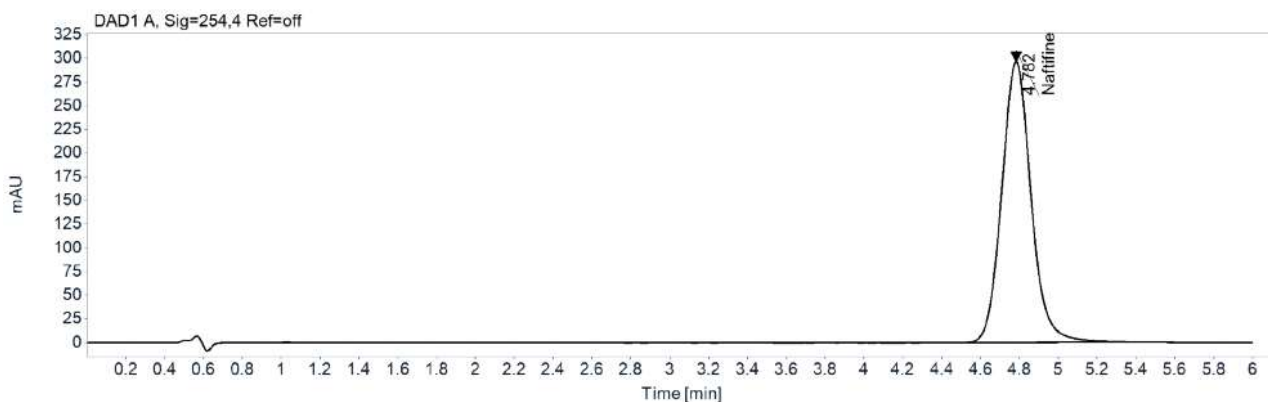
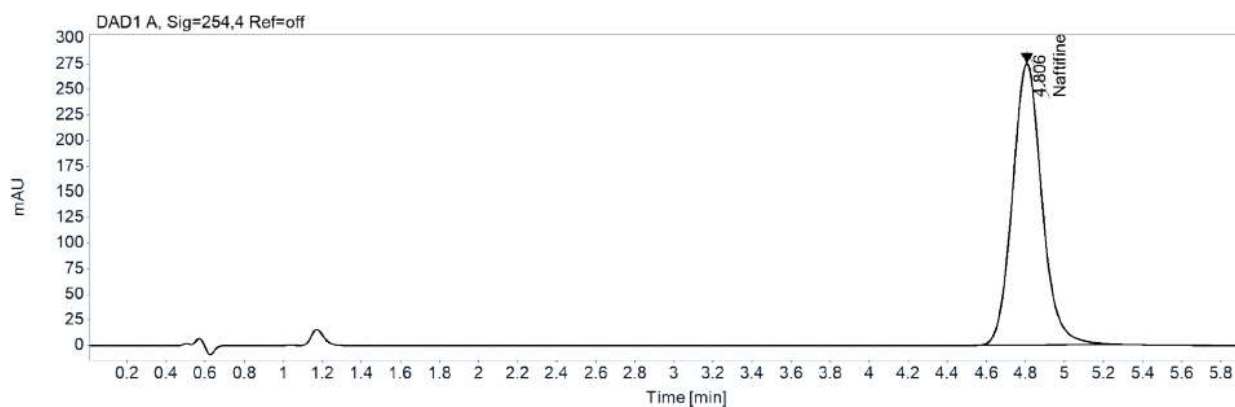
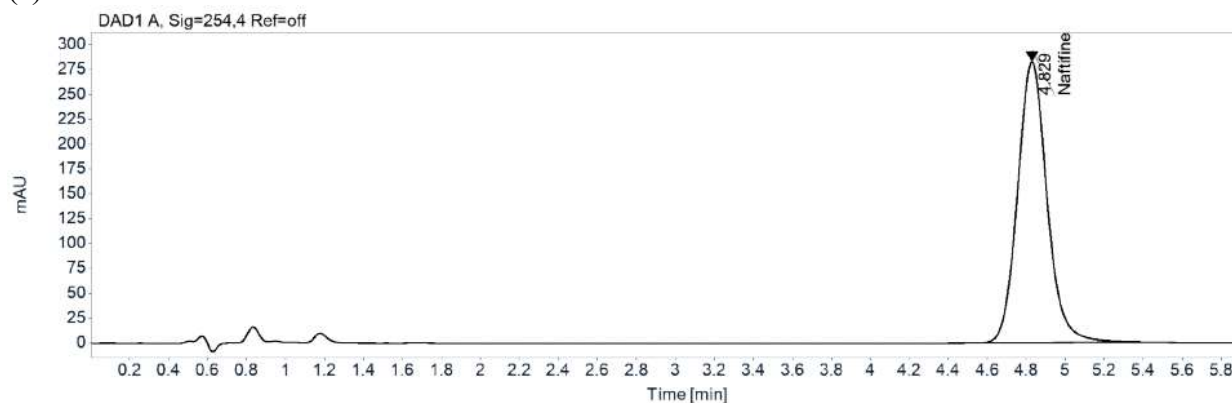


Рисунок 4.3 – Хроматограма розчину порівняння
(колонка Gemini C18, 4,6 × 50 мм, 3 мкм)



(а)



(б)

Рисунок 4.4 – Хроматограми випробовуваних розчинів нафтифіну
гідрохлориду: (а) – лікарська форма розчину; (б) – лікарська форма крему
(колонка Gemini C18, 4,6 × 50 мм, 3 мкм)

Типові хроматограми, отримані з використанням хроматографічної колонки Luna C18 наведено на рисунках 4.5–4.8.

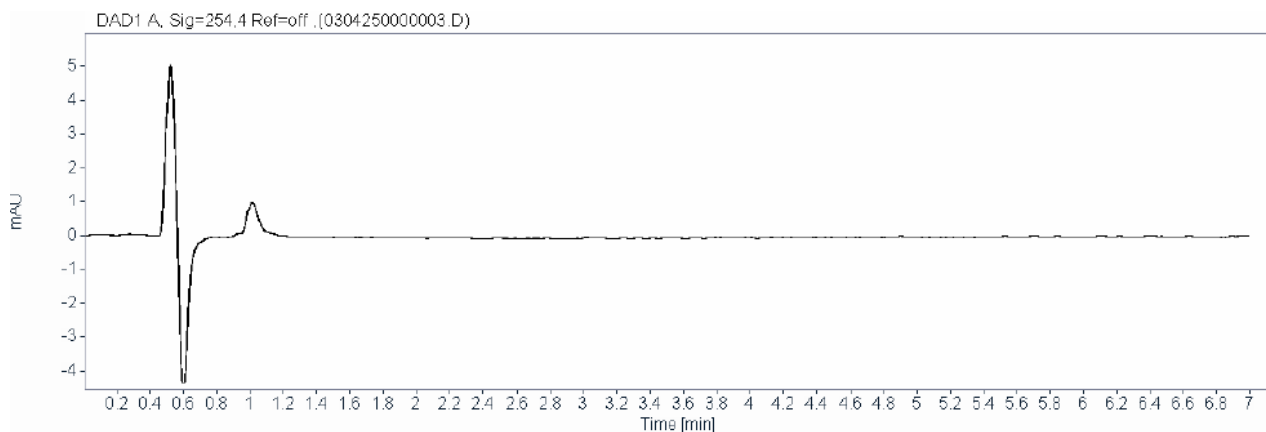
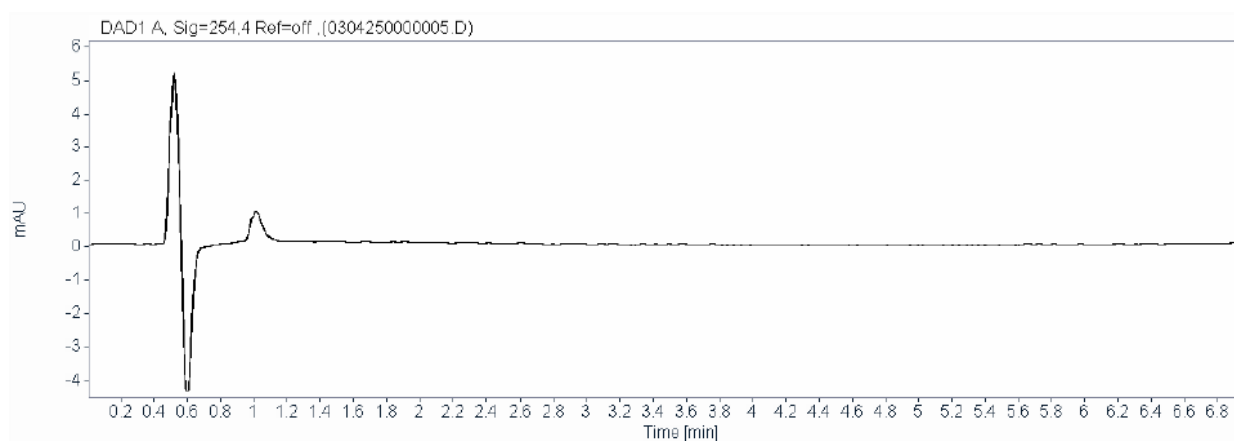
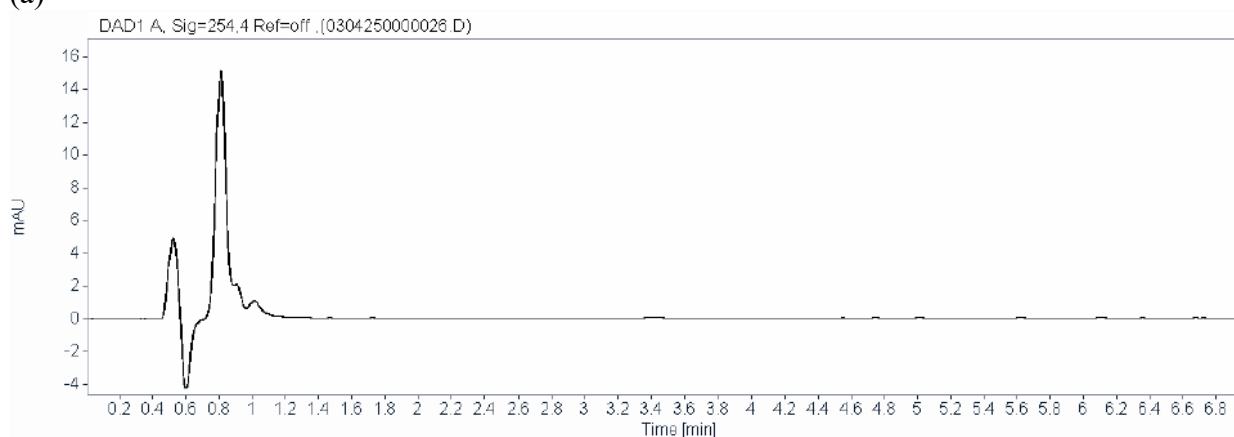


Рисунок 4.5 – Хроматограма розчинника
(колонка Luna C18, 4,6 × 50 мм, 3 мкм)



(а)



(б)

Рисунок 4.6 – Хроматограми розчинів плацебо:
(а) – лікарська форма розчину; (б) – лікарська форма крему
(колонка Luna C18, 4,6 × 50 мм, 3 мкм)

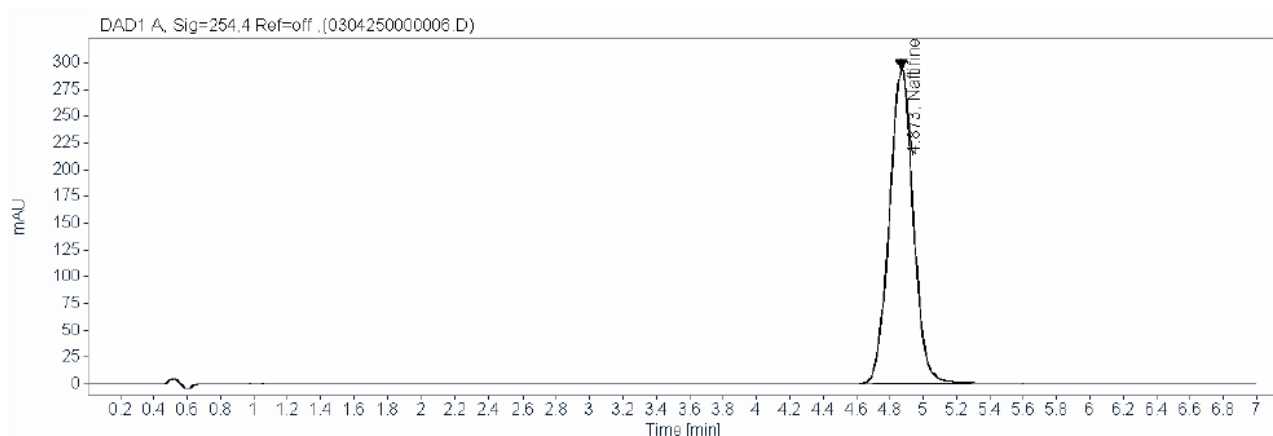
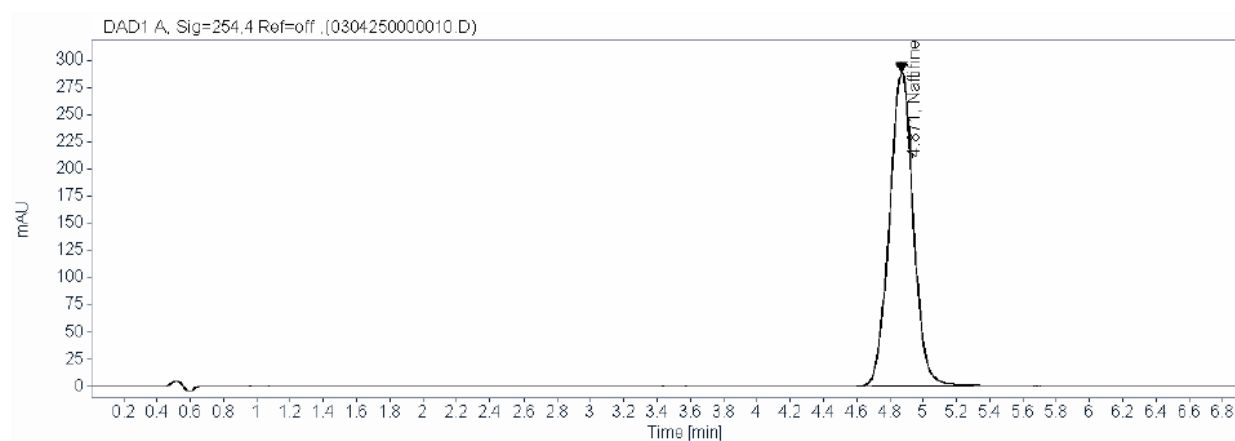
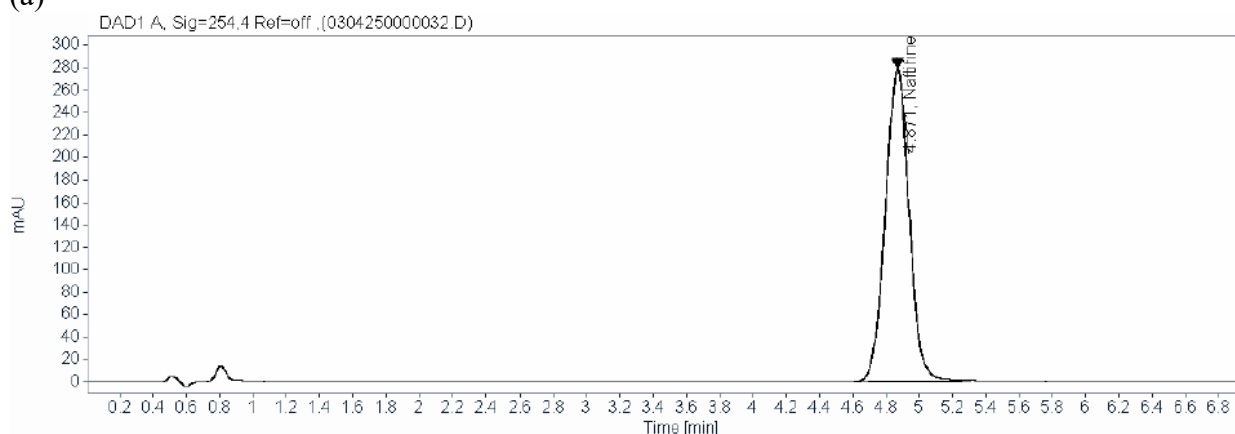


Рисунок 4.7 – Хроматограма розчину порівняння
(колонка Luna C18, 4,6 × 50 мм, 3 мкм)



(a)



(б)

Рисунок 4.8 – Хроматограми випробовуваних розчинів нафтифіну
гідрохлориду: (а) – лікарська форма розчину; (б) – лікарська форма крему
(колонка Luna C18, 4,6 × 50 мм, 3 мкм)

Розраховували різницю між часом утримування піка нафтифіну з хроматограми розчину порівняння та випробовуваного розчину за формулою:

$$\Delta_{RT} = \frac{|RT_{ref} - RT_{test}|}{RT_{ref}} \cdot 100\% \quad (4.1)$$

де: RT_{ref} – час виходу піка нафтифіну з хроматограми розчину порівняння, хв;

RT_{test} – час виходу піка нафтифіну з хроматограми випробовуваного розчину, хв.

Результати розрахунків наведено в таблицях 4.4 і 4.5

Таблиця 4.4 – Різниця між часами утримування піку нафтифіну (лікарська форма розчину)

Розчин	Gemini C18 4,6 × 50 мм × 3 мкм		Luna C18 4,6 × 50 мм × 3 мкм	
	РП	ВР	РП	ВР
RT	4,677	4,677	4,872	4,871
Δ_{RT} , %	0,000		0,021	

Таблиця 4.5 – Різниця між часами утримування піку нафтифіну (лікарська форма крему)

Розчин	Gemini C18 4,6 × 50 мм × 3 мкм		Luna C18 4,6 × 50 мм × 3 мкм	
	РП	ВР	РП	ВР
RT	4,677	4,684	4,872	4,871
Δ_{RT} , %	0,1497		0,0205	

На хроматограмах розчинника та розчинів плацебо не виявлено піків, що можуть інтерферувати з піком нафтифіну. Різниця між часами утримування піку нафтифіну з хроматограми розчину порівняння та випробовуваного розчину не перевищує 0,15 %, що задовольняє критерій прийнятності (не більше 2 %). Специфічність методики підтверджено [66].

Придатність хроматографічної системи оцінювали кожного аналітичного дня. Оцінку придатності хроматографічної системи наведено у таблиці 4.6.

Таблиця 4.6 – Оцінка придатності хроматографічної системи.

Параметр	Критерій прийнятності	Результат
Відносне стандартне відхилення, розраховане з хроматограми розчину порівняння для площі піку нафтифіну за трьома паралельними інжекціями	$\leq 1,0 \%$	0,093 – 0,345 %
Коефіцієнт симетрії, розрахований за піком нафтифіну	0,8 – 1,8	1,0 – 1,1
Ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком нафтифіну, за хроматограмами розчину порівняння	≥ 2000	4731 – 5724

Вимоги до придатності хроматографічної системи виконуються.

Дослідження лінійності було проведено у діапазоні концентрації від 56,7 мкг/мл до 106,7 мкг/мл, що відповідає 70,84–133,43 % від номінальної концентрації нафтифіну гідрохлориду у випробовуваному розчині.

Розраховували параметри лінійної регресії відповідно до рекомендацій ДФУ 2.4 п. 5.3.N1 [99]. За отриманим рівнянням регресії розраховували «знайдене» значення площ піків за формулою:

$$s_i = a + b \cdot C_i \quad (4.2)$$

де: s – значення площ піків, розраховане за рівнянням регресії;

C_i – концентрація нафтифіну гідрохлориду у відповідному розчині для дослідження лінійності, мкг/мл;

a – вільний член рівняння регресії;

b – кутовий коефіцієнт рівняння регресії.

Розрахунок нормалізованого значення вільного члена рівняння регресії (у відсотках до сигналу обладнання що відповідає номінальній концентрації аналіту у розчині) проводили за формулою:

$$|a_i|, \% = \left| \frac{a \cdot C_{ref}}{S_{ref} \cdot C_{nom}} \right| \cdot 100 \% \quad (4.3)$$

де: S_{ref} – середнє значення площ піків нафтифіну з хроматограми розчину порівняння;

C_{ref} – концентрація нафтифіну гідрохлориду у розчині порівняння, мкг/мл;

C_{nom} – номінальна концентрація нафтифіну гідрохлориду у випробовуваному розчині (80 мкг/мл).

Результати хроматографування наведено у таблиці 4.7. Розрахунки параметрів лінійної регресії наведено у таблиці 4.8.

Таблиця 4.7 – Експериментальні дані для розрахунку параметрів лінійної регресії

Розчин	C_{t_i} , мкг/мл	S_i	S_{Av}	RSD, %	s_i	$S_i - s_i$	C_{t_i} , %	X, мг/г
L1	56,675	2189,4	2189,5	0,003	2158,6	30,8	70,84	7,084
	56,675	2189,5			2158,6	30,9		
L2	66,300	2501,1	2498,2	0,167	2525,0	-23,9	82,87	8,287
	66,300	2495,2			2525,0	-29,8		
L3	74,052	2810,8	2813,6	0,138	2820,2	-9,4	92,56	9,256
	74,052	2816,3			2820,2	-3,9		
L4	82,217	3110,5	3111,2	0,030	3131,0	-20,5	102,77	10,277
	82,217	3111,8			3131,0	-19,2		
L5	90,408	3449,1	3449,1	0,000	3442,9	6,2	113,01	11,301
	90,408	3449,1			3442,9	6,2		
L6	97,836	3750,0	3742,2	0,297	3725,7	24,3	122,30	12,230
	97,836	3734,3			3725,7	8,6		
L7	106,744	4063,6	4064,8	0,042	4064,9	-1,3	133,43	13,343
	106,744	4066,0			4064,9	1,1		

Таблиця 4.8 – Параметри лінійної регресії

Параметр	a	a , %	b	r	S ₀	S _a
Критерій	N/A	≤ 1,0	N/A	≥ 0,998	N/A	N/A
Результат	0,81	0,027	38,07	0,99954	20,42	27,883

Графік залежності відгуку приладу від концентрації нафтифіну гідрохлориду у модельних розчинах та графік залишків наведено на рисунку 4.9. Розраховані параметри лінійної регресії відповідали встановленим критеріям прийнятності. Залишки були випадковим чином розподілені відносно нульового значення. Лінійність методики підтверджено в дослідженому діапазоні концентрацій.

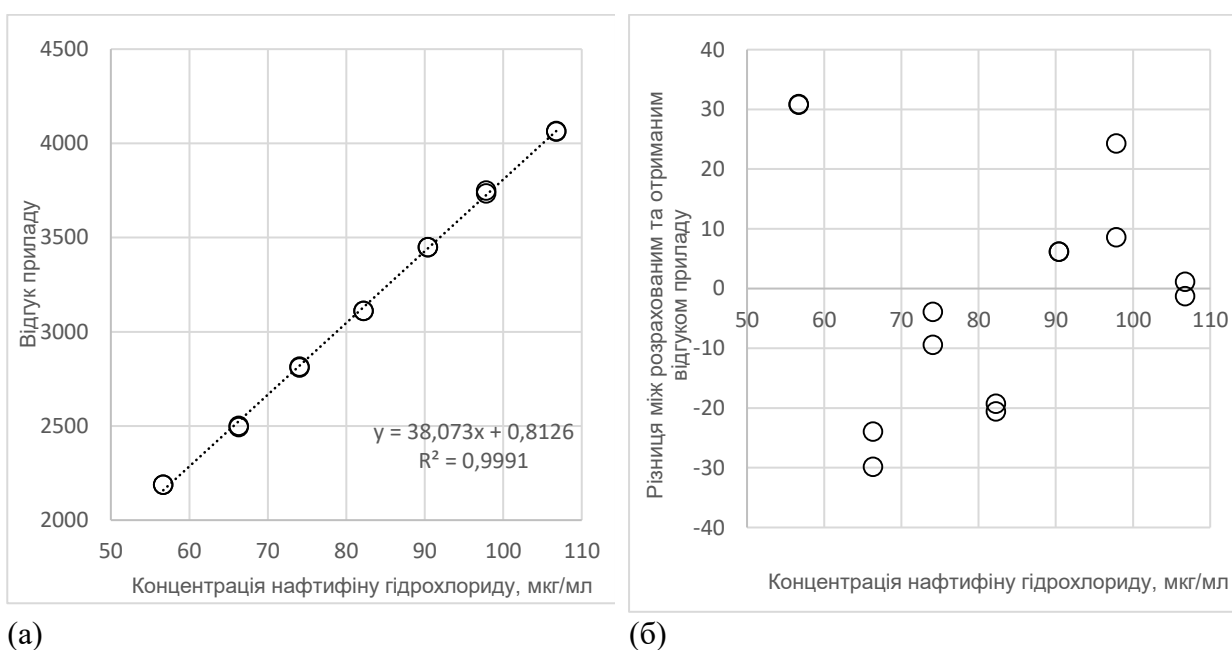


Рисунок 4.9 – Графік залежності відгуку приладу від концентрації нафтифіну гідрохлориду: (а) – графік регресії; (б) – графік залишків

Розрахунок межі виявлення та межі кількісного визначення за параметрами калібрувальної прямої проводили за формулами:

$$QL = \frac{S_a \cdot 10}{b} \quad (4.4)$$

$$DL = \frac{S_a \cdot 3,3}{b} \quad (4.5)$$

де S_a – стандартне відхилення вільного члена рівняння регресії.

Результати розрахунку межі виявлення та межі кількісного визначення наведено в таблиці 4.9.

Таблиця 4.9 – Розрахунок межі виявлення та межі кількісного визначення

Параметр	LOQ		LOD	
	С, мкг/мл	Х, мг/г	С, мкг/мл	Х, мг/г
Результат	7,3	0,9	2,4	0,3

Розраховане значення межі кількісного визначення становить 9,1 %, що менше 10 % номінального вмісту аналіту в випробовуваних розчинах тому експериментальне підтвердження межі кількісного визначення не проводили.

Для перевірки можливості використання значення чистоти сировини, зазначеного в сертифікаті виробника (кількісний вміст – 100,0 %; втрата в масі при висушуванні – 0,06 %), готували та аналізували по 2 паралельні розчини порівняння та контрольні розчини. Контрольні розчини готували аналогічно розчину порівняння, використовуючи АФІ замість стандартного зразка.

Розраховували відношення відгуків у розчині порівняння та контрольному розчині за формулою:

$$RRF = \frac{S_i \cdot C_0}{S_0 \cdot C_i} \quad (4.6)$$

де: S_i – середнє значення площ піків нафтифіну з хроматограми контрольного розчину;

S_0 – середнє значення піків нафтифіну з хроматограми першої паралелі розчину порівняння;

C_i – концентрація нафтифіну гідрохлориду у контрольному розчині, мкг/мл;

C_0 – концентрація нафтифіну гідрохлориду у першої паралелі розчину порівняння, мкг/мл.

Результати хроматографування та розрахунок відносних факторів відгуку наведено у таблиці 4.10.

Таблиця 4.10 – Розрахунок відносних факторів відгуку

Розчин	Розчин порівняння		Контрольний розчин	
Паралель	1	2	1	2
Концентрація, мкг/мл	82,897	80,100	81,031	82,570
Індивідуальні значення площ піків	3123,7	3055,6	3052,8	3118,4
	3120,9	3053,7	3047,4	3116,4
	3128,0	3047,6	3051,0	3111,5
Середнє	3124,2	3052,3	3050,4	3115,4
RSD, %	0,114	0,137	0,090	0,114
RRF	н/в	101,110	99,886	100,114

Отримані результати задовольняють критерій прийнятності (98,0–102,0 %), тобто значення вмісту основної речовини в АФІ нафтифіну гідрохлориду за сертифікатом виробника може бути використане для розрахунку внесеної концентрації нафтифіну гідрохлориду у модельних розчинах.

Дослідження правильності та прецизійності проводили окремо для крему та розчину нафтифіну гідрохлориду, оскільки лікарські форми відрізняються складом допоміжних речовин і процедурою підготовки проб. Окреме оцінювання цих характеристик дозволяло підтвердити відсутність

впливу матриці препарату на результати кількісного визначення та забезпечити достовірність методики для кожної лікарської форми.

Для дослідження правильності методики контролю лікарської форми розчину готували та аналізували 9 модельних розчинів, що містили плацебо та добавку АФІ нафтифіну гідрохлориду в діапазоні концентрацій 63,6–96,4 мкг/мл, що відповідає 79,48–120,55 % від номінального вмісту нафтифіну гідрохлориду у випробовуваному розчині.

Знайдену концентрацію аналіту у модельних розчинах розраховували за формулою:

$$C_{m_i} = \frac{C_{01} \cdot \bar{S}_i}{\bar{S}_{01}} \quad (4.7)$$

де: $\bar{S}_i$ – середнє значення площ піків нафтифіну у відповідному модельному розчині;

$\bar{S}_{01}$ – середнє значення площ піків нафтифіну у розчині порівняння;

C_{01} – концентрація аналіту у розчині порівняння.

Співвідношення «Знайдено C_{m_i} »/«Введено C_{t_i} » розраховували за формулою:

$$Recovery_i = \frac{C_{m_i}}{C_{t_i}} \cdot 100\% \quad (4.8)$$

Результати хроматографування та розрахунки наведено у таблиці 4.11. Оцінку результатів наведено у таблиці 4.12.

Отримані результати відповідають критеріям прийнятності. Правильність методики для лікарської форми у вигляді розчину підтверджено.

Для дослідження правильності методики контролю лікарської форми крему готували та аналізували 9 модельних розчинів, що містили плацебо та добавку АФІ нафтифіну гідрохлориду в діапазоні концентрацій 72,3–98,0 мкг/мл, що відповідає 90,38–122,50 % від номінального вмісту нафтифіну гідрохлориду у випробовуваному розчині.

Таблиця 4.11 – Експериментальні дані для дослідження правильності для лікарської форми розчину

Розчин	C _t , мкг/мл	S	S _{Av}	RSD, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _t , %
M1_1	63,582	2434,32	2433,10	0,071	64,378	101,253	79,48
		2431,88					
M1_2	65,583	2485,11	2488,71	0,205	65,850	100,406	81,98
		2492,31					
M1_3	63,752	2412,26	2412,69	0,025	63,838	100,135	79,69
		2413,12					
M2_1	79,594	3012,63	3010,11	0,119	79,645	100,064	99,49
		3007,58					
M2_2	79,850	3027,12	3039,85	0,592	80,432	100,730	99,81
		3052,58					
M2_3	80,063	3018,15	3014,60	0,167	79,764	99,627	100,08
		3011,04					
M3_1	96,405	3627,90	3633,45	0,216	96,139	99,723	120,51
		3639,00					
M3_2	96,437	3647,32	3639,71	0,296	96,304	99,862	120,55
		3632,10					
M3_3	95,319	3622,66 3595,67	3616,13	0,256	95,680	100,379	119,15

Розрахунок знайденої концентрації нафтифіну гідрохлориду та ступеня вилучення (Recovery) проводили за формулами, наведеними вище для лікарської форми у вигляді розчину.

Таблиця 4.12 – Оцінка результатів правильності для лікарської форми розчину

Параметр	Критерій	Результат
Індивідуальні значення ступеня вилучення	98,0 - 102,0 %	99,627 – 101,253 %
Середнє значення ступеня вилучення	99,0 - 101,0 %	100,242 %

Результати хроматографування та розрахунки наведено у таблиці 4.13
Оцінку результатів наведено у таблиці 4.14.

Таблиця 4.13 – Експериментальні дані для дослідження правильності для лікарської форми крему

Розчин	C _t , мкг/мл	S	S _{Av}	RSD, %	C _m , мкг/мл	Recovery, %	C _t , %
M1_1	72,3	2696,01	2693,66	0,124	72,756	100,631	90,38
		2691,31					
M1_2	73,1	2715,95	2728,74	0,663	73,704	100,826	91,38
		2741,53					
M1_3	72,9	2691,17	2686,08	0,268	72,551	99,522	91,13
		2681,00					
M2_1	85,1	3158,51	3154,55	0,178	85,205	100,123	106,38
		3150,59					
M2_2	85,4	3163,97	3154,88	0,408	85,214	99,782	106,75
		3145,78					
M2_3	85,0	3161,60	3159,10	0,112	85,328	100,385	106,25
		3156,60					
M3_1	97,2	3620,88	3605,90	0,587	97,396	100,201	121,50
		3590,93					
M3_2	98,0	3621,99	3622,52	0,021	97,845	99,842	122,50
		3623,06					
M3_3	96,7	3610,50	3603,09	0,291	97,320	100,641	120,88
		3595,67					

Таблиця 4.14 – Оцінка результатів правильності для лікарської форми крему

Параметр	Критерій	Результат
Індивідуальні значення ступеня вилучення	98,0 - 102,0 %	99,522 – 100,826 %
Середнє значення ступеня вилучення	99,0 - 101,0 %	100,217 %

Отримані результати відповідають критеріям прийнятності. Правильність методики для лікарської форми у вигляді крему підтверджено.

Для оцінки збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності два аналітики протягом двох аналітичних днів готували та аналізували по 6 паралелей випробовуваних розчинів.

Результати хроматографування для лікарської форми розчину наведено у таблицях 4.15 та 4.16. Оцінку результатів наведено у таблиці 4.17.

Таблиця 4.15 – Результати хроматографування (Аналітик А)

Показник	РП	BP1_1	BP1_2	BP1_3	BP1_4	BP1_5	BP1_6
S _i	2926,6	2880,1	2847,7	2945,9	2942,8	2943,8	2957,4
	2929,7	2877,7	2863,0	2952,6	2933,8	2958,0	2951,0
	2932,0	н/в					
$\bar{S}_i$	2929,4	2878,9	2855,4	2949,3	2938,3	2950,9	2954,2
RSD, %	0,093	0,059	0,379	0,161	0,217	0,340	0,153
X, %	н/в	9,993	10,106	10,018	10,034	10,024	10,035

Отримані результати відповідають критеріям прийнятності. Прецизійність методики для лікарської форми у вигляді розчину підтверджено.

Результати хроматографування для лікарської форми крему наведено у таблицях 4.18 та 4.19. Оцінку результатів наведено у таблиці 4.20.

Таблиця 4.16 – Результати хроматографування (Аналітик Б)

Показник	РП	BP1_7	BP1_8	BP1_9	BP1_10	BP1_11	BP1_12
S _i	3098,8	2963,6	2992,2	2945,4	2949,4	2975,3	2980,4
	3108,1	2944,5	2967,4	2945,5	2949,6	2962,8	2967,2
	3090,8	н/в					
$\bar{S}_i$	3099,2	2954,1	2979,8	2945,5	2949,5	2969,1	2973,8
RSD, %	0,279	0,457	0,589	0,002	0,005	0,298	0,314
X, %	н/в	10,081	10,126	10,079	10,045	10,192	10,027

Таблиця 4.17 – Порівняння результатів для Кількісного визначення для лікарської форми розчину

Параметр	Критерій	Аналітик А	Аналітик Б
Середнє для 6 паралелей, %	н/в	10,035	10,091
RSD для 6 паралелей, %	≤ 1,0 %	0,378	0,593
Середнє для 12 паралелей, %	н/в	10,063	
RSD для 12 паралелей, %	≤ 1,5 %	0,558	
Різниця між результатами (Δ), %	≤ 2,0 %	0,566	

Таблиця 4.18 – Результати хроматографування (Аналітик А)

Показник	РП	BP1_1	BP1_2	BP1_3	BP1_4	BP1_5	BP1_6
S _i	2941,2	2773,8	2796,8	2835,3	2812,5	2886,8	2850,6
	2930,4	2782,7	2829,2	2840,6	2827,8	2893,4	2865,0
	2940,7	н/в					
$\bar{S}_i$	2937,4	2778,3	2813,0	2838,0	2820,2	2890,1	2857,8
RSD, %	0,093	0,227	0,814	0,132	0,384	0,161	0,356
X, %	н/в	9,545	9,568	9,641	9,628	9,618	9,615

Таблиця 4.19 – Результати хроматографування (Аналітик Б)

Показник	РП	BP1_7	BP1_8	BP1_9	BP1_10	BP1_11	BP1_12
S _i	3104,4	2896,7	2952,3	2922,9	2935,7	2885,7	2931,0
	3087,0	2917,5	2937,9	2949,6	2918,3	2875,7	2926,7
	3085,2	н/в					
$\bar{S}_i$	3092,2	2907,1	2945,1	2936,3	2927,0	2880,7	2928,9
RSD, %	0,343	0,506	0,346	0,643	0,420	0,245	0,104
X, %	н/в	9,586	9,711	9,780	9,755	9,724	9,652

Таблиця 4.20 – Порівняння результатів для Кількісного визначення для лікарської форми крему

Параметр	Критерій	Аналітик А	Аналітик Б
Середнє для 6 паралелей, %	н/в	9,603	9,701
RSD для 6 паралелей, %	≤ 1,0 %	0,390	0,734
Середнє для 12 паралелей, %	н/в	9,652	
RSD для 12 паралелей, %	≤ 1,5 %	0,776	
Різниця між результатами (Δ), %	≤ 2,0 %	0,988	

Отримані результати відповідають критеріям прийнятності. Прецизійність методики для лікарської форми у вигляді крему підтверджено.

За результатами проведених досліджень розроблено та валідовано ВЕРХ-методику кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду в лікарських формах у вигляді крему та розчину. У ході оптимізації обґрунтовано вибір хроматографічної колонки, складу рухомої фази та умов пробопідготовки, що забезпечило необхідну селективність та відтворюваність результатів для обох досліджуваних лікарських форм [66].

Порівняно з фармакопейною методикою USP запропонований підхід має низку суттєвих переваг. Використання обернено-фазової хроматографії дозволило відмовитися від тривалої підготовки рухомої фази та насичення

колонки, що є характерним для нормально-фазової методики USP [27]. Час стабілізації рухомої фази було скорочено з 12 годин до мінімального, необхідного для приготування розчину, а час кондиціонування колонки зменшено з приблизно 4 годин до менш ніж 30 хвилин. При цьому загальна тривалість хроматографічного аналізу не перевищувала 7 хвилин, що істотно підвищує продуктивність лабораторії та дозволяє ефективно використовувати методику при виконанні значної кількості рутинних аналізів (табл. 4.21).

Таблиця 4.21 – Порівняння розробленої ВЕРХ-методики кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду з методикою USP

Параметр	Методика USP [27]	Розроблена методика [66]
Підготовка рухомої фази	Потребує стабілізації протягом 12 годин перед використанням	Може використовуватися одразу після приготування
Час кондиціонування колонки	Близько 4 годин	Менше 30 хвилин
Швидкість потоку рухомої фази, мл/хв	2,0	1,0
Загальний час хроматографування, хв	Близько 10	Менше 7

Результати валідації підтвердили специфічність методики щодо нафтифіну гідрохлориду в присутності компонентів лікарських форм, лінійність у досліджуваному діапазоні концентрацій, а також відповідність показників правильності та прецизійності встановленим критеріям прийнятності. Отримані результати підтверджують придатність методики для кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду в досліджуваних лікарських формах.

Оцінювання екологічності розробленої методики із застосуванням сучасних інструментів AGREE та MoGAPI продемонструвало її відповідність

принципам «зеленої» аналітичної хімії [91, 92]. Високі значення показників екологічності свідчать про зниження споживання органічних розчинників, скорочення тривалості аналізу та мінімізацію утворення лабораторних відходів. На відміну від фармакопейної методики USP, для запропонованого підходу не виявлено критичних операцій, що негативно впливають на екологічний профіль аналізу (табл. 4.22).

Таблиця 4.22 – Порівняння показників екологічності розробленої та фармакопейної методик кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду

Параметр	Методика USP [27]	Розроблена методика [66]
Колонка	LiChrosorb Si 60 (250 × 4,6 мм, 5 мкм)	Luna C18 (50 × 4,6 мм, 3 мкм)
Рухома фаза	н-гексан : спирт : диметилформамід : мурашина кислота (200:60:40:2)	Буферний розчин : метанол (30:70)
Час кондиціонування колонки, хв	240	30
Час аналізу, хв	10	6
Швидкість потоку, мл/хв	2,0	1,0
Показник MoGAPI	64	82

Таким чином, розроблена ВЕРХ-методика поєднує високі аналітичні характеристики, експресність, економічну доцільність та екологічну безпечність. Сукупність отриманих результатів підтверджує її придатність для впровадження у практику фармацевтичних підприємств з метою контролю якості лікарських форм нафтифіну гідрохлориду.

4.2 Розробка та валідація хроматографічної методики визначення супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду у кремі та розчині методом рідинної хроматографії

Контроль супровідних домішок є невід'ємною складовою забезпечення якості та безпеки лікарських засобів. Для нафтифіну гідрохлориду особливу увагу приділяють контролю технологічних та деградаційних домішок, здатних впливати на стабільність препарату та його якісні характеристики. Відповідно до вимог фармакопейних монографій та сучасних регуляторних підходів, методики визначення домішок повинні забезпечувати належну селективність, чутливість та можливість виявлення домішок на рівнях, нижчих за встановлені специфікацією межі [27, 109].

З урахуванням результатів, отриманих під час розробки методики кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду, наступним етапом роботи стала розробка та оптимізація ВЕРХ-методики для визначення супровідних домішок у лікарських формах «крем» та «розчин». Основною метою було створення методики, придатної для контролю нормованих домішок нафтифіну гідрохлориду – транс-цинамонового альдегіду та N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду, а також для оцінювання стабільності лікарського засобу під час зберігання [66].

На початковому етапі досліджень було оцінено можливість використання умов, розроблених раніше для кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду. Проте встановлено, що за цих умов нормовані домішки елюювалися поблизу мертвого об'єму колонки та перекривалися з піками компонентів плацебо, що не забезпечувало необхідної селективності методики. Спроби оптимізації градієнтного режиму та вмісту органічного компонента рухомої фази не дозволили досягти задовільного розділення домішок і матричних компонентів, що зумовило необхідність подальшої оптимізації хроматографічних умов [110, 111].

З метою покращення утримування та розділення домішок було проведено порівняльне дослідження хроматографічних колонок різної довжини – 50, 150 та 250 мм. Передбачалося, що збільшення довжини колонки дозволить підвищити утримування аналітів і відокремити їх від компонентів плацебо. Встановлено, що використання коротших колонок не забезпечує необхідної селективності, тоді як колонка довжиною 250 мм дозволяє суттєво покращити розділення цільових домішок. Колонки більшої довжини не досліджували, оскільки отримане розділення вже було достатнім, а подальше збільшення довжини призвело б до необґрунтованого збільшення часу аналізу.

Під час дослідження різних стаціонарних фаз було встановлено, що форма піка N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду суттєво залежить від типу колонки. На окремих стаціонарних фазах спостерігали розщеплення піка та виражену асиметрію, що, ймовірно, пов'язано з основними властивостями сполуки та її вторинною взаємодією із залишковими силанольними групами стаціонарної фази. Найкращі результати щодо форми піка та відтворюваності були отримані при використанні колонки Synergi Hydro-RP [111, 112].

Для вибору оптимального розчинника на етапі розробки методики було досліджено можливість використання метанолу та ацетонітрилу. Попередні експерименти показали, що метанол забезпечує ефективне розчинення компонентів кремової основи та дозволяє отримувати однорідні розчини. Однак під час проведення досліджень правильності методики було виявлено проблему нестабільності випробовуваних розчинів, приготовлених із використанням метанолу [111].

Зокрема, при внесенні добавки ідентифікованих домішок – цинамонового альдегіду та N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду – до лікарського засобу або плацебо спостерігалось поступове зниження площі піка цинамонового альдегіду. Уже під час першої інжекції втрати становили

близько 5 %, а при подальшому зберіганні розчину площа піка продовжувала зменшуватися на 1-3 % при кожному наступному введенні. Одночасно на хроматограмах з'являвся додатковий неідентифікований пік із часом утримування близько 13 хвилин, що свідчило про перебіг процесів деградації або взаємодії компонентів розчину (рис. 4.10).

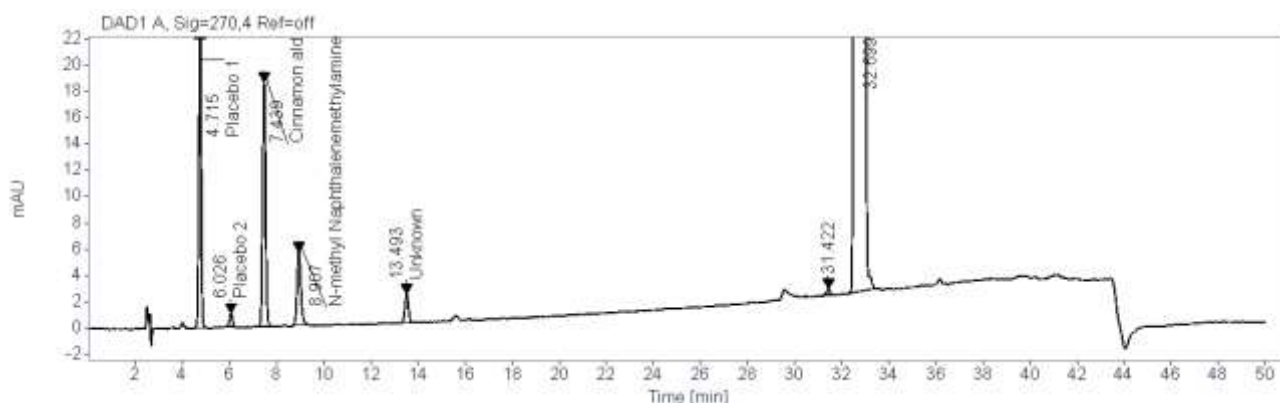


Рисунок 4.10 – Хроматограма модельного розчину після зберігання близько 10 годин

Для встановлення причин нестабільності було проведено серію додаткових експериментів із використанням модельних сумішей, що містили цинамоновий альдегід, нафтифіну гідрохлорид, плацебо та окремі допоміжні речовини препарату. Результати досліджень наведено в таблиці 4.23. Встановлено, що ні цинамоновий альдегід, ні нафтифіну гідрохлорид окремо не зазнавали деградації у метанолі. Також стабільними були розчини, що містили лише плацебо або суміш цинамонового альдегіду з нафтифіну гідрохлоридом. Водночас у модельних розчинах, що містили лікарський засіб або окремі компоненти його матриці, спостерігали зниження площі піка цинамонового альдегіду та появу додаткового піка з часом утримування близько 13 хв. Характер виявлених змін залежав від складу модельного розчину.

Особливий інтерес викликав той факт, що деградація не відбувалася на етапі приготування модельних розчинів. Навіть при використанні модельних сумішей, які зберігалися протягом тижня, результати залишалися стабільними до моменту приготування випробовуваного розчину. Отримані результати свідчили, що стабільність цинамонового альдегіду залежить від складу модельного розчину та використаного розчинника, що зумовило необхідність подальшої оптимізації умов пробопідготовки.

З метою усунення зазначеного недоліку було досліджено можливість використання ацетонітрилу як альтернативного розчинника. Встановлено, що в ацетонітрилі цинамоновий альдегід залишався стабільним протягом усього часу аналізу, а утворення додаткового піка або зниження площі основного піка не спостерігалось (табл. 4.23).

Таблиця 4.23 – Дослідження стабільності цинамонового альдегіду в модельних розчинах залежно від складу зразка та використаного розчинника

Модельний розчин	Розчинник	Результат спостереження
ЦА + НГХ	Метанол	ЦА стабільний; додатковий пік не утворюється
ЦА + плацебо	Метанол	ЦА стабільний; додатковий пік не утворюється
ЦА + препарат	Метанол	↓ площі піка ЦА; утворення додаткового піка (~13 хв)
ЦА + НГХ + плацебо	Метанол	↓ площі піка ЦА; утворення додаткового піка (~13 хв) та N-M-1-NMA
ЦА + НГХ + пропіленгліколь	Метанол	↓ площі піка ЦА; утворення додаткового піка (~13 хв) та N-M-1-NMA
ЦА + препарат + 2-піролідон	Метанол	↓ площі піка ЦА; утворення додаткового піка (~13 хв); N-M-1-NMA не утворюється
ЦА + препарат	Ацетонітрил	ЦА стабільний; додаткові піки не утворюються
ЦА + N-M-1-NMA + НГХ	Ацетонітрил	ЦА стабільний; додаткові піки не утворюються
ЦА + N-M-1-NMA + препарат	Ацетонітрил	ЦА стабільний; додаткові піки не утворюються

Проте використання ацетонітрилу супроводжувалося погіршенням форми хроматографічних піків, зокрема симетрія піка цинамонового альдегіду становила близько 0,7, що не відповідало вимогам до придатності хроматографічної системи.

Отримані результати свідчили про необхідність подальшої оптимізації умов пробопідготовки та хроматографування з метою забезпечення одночасно стабільності досліджуваних домішок і належних хроматографічних характеристик методики.

Для підвищення утримування домішок також досліджували вплив різних іон-парних реагентів. Зокрема, були випробувані розчини натрію октансульфонату концентрацією 10 та 20 ммоль/л, а також натрію додецилсульфату. Незважаючи на певне збільшення часу утримування аналітів, використання зазначених реагентів не забезпечило повного розділення домішок та піків плацебо. Перевагу було надано натрію октансульфонату, який порівняно з натрію додецилсульфатом характеризується кращими експлуатаційними властивостями та меншою схильністю до піноутворення.

Подальшу оптимізацію методики було зосереджено на підборі рН рухомої фази. Зміну рН використовували для регулювання часу утримування аналітів та досягнення належного розділення домішок і компонентів плацебо при мінімальній тривалості хроматографування. Для регулювання рН до розчину натрію октансульфонату додавали динатрій гідрогенфосфат із подальшим коригуванням значення рН ортофосфорною кислотою. Вивчено вплив рН у межах від 5,0 до 7,0 на параметри хроматографічного розділення (табл. 4.24).

Як видно з даних таблиці 4.24, значення рН буферного розчину суттєво впливає на хроматографічні характеристики методики. При зниженні рН спостерігається скорочення часу утримування всіх компонентів, проте

одночасно погіршується розділення між цинамоновим альдегідом та N-метил-1-нафталенметиламіном, а також зменшується ефективність хроматографічної системи. За значень рН 5,5 та 5,0 розділення між зазначеними домішками є недостатнім. При рН 7,0 забезпечується найкраща роздільна здатність між домішками, однак суттєво збільшується час аналізу. Оптимальним виявилось значення рН 6,5, за якого досягається належне розділення всіх досліджуваних компонентів, прийнятна симетрія піків, висока ефективність колонки та помірна тривалість хроматографування. Тому для подальших досліджень було обрано буферний розчин із рН 6,5.

Таблиця 4.24 – Вплив рН буферного розчину на хроматографічні характеристики методики визначення супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду

Показник	рН 7,0	рН 6,5	рН 6,0	рН 5,5	рН 5,0
Роздільна здатність від плацебо	6,7	6,6	1,1	6,7	6,7
Роздільна здатність між ЦА та N-М-1-НМА	22,9	6,1	5,0	не визначається	не визначається
Симетрія піка ЦА	0,96	0,94	0,94	0,96	0,94
Симетрія піка N-М-1-НМА	1,43	1,53	1,50	1,43	1,36
Симетрія піка НГХ	1,08	1,05	1,07	1,04	1,06
Кількість теоретичних тарілок для ЦА	18199	17609	16906	17615	17066
Кількість теоретичних тарілок для N-М-1-НМА	23236	16689	14649	13780	13501
Кількість теоретичних тарілок для НГХ	163771	151481	108593	75695	46153
Час утримування ЦА, хв	8,79	8,81	8,83	8,82	8,84
Час утримування N-М-1-НМА	17,70	10,61	7,55	6,21	5,49
Час утримування НГХ, хв	48,14	46,85	42,94	35,85	29,51

Для подальших досліджень було обрано колонку Synergi Hydro-RP (250 × 4,6 мм; 4 мкм), яка продемонструвала найкраще поєднання селективності та ефективності. Хроматографування проводили за температури колонки 40 °С, швидкості потоку рухомої фази 1,0 мл/хв та детектуванні при довжині хвилі 270 нм. За оптимізованих умов забезпечувалося повне розділення нафтифіну гідрохлориду та його нормованих домішок, що підтверджувало придатність методики для подальшої валідації.

Типові хроматограми розчину порівняння та випробовуваного розчину наведено на рисунках 4.11 та 4.12 відповідно.

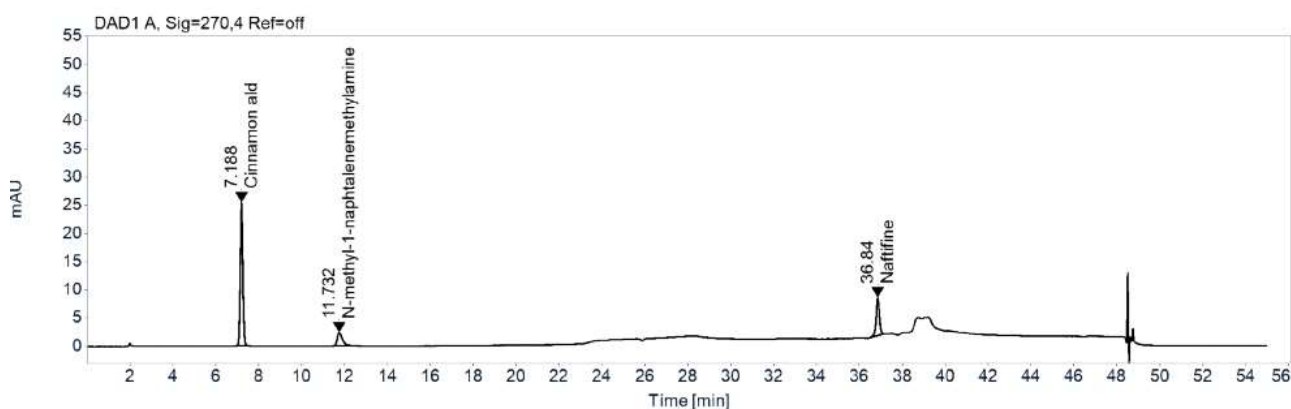


Рисунок 4.11 – Хроматограма розчину порівняння

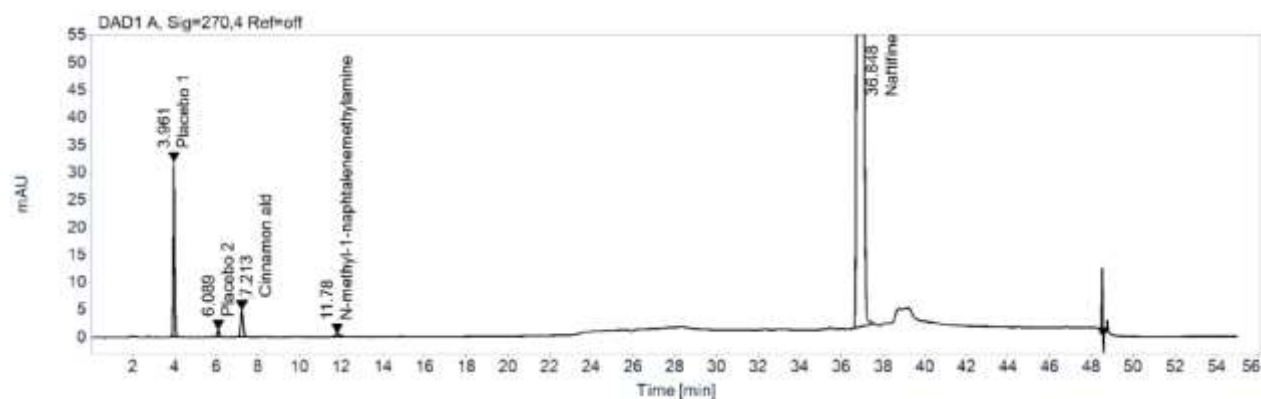


Рисунок 4.12 – Хроматограма випробовуваного розчину форми крему

Для підтвердження придатності розробленої ВЕРХ-методики до рутинного застосування у контролі якості лікарських засобів було проведено її валідацію відповідно до вимог ІСН Q2(R2) [5]. Під час валідації оцінювали такі характеристики методики, як специфічність, лінійність у діапазоні застосування, правильність та прецизійність.

Для підтвердження придатності розробленої ВЕРХ-методики визначення супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду до застосування у контролі якості лікарських засобів було проведено її валідацію відповідно до вимог ІСН Q2(R2) [5]. Під час валідації оцінювали специфічність, лінійність у діапазоні застосування, правильність, прецизійність та межу кількісного визначення.

Специфічність методики оцінювали шляхом порівняння хроматограм розчинника, плацебо, випробовуваних розчинів та модельних розчинів із внесеними домішками. Встановлено відсутність інтерференції між піками цинамонового альдегіду, N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду, нафтифіну гідрохлориду та компонентів матриці лікарських засобів, що підтверджує специфічність розробленої методики.

Лінійність досліджували в діапазоні концентрацій 0,19-2,80 мкг/мл для цинамонового альдегіду, N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду та нафтифіну гідрохлориду, що відповідає вмісту домішок від 0,05 до 0,70 %. Отримані параметри лінійної регресії наведено в таблиці 4.25.

Таблиця 4.25 – Параметри лінійної регресії

Параметр	a	a , %	b	r
Критерій прийнятності	–	≤ 10,0	–	≥ 0,990
Цинамоновий альдегід	–1,19	0,53	110,78	0,9998
N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлорид	–1,06	2,52	21,026	0,9986
Нафтифіну гідрохлорид	2,37	3,31	35,789	0,9988

Отримані коефіцієнти кореляції становили 0,9998 для цинамонового альдегіду, 0,9986 для N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду та 0,9988 для нафтифіну гідрохлориду і відповідали встановленому критерію прийнятності ($r \geq 0,990$), що підтверджує лінійність методики в досліджуваному діапазоні концентрацій.

Правильність методики оцінювали методом добавок відомих кількостей цинамонового альдегіду та N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду до випробовуваних розчинів. Дослідження проводили окремо для лікарських форм у вигляді розчину та крему. Отримані значення ступеня вилучення відповідали встановленим критеріям прийнятності, що підтверджує належну правильність методики. Результати оцінювання правильності методики для лікарських форм у вигляді розчину та крему наведено в таблиці 4.26.

Отримані значення ступеня вилучення для цинамонового альдегіду та N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду відповідали встановленим критеріям прийнятності на досліджуваних рівнях концентрацій для обох лікарських форм. Таким чином, правильність розробленої методики підтверджено

Прецизійність методики оцінювали на рівні збіжності та внутрішньолабораторної прецизійності. Дослідження проводили окремо для лікарських форм у вигляді розчину та крему із залученням двох аналітиків. Кожним аналітиком було приготовлено та проаналізовано по шість паралельних випробовуваних розчинів. Прецизійність оцінювали за значеннями відносного стандартного відхилення результатів визначення цинамонового альдегіду та N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду, а внутрішньолабораторну прецизійність – за різницею між середніми результатами, отриманими двома аналітиками. Результати наведено в таблиці 4.27.

Таблиця 4.26 – Результати оцінювання правильності ВЕРХ-методики визначення супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду

Лікарська форма	Домішка	Моделльний розчин	Критерій для X_i , %	Отримані X_i , %	Критерій для $X_{сер.}$, %	$X_{сер.}$, %
Розчин	Цинамоновий альдегід	M1	75,0-125,0	98,01-100,15	98,2-118,0	99,05
		M2–M4	92,5-107,5	97,06-101,41	95,0-105,0	100,08
	N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлорид	M1	75,0-125,0	92,80-102,56	98,2-118,0	98,85
		M2–M4	92,5-107,5	92,70-99,84	95,0-105,0	96,42
Крем	Цинамоновий альдегід	M1	75,0-125,0	96,78-98,00	98,2-118,0	97,57
		M2–M4	92,5-107,5	96,29-99,94	95,0-105,0	98,14
	N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлорид	M1	75,0-125,0	97,46-98,74	98,2-118,0	98,12
		M2–M4	92,5-107,5	99,04-100,25	95,0-105,0	99,83

Таблиця 4.27 – Результати оцінювання прецизійності ВЕРХ-методики визначення супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду

Лікарська форма	Домішка	Аналітик 1, середнє значення, %	RSD, %	Аналітик 2, середнє значення, %	RSD, %	Різниця між середніми результатами, %
Розчин	Цинамоновий альдегід	0,119	2,52	0,116	2,59	0,003
	N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлорид	0,115	3,55	0,116	3,38	0,001
Крем	Цинамоновий альдегід	0,116	3,60	0,115	3,13	0,001
	N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлорид	0,114	3,11	0,115	3,07	0,001

Отримані значення відносного стандартного відхилення результатів визначення нормованих домішок та різниця між середніми результатами, отриманими двома аналітиками, відповідали встановленим критеріям прийнятності для обох лікарських форм. Таким чином, збіжність та внутрішньолабораторну прецизійність розробленої методики підтверджено.

Таким чином, результати валідаційних досліджень підтвердили відповідність розробленої ВЕРХ-методики встановленим вимогам за показниками специфічності, лінійності, правильності, прецизійності та межі кількісного визначення. Методика забезпечує селективне визначення нормованих та неідентифікованих домішок нафтифіну гідрохлориду в лікарських формах у вигляді розчину та крему та може бути застосована для їх рутинного контролю якості [66].

4.3 Дослідження профілів деградації нафтифіну гідрохлориду як етап розробки методики визначення вмісту домішок у кремі та розчині

Одним із ключових етапів розробки методик контролю супровідних домішок є проведення досліджень примусової деградації (stress studies), які дають змогу встановити потенційні шляхи деградації діючої речовини, сформувати репрезентативний профіль продуктів деградації та підтвердити стабільність-індикативні властивості аналітичної методики [32, 109, 113, 114]. Під час таких досліджень лікарську речовину або лікарський засіб піддають впливу кислотного та лужного гідролізу, окиснення, підвищеної температури та світла [32, 109, 113, 115]. Отримані зразки використовують для оцінювання здатності аналітичної методики селективно визначати основну речовину в присутності супровідних домішок і продуктів її деградації [5, 113, 116, 117].

Нафтифіну гідрохлорид належить до похідних аліламіну та містить у своїй структурі ароматичні фрагменти і третинний амін, що потенційно можуть зазнавати окиснення, гідролізу або інших деградаційних перетворень

[118]. Крім того, у готових лікарських формах стабільність діючої речовини може залежати від складу допоміжних речовин та особливостей лікарської форми. Тому на етапі розробки методики визначення домішок було проведено дослідження деградаційної поведінки нафтифіну гідрохлориду у лікарських засобах у формі крему та розчину під впливом кислотного, лужного, окисного, термічного та світлового навантаження [79, 119].

Для оцінювання змін профілю домішок використовували розроблену ВЕРХ-методику, яка забезпечувала розділення нафтифіну гідрохлориду, ідентифікованих домішок – цинамонового альдегіду та N-метил-1-нафталенметиламіну гідрохлориду, а також потенційних продуктів деградації.

Для приготування випробовуваних розчинів при визначенні супровідних домішок використовували ацетонітрил, який забезпечував стабільність цинамонового альдегіду та інших досліджуваних компонентів. Для кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду застосовували метанол.

Контрольні зразки готували шляхом розчинення наважки крему або плацебо, еквівалентної 20 мг нафтифіну гідрохлориду, в ацетонітрилі з подальшим доведенням об'єму розчину до 50 мл. Отримані розчини використовували для дослідження супровідних домішок, після чого додатково розводили метанолом для проведення кількісного визначення.

Для оцінки впливу температури зразки витримували при 70 °C протягом трьох діб. Фотостабільність досліджували шляхом експонування зразків під дією ультрафіолетового випромінювання протягом семи діб.

Кислотну деградацію проводили шляхом обробки зразків 5 М розчином хлористоводневої кислоти з подальшою витримкою протягом 24 годин при кімнатній температурі та нейтралізацією 5 М розчином натрію гідроксиду. Для дослідження лужної деградації використовували аналогічний підхід із застосуванням 5 М розчину натрію гідроксиду та наступною нейтралізацією кислотою.

Окисну деградацію моделювали додаванням 9 % розчину перекису водню з витримкою протягом 24 годин за кімнатної температури. Після завершення експозиції всі зразки доводили ацетонітрилом до необхідного об'єму та аналізували за розробленими хроматографічними методиками.

Для контролю супровідних домішок використовували розчин порівняння, що містив цинамоновий альдегід, N-метил-1-нафталенметиламін гідрохлорид та нафтифіну гідрохлорид у концентрації 2 мкг/мл кожного компонента. Для кількісного визначення застосовували розчин порівняння нафтифіну гідрохлориду з концентрацією 80 мкг/мл.

Результати досліджень профілів деградації наведено на прикладі лікарської форми у вигляді крему. Аналогічні дослідження було проведено також для лікарського засобу у формі розчину. Для оцінки відтворюваності отриманих результатів і впливу складу лікарської форми дослідження виконували як для розробленого препарату Естезифін крем 1 % [120], так і для референтного препарату Екзодерил крем 1 % [121]. Отримані результати дозволили порівняти профілі домішок та продуктів деградації після дії різних стресових факторів.

На першому етапі було проаналізовано хроматографічні профілі вихідних зразків лікарських засобів без впливу стресових факторів (рис. 4.13–4.15).

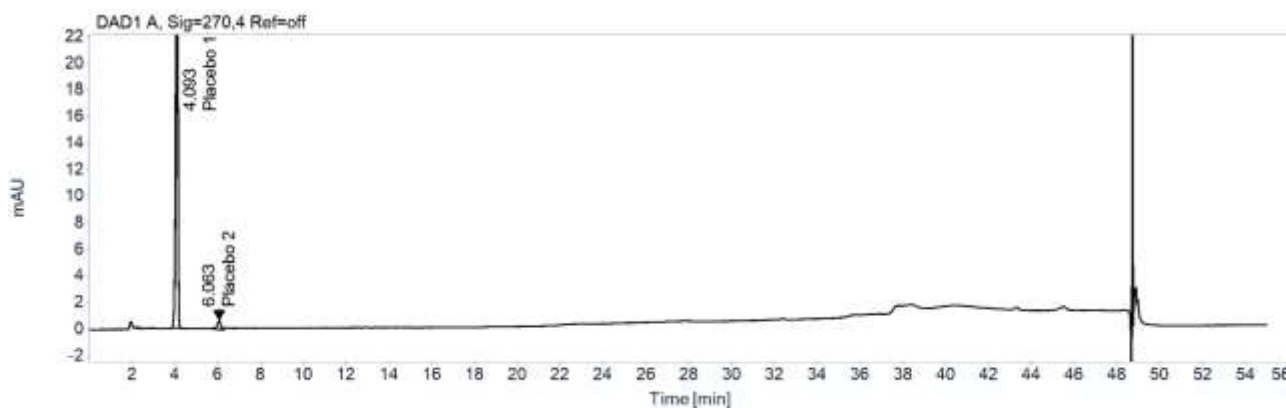


Рисунок 4.13 – Типова хроматограма розчину плацебо крему без дії стресових факторів

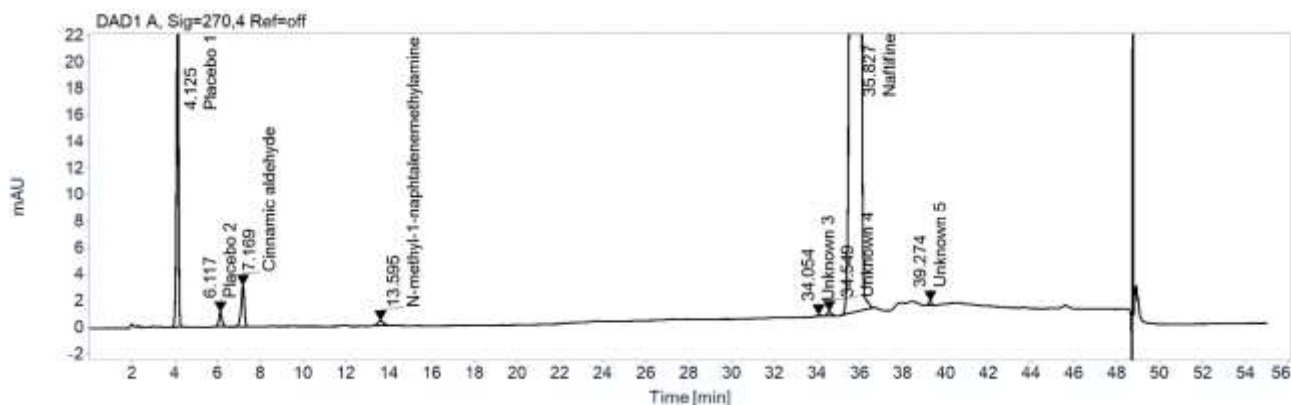


Рисунок 4.14 – Типова хроматограма ЛЗ Естезифін крем 1 % без дії стресових факторів

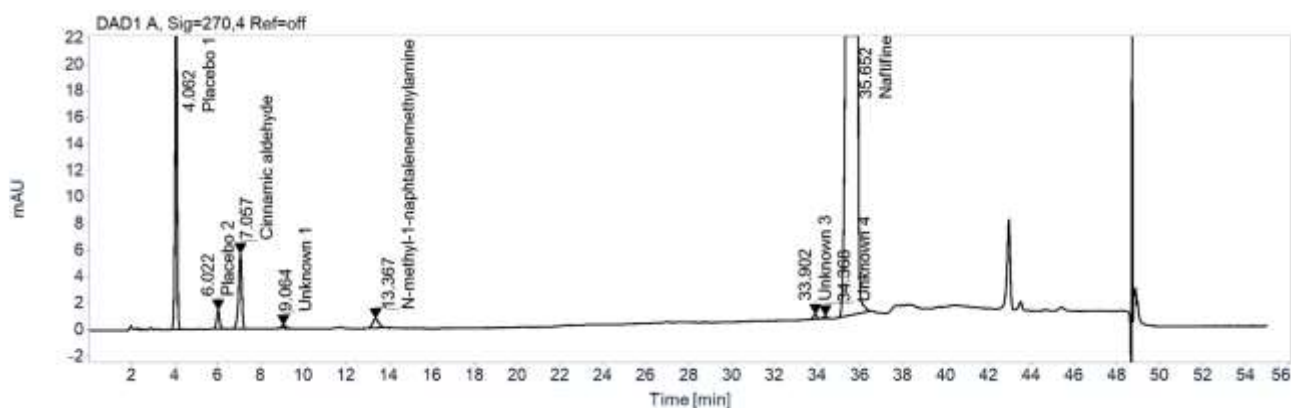


Рисунок 4.15 – Типова хроматограма ЛЗ Екзодерил крем 1 % без дії стресових факторів

Аналіз вихідних хроматограм показав наявність двох ідентифікованих домішок – цинамонового альдегіду та N-метил-1-нафталенметиламину гідрохлориду. При цьому піки допоміжних речовин не заважали визначенню домішок та основної речовини, що підтверджувало селективність розробленої методики. На хроматограмі плацебо були присутні окремі матричні піки, зумовлені наявністю допоміжних речовин лікарської форми. Крім того, на хроматограмі препарату Екзодерил виявлено додаткові піки з часом утримування близько 43 хвилин. Оскільки їх інтенсивність та площа залишалися практично незмінними після впливу всіх досліджуваних стресових факторів, зазначені компоненти були віднесені до технологічних

або синтетичних домішок, а не до продуктів деградації нафтифіну гідрохлориду.

Подальші дослідження проводили після впливу кислотного, лужного, термічного та світлового навантаження наведено в таблицях 4.28, 4.29.

Таблиця 4.28 – Вплив кислотного, лужного, термічного та світлового навантаження на профіль домішок у лікарському засобі Естезифін крем 1 %

Аналіт	Вихідний зразок	Стресовий фактор			
		5 М НСІ 24 год	5 М NaOH 24 год	70 °C 3 доби	УФ-світло 7 діб
ЦА	0,07	0,11	0,06	0,15	0,10
N-M-1-HMA	0,08	0,13	0,07	0,19	0,12
RRT 0,26	0,04	НМД	НМД	НМД	НМД
RRT 0,96	0,01	0,01	НМД	0,02	0,01
RRT 0,97	0,04	0,03	0,02	0,03	0,03
RRT 1,11	0,02	0,01	НМД	0,01	0,01
RRT 1,26	0,273	0,295	0,149	0,397	0,272
НГХ %	100,45	100,55	101,04	100,40	99,85
Примітка. НМД – нижче межі детектування.					

Результати досліджень показали, що під дією кислотного, лужного, термічного та світлового факторів істотних змін у профілі домішок не спостерігалось. Сумарний вміст домішок залишався практично незмінним, а вміст нафтифіну гідрохлориду відповідав вихідним значенням. Також не було виявлено появи нових значущих продуктів деградації. Отримані результати свідчать про стійкість нафтифіну гідрохлориду за досліджуваних умов кислотного, лужного, термічного та світлового навантаження.

На відміну від зазначених факторів, вплив окисного середовища призводив до суттєвих змін хроматографічного профілю (рис. 4.16–4.18).

Таблиця 4.29 – Вплив кислотного, лужного, термічного та світлового навантаження на профіль домішок у лікарському засобі Екзодерил крем 1 %

Аналіт	Вихідний зразок	Стресовий фактор			
		5 М НСІ 24 год	5 М NaOH 24 год	70 °С 3 доби	УФ-світло 7 діб
ЦА	0,13	0,08	0,04	0,19	0,15
N-M-1-HMA	0,18	0,19	0,15	0,28	0,21
RRT 0,26	НМД	НМД	НМД	НМД	НМД
RRT 0,96	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03
RRT 0,97	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
RRT 1,11	НМД	НМД	НМД	НМД	НМД
RRT 1,26	0,365	0,331	0,226	0,524	0,416
НГХ, %	99,40	98,71	99,24	98,78	98,88

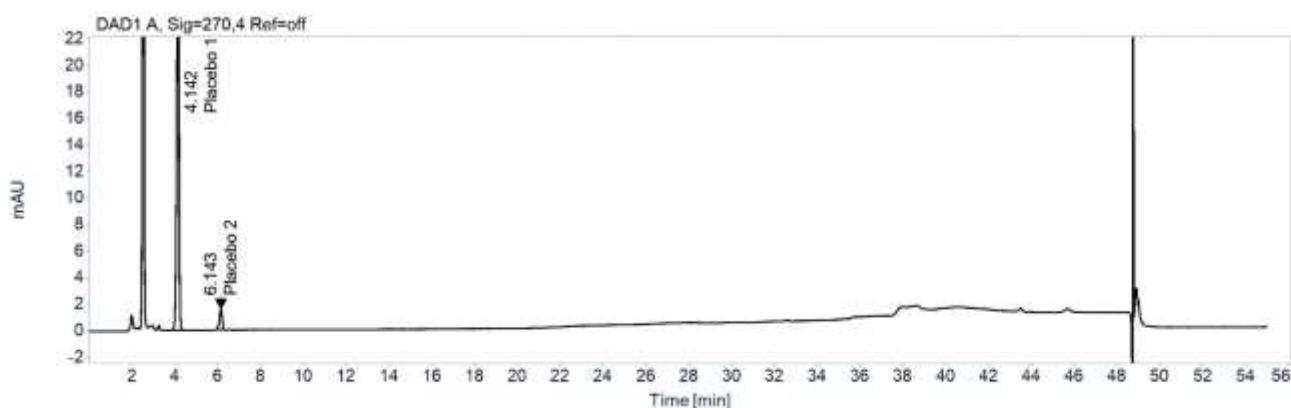


Рисунок 4.16 – Типова хроматограма розчину плацебо після впливу 9 % розчину перекису водню

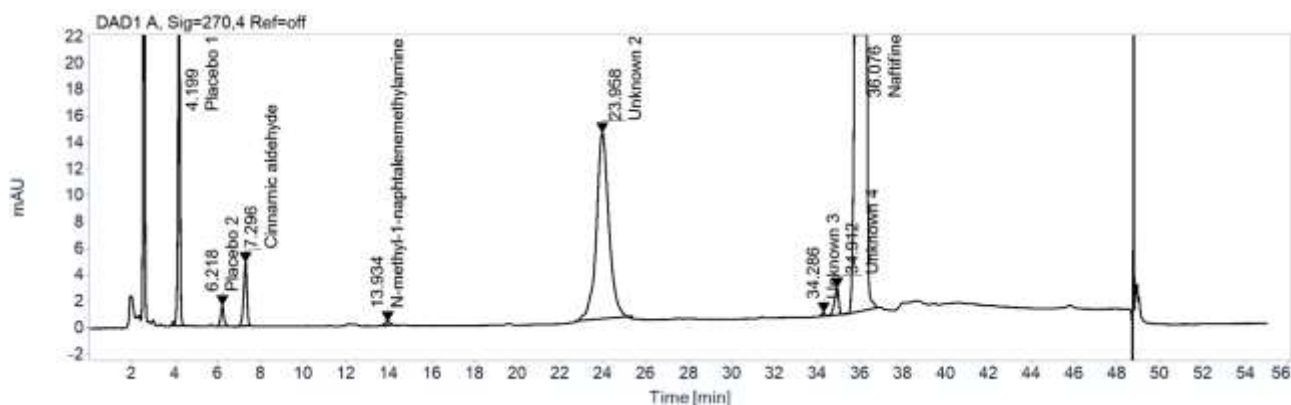


Рисунок 4.17 – Типова хроматограма ЛЗ Естезифін крем 1 % після впливу 9 % розчину перекису водню

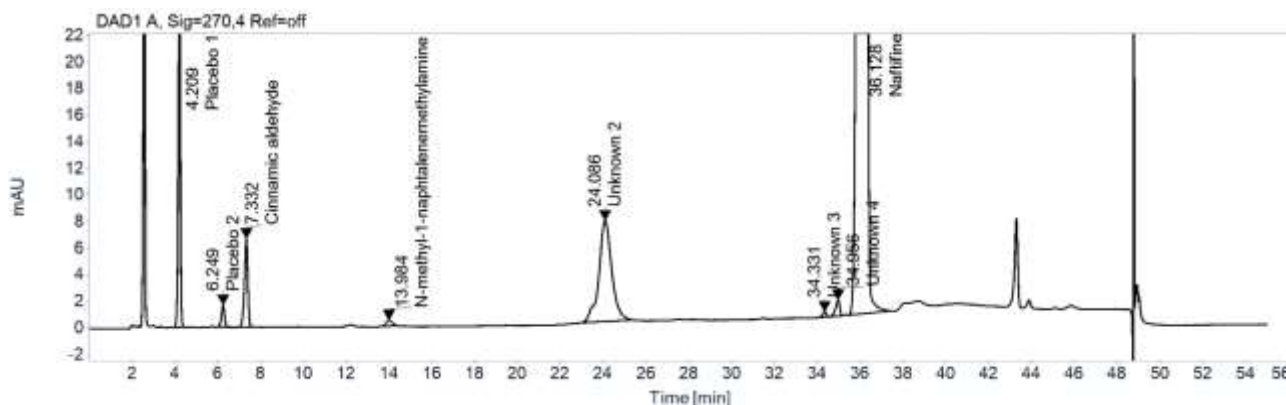


Рисунок 4.18 – Типова хроматограма ЛЗ Екзодерил крем 1 % після впливу 9 % розчину перекису водню

Результати дослідження впливу окисного навантаження на профіль супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду у досліджуваних лікарських засобах узагальнено в таблиці 4.30.

Таблиця 4.30 – Вплив окисного навантаження на профіль домішок нафтифіну гідрохлориду

Аналіт	Естезифін крем 1 %		Екзодерил крем 1 %	
	До дії фактору	Після дії фактору	До дії фактору	Після дії фактору
ЦА	0,07	0,12	0,13	0,16
N-M-1-HMA	0,08	0,07	0,18	0,13
RRT 0,26	0,04	НМД	НМД	НМД
RRT 0,68	НМД	4,16	НМД	2,27
RRT 0,96	0,01	0,02	НМД	0,04
RRT 0,97	0,04	0,21	0,02	0,12
RRT 1,11	0,02	НМД	НМД	НМД
RRT 0,26	0,273	4,587	0,365	2,715
НГХ, %	100,45	95,63	99,40	96,18

Після дії перекису водню на хроматограмах спостерігалось утворення нових продуктів деградації та суттєве збільшення сумарного вмісту домішок. Найбільш виражені зміни були пов'язані з появою додаткового піка з відносним часом утримування близько 0,68 відносно піка нафтифіну гідрохлориду, а також зі збільшенням вмісту неідентифікованих домішок. Одночасно відзначалося зниження вмісту діючої речовини, що підтверджує перебіг процесів окисної деградації.

Для всіх досліджуваних умов значення факторів чистоти піка залишалися в межах встановлених критеріїв прийнятності, а масовий баланс становив близько 100 %, що свідчить про селективність розробленої методики та можливість достовірного визначення як основної речовини, так і продуктів її деградації.

Отримані результати показали, що нафтифіну гідрохлорид є стійким за досліджуваних умов кислотного, лужного, термічного та світлового навантаження, проте є чутливим до дії окисників. Встановлені профілі деградації були використані під час розробки та підтвердження селективності ВЕРХ-методики визначення супровідних домішок у кремі та розчині нафтифіну гідрохлориду [79, 119]

Висновки до розділу 4:

1. Розроблено та валідовано ВЕРХ-методику кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду у лікарських формах крему та розчину. Підібрані умови пробопідготовки та хроматографування забезпечують специфічне визначення нафтифіну гідрохлориду з урахуванням відмінностей матриць досліджуваних лікарських форм.

2. Розроблено та валідовано ВЕРХ-методику визначення супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду у кремі та розчині. За результатами оптимізації обрано хроматографічні умови, що забезпечують належне розділення нафтифіну гідрохлориду та його супровідних домішок і придатність методики для контролю якості обох лікарських форм.

3. Досліджено деградаційну поведінку нафтифіну гідрохлориду за впливу стресових факторів та встановлено профілі утворення продуктів деградації. Отримані результати використано під час розробки методики контролю супровідних домішок та підтвердженні її специфічності.

4. Розроблені та валідовані методики кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду та контролю супровідних домішок у кремі та розчині запропоновано для практичного застосування в АТ «Фармак»; наразі триває процедура їх впровадження.

Результати досліджень, що наведені у розділі 4, опубліковано у наукових працях автора [66, 79, 110, 111, 112, 119].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішено актуальне науково-практичне завдання, що полягає у розробці, оптимізації та валідації сучасних методик контролю якості багатокомпонентних лікарських засобів і лікарських форм зі складною матрицею, а також у впровадженні принципів «зеленої» аналітичної хімії при їх розробці. За результатами проведених досліджень зроблено такі висновки:

1. Проведено системний аналіз сучасних літературних джерел та вимог провідних фармакопей і настанов ІСН щодо контролю якості багатокомпонентних лікарських засобів та препаратів зі складною матрицею. Встановлено, що існуючі аналітичні методики характеризуються значною тривалістю аналізу, високою витратою органічних розчинників та не завжди забезпечують належне розділення аналітів і супровідних домішок, що обґрунтовує необхідність розробки нових підходів до аналітичного контролю.

2. Оптимізовано та валідовано комплекс ВЕРХ-методик контролю якості комбінованого лікарського засобу, що містить парацетамол, фенілефрину гідрохлорид і феніраміну малеат. Розроблено методику їх одночасного кількісного визначення із загальним часом аналізу до 10 хв, методику випробування «Однорідність дозованих одиниць» із використанням уніфікованих хроматографічних умов та методику визначення супровідної домішки парацетамолу – 4-амінофенолу. Оптимізація умов аналізу дозволила скоротити сумарну тривалість аналітичного контролю з 1206 до 570 хв, тобто на 52,7 %.

3. Розроблено та валідовано ВЕРХ-методику кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду та контролю його супровідних домішок у лікарських формах розчину та крему. Для кількісного визначення оптимізовано умови

пробопідготовки та хроматографування, що дозволило скоротити кондиціонування колонки з 240 до 30 хв, час аналізу з 10 до 6 хв і швидкість потоку з 2,0 до 1,0 мл/хв порівняно з методикою USP. Для визначення супровідних домішок встановлено вплив рН буферного розчину, стаціонарної фази та розчинника на селективність і стабільність компонентів; обґрунтовано використання Synergi Hydro-RP та ацетонітрилу.

4. Проведено дослідження профілів деградації нафтифіну гідрохлориду за умов кислотного, лужного, термічного, фотолітичного та окисного навантаження. Встановлено високу стабільність нафтифіну гідрохлориду під впливом кислотного, лужного, термічного та світлового факторів, тоді як окисне навантаження призводить до утворення специфічних продуктів деградації та суттєвого збільшення сумарного вмісту домішок. Отримані результати підтвердили селективність розробленої методики.

5. Підтверджено відповідність розроблених методик вимогам ICH Q2(R2) за показниками специфічності, лінійності, правильності, прецизійності, чутливості та робастності. Для методики визначення 4-амінофенолу забезпечено кількісне визначення домішки на рівні 0,02 % при нормативному обмеженні 0,1 %. Екологічність методик оцінено за допомогою інструментів AGREE та MoGAPI. Для методики кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду значення AGREE становило 0,79, а показник MoGAPI збільшився з 64 (USP) до 82 після оптимізації, що свідчить про покращення екологічного профілю методики завдяки скороченню часу аналізу, витрати рухомої фази та кількості відходів.

6. Практичне значення одержаних результатів підтверджено впровадженням розроблених аналітичних методик у діяльність АТ «Фармак». Впроваджено методики кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату, а також визначення 4-амінофенолу у комбінованому лікарському засобі. Розроблені методики кількісного

визначення нафтифіну гідрохлориду та контролю його супровідних домішок у лікарських формах розчину та крему перебувають на етапі впровадження у практичну діяльність АТ «Фармак».

ДЕКЛАРАЦІЯ ЩОДО ВИКОРИСТАННЯ ШТУЧНОГО ІНТЕЛЕКТУ

Розкриття факту делегування завдань генеративному ШІ

Автори заявляють про використання генеративного ШІ у процесі дослідження та підготовки рукопису. Відповідно до таксономії GAIDeT (2025), наведені нижче завдання були делеговані інструментам генеративного ШІ за повного людського нагляду:

- Пошук і систематизація літератури
- Візуалізація
- Вичитування та редагування
- Переклад
- Реформатування

Використаний інструмент генеративного ШІ: ChatGPT (OpenAI).

Повну відповідальність за фінальний рукопис несуть автори.

Інструменти генеративного ШІ не зазначаються як автори та не несуть відповідальності за кінцеві результати.

Декларацію подала: Олександра Гавриленко

Додаткова примітка: Штучний інтелект використовувався як допоміжний інструмент під час підготовки дисертаційної роботи для пошуку та систематизації наукової літератури, мовного і стилістичного редагування, переформулювання та структурування окремих фрагментів тексту, перекладу, а також створення однієї ілюстрації (рис. 2.1). Відібрані літературні джерела та бібліографічні дані перевірялися автором за першоджерелами. Усі підготовлені або опрацьовані із застосуванням ШІ матеріали були критично оцінені, перевірені та за необхідності відредаговані автором. Штучний інтелект не використовувався для проведення експериментальних досліджень, отримання та статистичної обробки первинних експериментальних даних. Розробка й оптимізація аналітичних методик, інтерпретація

експериментальних результатів та формулювання наукових висновків здійснювалися автором на основі отриманих експериментальних даних. Автор несе повну відповідальність за зміст дисертаційної роботи, достовірність наведених даних та отримані наукові результати.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Analytical Procedure Development. Q14, Geneva: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 2023. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q14_Guideline_2023_1116.pdf.
2. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Pharmaceutical Development. Q8(R2), Geneva: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 2009. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q8%28R2%29%20Guideline.pdf>.
3. Deidda R, Orlandini S, Hubert P, Hubert C . Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. J Pharm Biomed Anal. 2018;161:110-121. doi: 10.1016/j.jpba.2018.07.050.
4. Mehta M, Mehta D, Mashru R. Recent application of green analytical chemistry: eco-friendly approaches for pharmaceutical analysis. Future J Pharm Sci. 2024;10:83. doi: 10.1186/s43094-024-00658-6.
5. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures. Q2(R2), Geneva: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 2023. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_1130.pdf.
6. Wyszeccka-Kaszuba E, Warowna-Grześkiewicz M, Fijałek Z. Determination of 4-aminophenol impurities in multicomponent analgesic preparations by HPLC with amperometric detection. J Pharm Biomed Anal. 2003;32(4-5):1081-1086. doi: 10.1016/s0731-7085(03)00212-7.

7. Bloomfield M. A sensitive and rapid assay for 4-aminophenol in paracetamol drug and tablet formulation, by flow injection analysis with spectrophotometric detection. *Talanta*. 2002;58(6):1301-1310. doi: 10.1016/s0039-9140(02)00421-6.
8. Monser L, Darghouth F. Simultaneous LC determination of paracetamol and related compounds in pharmaceutical formulations using a carbon-based column. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;27(6):851-860. doi: 10.1016/s0731-7085(01)00515-5.
9. Jin X, Imran M, Mohammed Y. Topical Semisolid Products – Understanding the Impact of Metamorphosis on Skin Penetration and Physicochemical Properties. *Pharmaceutics*. 2022;14(11):2487. doi: 10.3390/pharmaceutics14112487.
10. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Impurities in New Drug Substances. Q3A(R2), Geneva: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 2006. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf>.
11. Shinde KS, Jangme CM, Patil AR. RP-HPLC method for quantitative estimation of naftifine hydrochloride in formulated products: development and validation. *J Appl Pharm Res*. 2025;13(4):177-186. doi: 10.69857/joapr.v13i4.1115.
12. Eccles R, Fietze I, Rose U-B. Rationale for Treatment of Common Cold and Flu with Multi-Ingredient Combination Products for Multi-Symptom Relief in Adults. *Open J Respir Dis*. 2014;4(3):73-82. doi: 10.4236/ojrd.2014.43011.
13. Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A, Scott KF. The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology*. 2013;21(3):201-232. doi: 10.1007/s10787-013-0172-x.

14. European Pharmacopoeia. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). 2024. Available from: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition..>
15. PubChem. Acetaminophen. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1983> (accessed 29 August 2026).
16. McGill MR, Jaeschke H. Metabolism and Disposition of Acetaminophen: Recent Advances in Relation to Hepatotoxicity and Diagnosis. *Pharm Res.* 2013;30(9):2174-2187. doi: 10.1007/s11095-013-1007-6.
17. Hatton RC, Winterstein AG, McKelvey RP, Shuster J, Hendeles L. Ambulatory Care: Efficacy and Safety of Oral Phenylephrine: Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Pharmacother.* 2007;41(3):381-390. doi: 10.1345/aph.1H679.
18. PubChem. Phenylephrine Hydrochloride. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284443> (accessed 29 August 2026).
19. Gaglia CA. Phenylephrine Hydrochloride. In: *Analytical Profiles of Drug Substances.* Elsevier; 1974. pp. 483-512.
20. Bindra S, Bose K, Thekkantavida AC, Grace Thomas Parambi D, Alsahli TG, Pant M, et al. FDA-approved drugs containing dimethylamine pharmacophore: a review of the last 50 years. *RSC Adv.* 2024;14(38):27657-27696. doi: 10.1039/d4ra04730c.
21. PubChem. Pheniramine Maleate. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282139> (accessed 29 August 2026).
22. Halstead GW. Determination of Amine Ingredients in Cough-Cold Liquids by Reversed-Phase Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography. *J Pharm Sci.* 1982;71(10):1108-1112. doi: 10.1002/jps.2600711007.
23. Deconinck E, Sacré PY, Baudewyns S, Courselle P, De Beer J. A fast ultra high pressure liquid chromatographic method for qualification and quantification of pharmaceutical combination preparations containing paracetamol, acetyl

- salicylic acid and/or antihistaminics. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;56(2):200-209. doi: 10.1016/j.jpba.2011.05.013.
24. Gupta AK, Ryder JE, Cooper EA. Naftifine: A Review. *J Cutan Med Surg.* 2008;12(2):51-58. doi: 10.2310/7750.2008.06009.
 25. Hammoudi Halat D, Younes S, Mourad N, Rahal M. Allylamines, Benzylamines, and Fungal Cell Permeability: A Review of Mechanistic Effects and Usefulness against Fungal Pathogens. *Membranes.* 2022;12(12):1171. doi: 10.3390/membranes12121171.
 26. PubChem. Naftifine Hydrochloride. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281098> (accessed 29 August 2026).
 27. United States Pharmacopeia and National Formulary. United States Pharmacopeial Convention. Rockville, MD; 2024. Available from: <https://online.uspnf.com/uspnf> (accessed 29 August 2026).
 28. Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing, China: China Medical Science Press, 2020.
 29. Herbig ME, Evers D-H, Gorissen S, Köllmer M. Rational Design of Topical Semi-Solid Dosage Forms-How Far Are We? *Pharmaceutics.* 2023;15(7):1822. doi: 10.3390/pharmaceutics15071822.
 30. General Chapter <1225> Validation of Compendial Procedures. In: United States Pharmacopeia and National Formulary. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2024. Available from: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-E2C6F9E8-EA71-4B72-A7BA-76ABD5E72964_4_en-US?source=Search%20Results&highlight=1225 (accessed 29 August 2026).
 31. General Chapter <1220> Analytical Procedure Lifecycle. In: United States Pharmacopeia and National Formulary. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2024. Available from: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-35D7E47E-65E5-49B7-

B4CC-4D96FA230821_2_en-

US?source=Search%20Results&highlight=1220 (accessed August 2026).

32. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Stability Testing of New Drug Substances and Products. Q1A(R2), Geneva: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29%20Guideline.pdf> (2003).
33. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Photostability Testing of New Drug Substances and Products. Q1B, Geneva: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 1996. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1B%20Guideline.pdf>.
34. General Chapter <621> Chromatography. In: United States Pharmacopeia and National Formulary. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2024. Available from: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-6C3DF8B8-D12E-4253-A0E7-6855670CDB7B_10_en-US?source=Search%20Results&highlight=621 (accessed 29 August 2026).
35. Huang T, Chen N, Wang D, Lai Y, Cao Z . A validated stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of pheniramine maleate and naphazoline hydrochloride in pharmaceutical formulations. Chem Cent J. 2014;8(1):7. doi: 10.1186/1752-153X-8-7.
36. Mehmood Y, Saleem N, Mahmood RK, Riaz H, Raza SA. Analytical Method Development and Validation of Pheniramine Maleate Injection. Int J Drug Dev Res. 2016;8(1):44-48.
37. Kirkpatrick D, Fain M, Yang J, Santos L, Anthony C. UHPLC assay and impurity methods for diphenhydramine and phenylephrine hydrochloride oral solution. Sep Sci PLUS. 2020;3(1-2):4-11. doi: 10.1002/sscp.201900084.

38. Al-Shaalan NH. Determination of phenylephrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in binary mixture using chemometric-assisted spectrophotometric and high-performance liquid chromatographic-UV methods. *J Saudi Chem Soc.* 2010;14(1):15-21. doi: 10.1016/j.jscs.2009.12.004
39. Zahoor A, Munir H, Junaid R, Hussain S, Naveed S, Alam MO, et al. A RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Chlorpheniramine Maleate, Paracetamol and Phenylephrine Hydrochloride in Bulk. *RADS J Pharm Pharm Sci.* 2018;6(1):53-58.
40. Yadav OM, Jain HK. RP-HPLC Method Development and Validation for Simultaneous Estimation of Phenylephrine Hydrochloride and Ebastine in Tablet Dosage Form. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014;6(8):466-470.
41. Kumari AS, Padmaja V, Swapna G, Prasanthi M. HPLC Quantitative Resolution of Acetaminophen, Dextromethorphan Hydrobromide, and Phenylephrine Hydrochloride in Powder Dosage Form by Chemometric Analysis Method. *Indo Glob J Pharm Sci.* 2020;10(01):73-78. doi: 10.35652/IGJPS.2020.10110.
42. Shukla A. Method Development And Validation Of Rp-Hplc Method For Simultaneous Estimation Of Paracetamol, Phenylephrine Hydrochloride And Triprolidine Hydrochloride In Bulk And Combined Tablets Dosage Forms. *World J Pharm Res.* 2017;483-492. doi: 10.20959/wjpr20179-9097.
43. Heydari R. A New HPLC Method for the Simultaneous Determination of Acetaminophen, Phenylephrine, Dextromethorphan and Chlorpheniramine in Pharmaceutical Formulations. *Anal Lett.* 2008;41(6):965-976. doi: 10.1080/00032710801978137.
44. Calinescu O, Badea IA, Vladescu L, Meltzer V, Pincu E. HPLC Separation of Acetaminophen and its Impurities Using A Mixed-mode Reversed-Phase/Cation Exchange Stationary Phase. *J Chromatogr Sci.* 2012;50(4):335-342. doi: 10.1093/chromsci/bmr043.

45. Bhimavarapu R, Chitra KP, Meda H, Kanikanti D, Anne M, Gowthami N, et al. Forced Degradation Study of Paracetamol in Tablet Formulation Using RP-HPLC. *Bull Pharm Res.* 2011;1:13-17.
46. Badr Eldin A, Ismaiel OA, Hassan W, Shalaby A. Comparison of FT-NIR Transmission and HPLC for Green Approach to Determine Paracetamol and Its Degradation Product 4-Aminophenol in Paracetamol Tablets. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2015;7(7):384-389.
47. Bhaskarrav NM. RP-HPLC Method Development and Validation for the Analysis of Pharmaceutical Drugs. *Int J Sci Res IJSR.* 2016;5:2093-2095. doi: 10.21275/V5I3.NOV162367.
48. Meruva SK, Shanmugapandiyan P. RP-HPLC-PDA method for the simultaneous determination of Phenylephrine, Chlorpheniramine, Paracetamol and Dextromethorphan in bulk and marketed formulation. *J Pharm Res.* 2017;11:306-312.
49. Akay C, Değim İT, Sayal A, Aydın A, Özkan Y, Gül H. Rapid and Simultaneous Determination of Acetylsalicylic Acid, Paracetamol, and Their Degradation and Toxic Impurity Products by HPLC in Pharmaceutical Dosage Forms. *Turk J Med Sci.* 2008;38(2):167-173.
50. Phazna Devi TA, Setti A, Srikanth S, Nallapeta S, Pawar SC, Rao JV. Method development and validation of paracetamol drug by RP-HPLC. *J Med Allied Sci.* 2013;3(1):8-14.
51. Senyuva H, Ozden T. Simultaneous High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Paracetamol, Phenylephrine HCl, and Chlorpheniramine Maleate in Pharmaceutical Dosage Forms. *J Chromatogr Sci.* 2002;40(2):97-100. doi: 10.1093/chromsci/40.2.97.
52. Samadi-Maybodi A, Hassani Nejad-Darzi SK. Simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride and chlorpheniramine maleate in pharmaceutical preparations using multivariate calibration 1. *Spectrochim Acta*

- A Mol Biomol Spectrosc. 2010;75(4):1270-1274. doi: 10.1016/j.saa.2009.12.048.
53. EL-Gindy A, Hadad GM. Chemometrics in Pharmaceutical Analysis: An Introduction, Review, and Future Perspectives. J AOAC Int. 2012;95(3):609-623. doi: 10.5740/jaoacint.sge_el-gindy.
 54. Marín A, García E, García A, Barbas C. Validation of a HPLC quantification of acetaminophen, phenylephrine and chlorpheniramine in pharmaceutical formulations: capsules and sachets. J Pharm Biomed Anal. 2002;29(4):701-714. doi: 10.1016/s0731-7085(02)00124-3.
 55. Pirol O, Sukuroglu M, Ozden T. Simultaneous Determination of Paracetamol, Phenylephrine Hydrochloride, Oxolamine Citrate and Chlorpheniramine Maleate by HPLC in Pharmaceutical Dosage Forms. J Chem. 2011;8(3):1275-1279. doi: 10.1155/2011/454325.
 56. Sridevi S, Vijayakumar R, Nalini CN. Method Development and Validation for the Simultaneous Estimation of Ascorbic acid, Phenylephrine HCl, Paracetamol and Levocetirizine HCl using RP-HPLC. Res J Pharm Technol. 2020;13(4):1911-1916. doi: 10.5958/0974-360X.2020.00344.3.
 57. Acheampong A, Gyasi WO, Darko G, Apau J, Addai-Arhin S. Validated RP-HPLC method for simultaneous determination and quantification of chlorpheniramine maleate, paracetamol and caffeine in tablet formulation. SpringerPlus. 2016;5:625. doi: 10.1186/s40064-016-2241-2.
 58. Dewani AP, Barik BB, Chipade VD, Bakalb RL, Chandewarb AV, Kanungo SK. RP-HPLC-DAD method for the determination of phenylephrine, paracetamol, caffeine and chlorpheniramine in bulk and marketed formulation. Arab J Chem. 2014;7(5):811-816. doi: 10.1016/j.arabjc.2012.07.010.
 59. Dong MW. HPLC and UHPLC for practicing scientists. Second ed. Hoboken, NJ: Wiley; 2019. 416 p.

60. LoBrutto R, Kazakevich Y (eds). HPLC for pharmaceutical scientists. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience; 2007. Epub ahead of print 2007. doi: 10.1002/0470087951.
61. Meyer VR. Practical High-Performance Liquid Chromatography. 5th ed. New York: John Wiley & Sons, Incorporated; 2010. 432 p.
62. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to modern liquid chromatography. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ; 2010. 912 p.
63. Тригубчак ОВ. Теоретичне та експериментальне обґрунтування створення і дослідження комбінованих твердих лікарських форм [дисертація] Київ: Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика; 2021. 372 с.
64. Zhang AY, Camp WL, Elewski BE. Advances in Topical and Systemic Antifungals. *Dermatol Clin.* 2007;25(2):165-183. doi: 10.1016/j.det.2007.01.002.
65. Sahni K, Singh S, Dogra S. Newer topical treatments in skin and nail dermatophyte infections. *Indian Dermatol Online J.* 2018;9(3):149. doi: 10.4103/idoj.IDOJ_281_17.
66. Havrylenko O, Kondratova Y, Typlynska K, Logoyda L. Development and validation of HPLC methods for the quantitative determination and related impurities of naftifine hydrochloride in solution and cream dosage forms. *Sci Pharm.* 2026;94(1):5. doi: 10.3390/scipharm94010005.
67. Gokhale VM, Kulkarni VM. Understanding the antifungal activity of terbinafine analogues using quantitative structure–activity relationship (qsar) models. *Bioorg Med Chem.* 2000;8(10):2487-2499. doi: 10.1016/s0968-0896(00)00178-4.
68. Patel MM, Patel HD. Development And Validation Of RP-HPLC Method For Simultaneous Estimation Of Terbinafine Hydrochloride And Mometasone Furoate In Combined Dosage Form. *J Chil Chem Soc.* 2016;61(2):2958-2962. doi: 10.4067/S0717-97072016000200021.

69. Patel KK. A Validated RP-HPLC Method for Determination of Terbinafine Hydrochloride in Pharmaceutical Solid Dosage Form. *Int J Pharm Technol.* 2012;4(3):4663-4669.
70. Matyssová L, Solich P, Marek P, Havlíková L, Nováková L, Sícha J. Separation and determination of terbinafine and its four impurities of similar structure using simple RP-HPLC method. *Talanta.* 2006;68(3):713-720. doi: 10.1016/j.talanta.2005.05.013.
71. Misro L, Boini T, Maurya R, Radhakrishnan T, Rohith KS, Kumar V, et al. Analytical method development and validation for simultaneous estimation of seven markers in polyherbal formulation JKC by using RP-HPLC. *Future J Pharm Sci.* 2024;10:92.
72. Chaudhari PR, Patil JK, Jain VH, Pawar SP. Development and Validation of the UV-Spectrophotometric and RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Itraconazole and Terbinafine Hydrochloride in Bulk and in Formulation. *World J Pharm Pharm Sci.* 2019;8(7):675-702. doi: 10.20959/wjpps20197-14076.
73. Ryder NS. Squalene epoxidase as the target of antifungal allylamines. *Pestic Sci.* 1987;21:281-288. <https://doi.org/10.1002/ps.2780210405>.
74. Birnbaum JE. Pharmacology of the allylamines. *J Am Acad Dermatol.* 1990;23(4 Pt 2):782-785. doi: 10.1016/0190-9622(90)70288-s.
75. Cardoso SG, Schapoval EES. High-performance liquid chromatographic assay of terbinafine hydrochloride in tablets and creams. *J Pharm Biomed Anal.* 1999;19(5):809-812. doi: 10.1016/s0731-7085(98)00119-8.
76. Dewani AP, Bakal RL, Kokate PG, Chandewar AV, Patra S. Development of a Single Ion Pair HPLC Method for Analysis of Terbinafine, Ofloxacin, Ornidazole, Clobetasol, and Two Preservatives in a Cream Formulation: Application to In Vitro Drug Release in Topical Simulated Media-Phosphate Buffer Through Rat Skin. *J AOAC Int.* 2015;98(4):913-920. doi: 10.5740/jaoacint.14-189.

77. Bhosale DM, Nikalje APG. Stability-Indicating UPLC Method for the Estimation of Nadifloxacin, Terbinafine Hydrochloride, Mometasone Furoate, Methyl Paraben, and Propyl Paraben in Topical Pharmaceutical Dosage Form. *J AOAC Int.* 2017;100(5):1407-1413. doi: 10.5740/jaoacint.16-0254.
78. Separovic L, Lourenço FR. Measurement uncertainty evaluation of an analytical procedure for determination of terbinafine hydrochloride in creams by HPLC and optimization strategies using Analytical Quality by Design. *Microchem J.* 2022;178:107386. doi: 10.1016/j.microc.2022.107386.
79. Гавриленко ОВ, Логойда ЛС. Вивчення впливу стресових факторів на стабільність нафтифіну гідрохлориду у кремовій лікарській формі як частина розробки аналітичної методики контролю домішок. *Медична та клінічна хімія.* 2025;27(4):55-63. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2025.i4.15922.
80. Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal Chem.* 2013;50:78-84. doi: 10.1016/j.trac.2013.04.010.
81. Jankech T, Gerhardtova I, Stefanik O, Chalova P, Jampilek J, Majerova P, et al. Current green capillary electrophoresis and liquid chromatography methods for analysis of pharmaceutical and biomedical samples (2019–2023) – A review. *Anal Chim Acta.* 2024;1323:342889. doi: 10.1016/j.aca.2024.342889.
82. Gałuszka A, Migaszewski ZM, Konieczka P, Namieśnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC Trends Anal Chem.* 2012;37:61-72. doi: 10.1016/j.trac.2012.03.013.
83. Patil SD, Karode SR, Kolate NR, Korde TM. Recent approaches in green liquid chromatography for pharmaceutical analysis: A comprehensive review on green analytical sustainable chemistry. *Sustain Chem One World.* 2025;6:100069. doi: 10.1016/j.scowo.2025.100069.

84. Shaaban H. New insights into liquid chromatography for more eco-friendly analysis of pharmaceuticals. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(25):6929-6944. doi: 10.1007/s00216-016-9726-2.
85. Yabré M, Ferey L, Somé IT, Gaudin K. Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis. *Molecules.* 2018;23(5):1065. doi: 10.3390/molecules23051065.
86. Ahmed M, Abdullah, Eiman E, Al-Ahmary KM, Aftab F, Sohail A, et al. Advances in green liquid chromatography for pharmaceutical analysis: A comprehensive review on analytical greenness to sustainable chemistry approaches. *Microchem J.* 2024;205:111400. doi: 10.1016/j.microc.2024.111400.
87. Rahman MU, Akram H, Saeed M, Adams E. Green Analytical Techniques for Impurity Determination in Pharmaceuticals. *Electrophoresis.* 2026;47(1):87-105. doi: 10.1002/elps.70062.
88. Armenta S, Garrigues S, De La Guardia M. Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends Anal Chem.* 2008;27(6):497-511. doi: 10.1016/j.trac.2008.05.003.
89. Tobiszewski M, Marć M, Gałuszka A, Namieśnik J. Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry. *Molecules* 2015;20(6):10928-10946. doi: 10.3390/molecules200610928.
90. Płotka-Wasyłka J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta.* 2018;181:204-209. doi: 10.1016/j.talanta.2018.01.013.
91. Pena-Pereira F, Wojnowski W, Tobiszewski M. AGREE–Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Anal Chem.* 2020;92(14):10076-10082. doi: 10.1021/acs.analchem.0c01887.
92. Mansour FR, Płotka-Wasyłka J, Locatelli M. Modified GAPI (MoGAPI) Tool and Software for the Assessment of Method Greenness: Case Studies and Applications. *Analytica.* 2024;5(3):451-457. doi: 10.3390/analytica5030030.

93. Yin L, Yu L, Guo Y, Wang C, Ge Y, Zheng X, et al. Green analytical chemistry metrics for evaluating the greenness of analytical procedures. *J Pharm Anal.* 2024;14(11):101013. doi: 10.1016/j.jpha.2024.101013.
94. Havrylenko O, Kondratova Y, Ivanets L, Berdey I, Logoyda L. Optimization of HPLC methods for the development of quality control methods of combined powder formulations with paracetamol, phenylephrine hydrochloride, pheniramine maleate. *BMC Chemistry.* 2025;19(1):145. doi: 10.1186/s13065-025-01488-0.
95. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Quality Risk Management. Q9(R1), Geneva: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 2023. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q9%28R1%29_Guideline_Step4_2025_0115_0.pdf.
96. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Pharmaceutical Quality System. Q10, Geneva: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 2008. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q10%20Guideline.pdf>.
97. Ahuja S, Jespersen ND (eds). *Modern instrumental analysis*. 1st edition. Amsterdam Oxford: Elsevier; 2006. 897 p.
98. Ermer J, McB. Miller JH (eds). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. 1st edn. Wiley. Epub ahead of print 26 January 2005. doi: 10.1002/3527604685.
99. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». *Державна Фармакопея України*. 2-е вид. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»; 2020. Доступно на: <https://sphu.org/napryamky-diyalnosti/viddil-dfu/dfu-2-0>

100. Agilent Technologies. ZORBAX StableBond SB-Aq Columns. Technical Report, Agilent Technologies. Available from: <https://www.agilent.com/Library/quickreference/Public/newproductupdate.pdf>.
101. Havrylenko O, Kondratova Y, Logoyda L. Optimization of analytical methodologies for the quantitative determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, pheniramine maleate and 4-aminophenol in powder. In: Abstracts of the 20th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry; 2025 April 03-05; Ioannina, Greece. Ioannina; 2025. p. 70.
102. Ermer J, Ploss H-J. Validation in pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;37(5):859-870. doi: 10.1016/j.jpba.2004.06.018.
103. Гавриленко О. Оптимізація аналітичних методик кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів та супровідних домішок у багатокомпонентному лікарському засобі. В: Матеріали XII науково-практичної конференції Наука, інновації та якість в сучасному фармацевтичному виробництві школи молодих науковців АТ "Фармак"; 2024 листоп. 28-29; Київ. Київ; 2024. с. 46.
104. Leung AK, Lam JM, Leong KF, Hon KL. Tinea corporis: an updated review. *Drugs Context.* 2020;9:2020-5-6. doi: 10.7573/dic.2020-5-6.
105. Gupta AK, Stec N, Summerbell RC, Shear NH, Piguet V, Tosti A, et al. Onychomycosis: a review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020;34(9):1972-1990. doi: 10.1111/jdv.16394.
106. Gupta A, Foley K. Antifungal Treatment for Pityriasis Versicolor. *J Fungi.* 2015;1(1):13-29. doi: 10.3390/jof1010013.
107. Elewski BE, Tosti A. Risk Factors and Comorbidities for Onychomycosis: Implications for Treatment with Topical Therapy. *J Clin Aesthetic Dermatol.* 2015;8(11):38-42.

108. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *The Lancet*. 2002;359(9312):1135-1144. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08162-X.
109. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Impurities in New Drug Products. Q3B(R2), Geneva: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 2006. Available from: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf>.
110. Гавриленко О. Підходи до розробки аналітичних методик для контролю нафтифіну гідрохлориду у лікарських формах розчину та крему. В: Матеріали XXIX конгресу студентів та молодих учених Майбутнє за наукою; 2025 квіт. 9-11; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2025. с. 370.
111. Гавриленко О. Розробка нової аналітичної стратегії контролю супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду після невдалої валідації. В: Матеріали Міжнародної internet-конференції Modern Chemistry of Medicines; 2025 листоп. 7; Харків. Харків; 2025. с. 96.
112. Гавриленко ОВ, Кондратова ЮА, Логойда ЛС. Виклики при валідації аналітичної методики контролю супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду у лікарських формах розчину та крему: вибір хроматографічної колонки. В: Матеріали LXVIII підсумкової науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2025 черв. 12-13; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2025. с. 210.
113. Blessy M, Patel RD, Prajapati PN, Agrawal YK. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review. *J Pharm Anal*. 2014;4(3):159-165. doi: 10.1016/j.jpha.2013.09.003.
114. Bakshi M, Singh S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review. *J Pharm Biomed Anal*. 2002;28(6):1011-1040. doi: 10.1016/s0731-7085(02)00047-x.

115. Reynolds DW, Facchine KL, Mullaney JF, Alsante KM. Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies. *Pharm Technol.* 2002;26(2):48-56.
116. Waterman KC, Adami RC. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *Int J Pharm.* 2005;293(1-2):101-125. doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.12.013.
117. Ngwa G. Forced degradation studies as an integral part of HPLC stability-indicating method development. *Drug Deliv Technol.* 2010;10:56-59.
118. Carstensen JT, Rhodes CT, eds. *Drug stability: principles and practices*. 3. ed., rev.expanded. New York, NY: Marcel Dekker; 2000. 792 p.
119. Гавриленко О. Вивчення профілю домішок та деградаційної поведінки нафтифіну гідрохлориду в кремні Естезифін, 1 %. В: Матеріали XIII науково-практичної конференції з міжнародною участю школи молодих науковців АТ «Фармак» Наука, інновації та якість в сучасному фармацевтичному виробництві, присвяченої 100-річчю компанії Фармак; 2025 листоп. 20-21; Київ. Київ; 2025. с. 195-196.
120. АТ «Фармак». Естезифін® 1 % крем. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу. 2025. Доступно на: <https://farmak.ua/drugs/estezyfin-krem/> (accessed 29 August 2026).
121. Sandoz GmbH. Екзодерил® 1 % крем. Інструкція для медичного застосування лікарського засобу. 2025. Доступно на: <https://compendium.com.ua/dec/555156> (accessed 29 August 2026).

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача:

1. Havrylenko O, Kondratova Y, Ivanets L, Berdey I, Logoyda L. Optimization of HPLC methods for the development of quality control methods of combined powder formulations with paracetamol, phenylephrine hydrochloride, pheniramine maleate. BMC Chemistry. 2025;19(1):145. doi: 10.1186/s13065-025-01488-0. (SCOPUS, Q2).
2. Гавриленко ОВ, Логойда ЛС. Вивчення впливу стресових факторів на стабільність нафтифіну гідрохлориду у кремовій лікарській формі як частина розробки аналітичної методики контролю домішок. Медична та клінічна хімія. 2025;27(4):55-63. doi: 10.11603/mcch.2410-681X.2025.i4.15922.
3. Havrylenko O, Kondratova Y, Typlynska K, Logoyda L. Development and validation of HPLC methods for the quantitative determination and related impurities of naftifine hydrochloride in solution and cream dosage forms. Sci Pharm. 2026;94(1):5. doi: 10.3390/scipharm94010005. (SCOPUS, Q2).
4. Гавриленко О. Оптимізація аналітичних методик кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів та супровідних домішок у багатокомпонентному лікарському засобі. В: Матеріали XII науково-практичної конференції Наука, інновації та якість в сучасному фармацевтичному виробництві школи молодих науковців АТ «Фармак»; 2024 листоп. 28-29; Київ. Київ; 2024. с. 46.
5. Havrylenko O, Kondratova Y, Logoyda L. Optimization of analytical methodologies for the quantitative determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, pheniramine maleate and 4-aminophenol in powder. In: Abstracts of the 20th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry; 2025 April 03-05; Ioannina, Greece. Ioannina; 2025. p. 70.
6. Гавриленко О. Підходи до розробки аналітичних методик для контролю нафтифіну гідрохлориду у лікарських формах розчину та крему. В:

Матеріали XXIX конгресу студентів та молодих учених Майбутнє за наукою; 2025 квіт. 9-11; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2025. с. 370.

7. Гавриленко ОВ, Кондратова ЮА, Логойда ЛС. Виклики при валідації аналітичної методики контролю супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду у лікарських формах розчину та крему: вибір хроматографічної колонки. В: Матеріали LXVIII підсумкової науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2025 черв. 12-13; Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига; 2025. с. 210.

8. Гавриленко О. Вивчення профілю домішок та деградаційної поведінки нафтифіну гідрохлориду в кремі Естезифін, 1 %. В: Матеріали XIII науково-практичної конференції з міжнародною участю школи молодих науковців АТ «Фармак» Наука, інновації та якість в сучасному фармацевтичному виробництві, присвяченої 100-річчю компанії Farmak; 2025 листоп. 20-21; Київ. Київ; 2025. с. 195-196.

9. Гавриленко О. Розробка нової аналітичної стратегії контролю супровідних домішок нафтифіну гідрохлориду після невдалої валідації. В: Матеріали Міжнародної internet-конференції Modern Chemistry of Medicines; 2025 листоп. 7; Харків. Харків; 2025. с. 96.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації:

- XII науково-практична конференція «Школа молодих науковців АТ «Фармак» (м. Київ 28-29 листопада 2024 року) – *усна доповідь та публікація*;
- 20th Hellenic Symposium on Medicinal Chemistry (Ioannina, Greece, 03-05 April 2025) – *постерна доповідь та публікація*;
- XXIX конгрес студентів та молодих учених «Майбутнє за наукою» (м. Тернопіль, 09-11 квітня 2025 року) – *усна доповідь та публікація*;
- LXVIII підсумкова науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 12-13 червня 2025 року) – *постерна доповідь та публікація*;
- Міжнародна internet-конференція «Modern Chemistry of Medicines» (м. Харків, 7 листопада 2025 року) – *публікація*;
- XIII науково-практична конференція з міжнародною участю «Наука, інновації та якість в сучасному фармацевтичному виробництві» (м. Київ 20-21 листопада 2025 року) – *усна доповідь та публікація*;
- LXIX підсумкова науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 11-12 червня 2026 року) – *публікація*.

ДОДАТОК В.1



«10» _____ 2026 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка та оптимізація аналітичних методик кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду та феніраміну малеату, а також визначення 4-амінофенолу як супровідної домішки парацетамолу у комбінованому лікарському засобі у формі порошку для орального розчину.
2. **Установа, автори:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Гавриленко О. В., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
1. Havrylenko O., Kondratova Y., Ivanets L., Berdey I., Logoyda L. Optimization of HPLC methods for the development of quality control methods of combined powder formulations with paracetamol, phenylephrine hydrochloride, pheniramine maleate // BMC Chemistry. - 2025. - Vol. 19, 145.
4. **Ефективність впровадження:** Розроблені та оптимізовані високоефективні рідинно-хроматографічні методики забезпечують селективне, точне та відтворюване визначення діючих речовин і супровідної домішки у комбінованому лікарському засобі та можуть бути використані для рутинного контролю якості у фармацевтичному виробництві.
5. **Термін впровадження:** 01.06.2026-10.07.2026 р.
6. **Новизна результатів науково-технічної розробки:** Розроблено та оптимізовано ВЕРХ-методики одночасного кількісного визначення парацетамолу, фенілефрину гідрохлориду, феніраміну малеату та супровідної домішки парацетамолу 4-амінофенолу у комбінованому лікарському засобі у формі порошку для орального розчину. Розроблені методики придатні для впровадження у практику фармацевтичного аналізу та рутинного контролю якості лікарських засобів.

«10» _____ 2026 р.

Відповідальний за впровадження:

Гавриленко О. В.
July

ДОДАТОК В.2



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Розробка аналітичних методик кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду та його супровідних домішок у лікарських засобах у формі розчину, спрею та крему.
2. **Установа, автори:** Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1, кафедра фармацевтичної хімії, Гавриленко О. В., д.фарм.н., професор Логойда Л. С.
3. **Джерела інформації:**
 1. Havrylenko O., Kondratova Y., Typlynska K., Logoyda L. Development and validation of HPLC methods for the quantitative determination and related impurities of naftifine hydrochloride in solution and cream dosage forms // *Sci. Pharm.* – 2026. – 94, 5.
4. **Ефективність впровадження:** Розроблені високоефективні рідинно-хроматографічні методики забезпечують селективне, точне та відтворюване визначення нафтифіну гідрохлориду та його супровідних домішок у лікарських засобах різних лікарських форм і можуть бути використані для рутинного контролю якості у фармацевтичному виробництві.
5. **Термін впровадження:** 01.06.2026-10.07.2026 р.
6. **Новизна результатів науково-технічної розробки:** Розроблено ВЕРХ-методики кількісного визначення нафтифіну гідрохлориду та його супровідних домішок у лікарських засобах у формі розчину та крему. Розроблені методики придатні для впровадження у практику фармацевтичного аналізу та рутинного контролю якості лікарських засобів.

« 10 » _____ 2026 р.

Відповідальний за впровадження:

Гавриленко О. В.
Логойда Л. С.