

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Національний фармацевтичний університет
Міністерство охорони здоров'я України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Чорний Василь Анатолійович

УДК 543.544.5.068.7:543.544.3:001.891:615.451.3

ДИСЕРТАЦІЯ

**Розробка методик контролю якості лікарських препаратів з Бензидаміну
гідрохлоридом з позицій "зеленої хімії"**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук

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

_____ В. А. Чорний

Науковий керівник Георгіянец Вікторія Акопівна, доктор фармацевтичних наук,
професор

Харків – 2021

АНОТАЦІЯ

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

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

Дисертація присвячена розробці та валідації аналітичних методик контролю якості оромукозних препаратів на основі бензидаміну гідрохлориду за принципами та підходами «зеленої хімії».

Аналіз ринку України та стран ЄС демонструє, що все більш поширеною лікарською формою оромукозного призначення стають горлові спреї. Саме горлові спреї наразі найбільш поширені для лікування хвороб горла, ротової порожнини. Популярність спреїв не є дивною з умови простоти використання, зручності транспортування та зберігання.

Сучасні вимоги контролю якості також прогресують та змінюються відповідно до гармонізації з Європейським та Американським регуляторними органами. Це вимагає збільшення аналітичного ресурсу контрольних лабораторій, збільшення кількості аналізів та, відповідно, до збільшення продуктів життєдіяльності лабораторій, що зумовлює потенційний зріст проблем навколишнього середовища. Тому гармонізація регуляторних вимог агенцій з підходами «зеленої хімії» наразі є сучасним викликом для світової фармацевтичної індустрії.

Розробка «дерева рішень» була виконана на основі оцінки ступеня використання органічних сполук та розчинників різними аналітичними методами, а також безпосередньою здатністю цих методів до одночасного визначення декількох аналітів, тобто до «вбудованої селективності» аналітичних методів.

Для розробки методики на супровідні домішки бензидаміну гідрохлориду у оромукозному спреї було використано метод рідинної хроматографії, як найбільш ефективну техніку розділення споріднених речовин.

Для розділення підбрали та запропонували хроматографічну колонку Grace Altima C18. У якості рухомої фази було підбрано буферний розчин на основі перхлорату натрію, з рН 3.0, та триетиламіном у якості іонпарної добавки.

Для визначення потенційних продуктів деградації було проведено стрес-тести лікарського засобу. Основний продукт деградації – бензидамін N-оксид було встановлено за допомогою мас-спектрометричного визначення в тандемі з ВЕРХ. Було встановлено вимоги до специфікації методики, її чутливості та критеріїв прийнятності.

Валідаційні характеристики методу було обрано та досліджено з урахуванням вимог ІСН Q2. Специфічність методики доведено відсутністю інтерференції піків плацебо, потенційних домішок АФІ або продуктів деградації, а також фактором чистоти піку бензидаміну в різних умовах стрес-випробувань.

Характеристики лінійності, прецезійності, точності та робастності вивчені відповідно до заданих критеріїв та знаходяться у їх межах.

Розробку методики одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену було проведено згідно подальшої імплементації підходу зеленої хімії.

Згідно запропанованого дерева рішень, одночасне визначення показників якості декількох аналізуємих речовин розглядається як перевага методу та являє собою підхід удосконалення методів контролю. Для одночасного визначення обох компонентів використовували метод ВЕРХ.

Для детектування бензидаміну та метилпарабену використовували довжини хвиль 320 та 254 нм, враховуючи різні довжини хвиль поглинання речовин. У якості рухомої фази було обрано суміш ацетонітрил-буфер з рН 3.0, який складався з перхлорату натрію, перхлорної кислоти та триетиламіну.

Специфічність методики була доведена відсутністю впливу піків плацебо на досліджувані компоненти, а також відсутністю впливу між бензидаміном та

метилпарабеном. Коефіцієнт кореляції лінії регресії R^2 для обох аналітів становив більше 0,999. Було встановлено вимоги до критеріїв придатності хроматографічної системи.

Робасність методу тестували шляхом незначної варіації параметрів методу, а саме, швидкості потоку, та рН рухомої фази.

При розробці методики одночасного визначення бензидаміну та метилпарабену методом газової хроматографії оцінювали можливість елюювання обох аналітів одночасно на газохроматографічній колонці. Для цього необхідно було вирішити задачу переводу бензидаміна гідрохлориду в основу для зниження температури кипіння. У якості екстрагента використовували слабо полярний хлороформ. У якості внутрішнього стандарту використовували домішку А бензидаміну, яка не є продуктом можливого розкладу молекули та відповідно не буде змінювати свою концентрацію в ході пробопідготовки.

Параметри градієнта методу були підібрані таким чином, щоб одночасно визначати обидва компоненти.

Для розробки методики визначення залишкових кількостей АФІ на поверхні обладнання було використано метод абсорбційної спектрофотометрії. До уваги бралися максимально допустимі кількості АФІ, які можуть бути перенесені до іншого препарату в ході технологічного процесу за рахунок крос-контамінації.

Було визначено, що максимальна допустима кількість бензидаміну гідрохлориду на поверхні обладнання має складати не більше 10 ppm. Визначення залишків АФІ запропоновано проводити за довжини хвилі 310 нм, оскільки це довжина хвилі, де спостерігається максимум поглинання за заданої концентрації.

Специфічність методики доводили відсутністю впливу плацебо на сигнал шуканої речовини. Коефіцієнт кореляції при визначенні лінійності методу склав 0,999. Коефіцієнт варіації визначення не перевищував 1%.

Для посилення антибактеріальної дії оромукозного спрею на основі бензидаміну нами було запропоновано введення ефірної олії до складу препарату. Скринінг олії проводили, вивчаючи ефективність антимікробної дії препаратів з

різними складами олій. Тестували ефірну олію лаванди, м'яти перечної та евкалипту. Було показано що найкращу ефективність проявляє ефірна олія м'яти.

Для кількісного визначення компонентів запропонованого препарату з ефірною олією м'яти було розглянуто можливість подальшої імплементації підходу «зеленої хімії», який дозволив би проводити одночасне визначення АФІ, консерванту та маркерного компонента ефірної олії.

За основу було взято розроблену нами методику одночасного визначення бензидаміну та метилпарабену методом газової хроматографії. У якості маркерного компонента ефірної олії м'яти було обрано ментол. Визначення проводили на газовому хроматографі після попередньої екстракції препарату хлороформом.

Температурний градієнт забезпечив елюювання усіх компонентів препарату упродовж однієї інжекції.

Розрахунок кількісного вмісту компонентів проводили через відношення до внутрішнього стандарту.

Було показано достатнє розділення усіх аналітів від компонентів матриці препарату. Лінійність вивчалась окремо для кожної визначаємої речовини. Коефіцієнт лінійності для трьох визначаємих компонентів становив більше 0,999. Правильність та відтворюваність кількісного визначення були встановлені. RSD% для усіх компонентів не перевищував 0,25% для п'яти паралельних інжекцій. Надійність процедури вивчали шляхом варіювання параметрів методу, а саме початкової температури, швидкості рухомої фази та об'єму проби.

Запропоновані методики визначення бензидаміну та метилпарабену впроваджені на АТ «Фармак» у внутрішню специфікацію для контролю готової лікарської форми.

Ключові слова:

ВЕРХ, бензидаміну гідрохлорид, зелена хімія, газова хроматографія.

Список публікацій здобувача

1. Cherniy V.A., Gureeva S.N., Georgiyants V.A. Development and validation of alternative analytical method for determination of related substances of benzydamine hydrochloride in oral spray by HPLC. *Pharmaceutical Sciences and Technology*. 2016. Vol. 1, № 5. P. 25–33.
2. Чорний В. А., Георгіянц В. А. Розмір частинок оромукозних спреїв як основний параметр, що визначає якість і характеристики продукції. Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. – 2017. – Вип. 28. – С. 140–147
3. Chorny V., Kushniruk, V., Georgiyants V. Design and implementation of green chemistry approaches into pharmaceutical analysis of benzydamine dosage forms. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2019. №5(21). P. 12-17.
4. Chorny V.A., Georgiyants V.A., Gureyeva S.N., Chorna O.V. Simultaneous determination of benzydamine hydrochloride, methylparaben and peppermint oil in a spray dosage form by gas chromatography. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019. Vol. 11, № 6. P. 147–153.
5. Черный В.А., Георгиянц В.А., Черная О.В., Журавель И.А., Ибадуллаева Г.С. Валидация методики определения остаточного количества бензидамина на поверхности технологического оборудования. *Фармация Казахстана*. 2019. №4(25). С. 25–28.
6. Chorny V., Georgiyants V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben in benzydamine dosage form by GC. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2019. Vol.6, № 1. P. 28–35.
7. Chorny V., O Chorna., Georgiyants V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben in dosage form by HPLC. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2020. №3(25). P. 12–18.
8. Пат. України на корисну модель № 14283. «Спосіб ідентифікації бензидаміну та його метаболіту в присутності деяких протизапальних

- нестероїдних препаратів» № и 2020 00615; заявл. 03.02.2020 р.; опубл. 25.06.2020 р., Бюл. № 12.
9. Черный В. А., Гуреева С. Н., Георгиянц В. А. Разработка и валидация методики определения сопутствующих примесей бензидамина гидрохлорида методом ВЭЖХ с использованием диодно-матричного детектирования. *Аналітична хімія у фармації* : матеріали II міжнар. наук.-практ. Інтернет-конф., м. Харків, 17 берез. 2016 р. – Х. : Вид-во НФаУ, 2016. – С. 85–86.
 10. Черный В. А., Пономарева Ю. Н., Черная О. В., Георгиянц В. А. Разработка методики одновременного количественного определения бензидамина гидрохлорида и метилпарабена в готовой лекарственной форме методом ВЭЖХ с применением принципов зеленой химии. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи* : матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України, м. Харків, 13-16 верес. 2016 р. – Х., 2016. – Т. 1. – С. 213.
 11. Черный В. А., Гончарова Ю. Н., Черная О. В., Георгиянц В. А. Разработка методики одновременного количественного определения бензидамина гидрохлорида и метилпарабена в готовой лекарственной форме методом газовой хроматографии. *Управління якістю в фармації* : матеріали XI наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 19 трав. 2017 р. – Х., 2017. – С. 177.
 12. Черный В. А., Георгиянц В. А., Черная О. В. Методология определения вымываемых веществ из элементов первичной упаковки в готовых лекарственных средствах. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології* : зб. наук. пр. – Х. : Вид-во НФаУ, 2017. – Вип. 3. – С. 325–326.

ANNOTATION

Chorny V. A. Development of the quality control methods for Benzydamine hydrochloride pharmaceuticals according to “green chemistry” principles. Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of pharmaceutical sciences on a specialty 15.00.02 "Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy". - National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2021.

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

The analysis of the market of Ukraine and the EU countries shows that throat sprays are becoming an increasingly common dosage form for oromucosal use. Throat sprays are currently the most common for the treatment of diseases of the throat and mouth. The popularity of sprays is not surprising in terms of ease of use, ease of transportation and storage.

Current quality control requirements are also progressing and changing in line with harmonization with European and American regulators. This requires an increase in the analytical resource of control laboratories, an increase in the number of analyzes and, accordingly, an increase in the products of laboratory life, which leads to a potential increase in environmental problems. Therefore, the harmonization of regulatory requirements of agencies with the approaches of "green chemistry" is currently a modern challenge for the global pharmaceutical industry.

The development of the "decision tree" was performed on the basis of assessing the degree of use of organic compounds and solvents by different analytical methods, as well as the direct ability of these methods to simultaneously determine multiple analytes, ie to "built-in selectivity" of analytical methods.

To develop a method for the accompanying impurities of benzydamine hydrochloride in oromucosal spray, the method of liquid chromatography was used as the most effective technique for the separation of related substances.

A Grace Altima C18 chromatographic column was selected and offered for separation. A buffer solution based on sodium perchlorate, pH 3.0, and triethylamine as an ionic additive was selected as the mobile phase.

Drug stress tests were performed to determine potential degradation products. The main degradation product, benzydamine N-oxide, was determined by mass spectrometric determination in tandem with HPLC. Requirements were set for the specification of the methodology, its sensitivity and acceptability criteria.

The validation characteristics of the method were selected and investigated taking into account the requirements of ICH Q2. The specificity of the method is proved by the absence of interference of placebo peaks, potential API impurities or degradation products, as well as the purity factor of benzydamine peaks in different stress test conditions.

The characteristics of linearity, precision, accuracy and robustness are studied according to the given criteria and are within their limits.

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

According to the proposed decision tree, the simultaneous determination of quality indicators of several analytes is considered as an advantage of the method and is an approach to improving control methods. HPLC was used to simultaneously determine both components.

Wavelengths of 320 and 254 nm were used to detect benzydamine and methylparaben, taking into account different absorption wavelengths. A mixture of acetonitrile buffer with pH 3.0, consisting of sodium perchlorate, perchloric acid and triethylamine, was chosen as the mobile phase.

The specificity of the method was proved by the lack of effect of placebo peaks on the studied components, as well as the lack of effect between benzydamine and

methylparaben. The correlation coefficient of the regression line R² for both analytes was more than 0.999. The requirements for the criteria of suitability of the chromatographic system were established.

The robustness of the method was tested by slightly varying the parameters of the method, namely, the flow rate and pH of the mobile phase.

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

The gradient parameters of the method were selected so as to simultaneously determine both components.

The method of absorption spectrophotometry was used to develop a method for determining the residual amounts of API on the surface of the equipment. The maximum allowable amounts of API that can be transferred to another drug during the technological process due to cross-contamination were taken into account.

It was determined that the maximum allowable amount of benzydamine hydrochloride on the surface of the equipment should not exceed 10 ppm. Determination of API residues is proposed to be performed at a wavelength of 310 nm, because this is the wavelength where the maximum absorption is observed at a given concentration.

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

To enhance the antibacterial effect of oromucosal spray based on benzydamine, we proposed the introduction of essential oil into the composition of the drug. Oil screening was performed by studying the effectiveness of antimicrobial action of drugs

with different oil compositions. Lavender, peppermint and eucalyptus essential oils were tested. Peppermint essential oil has been shown to be most effective.

To quantify the components of the proposed preparation with peppermint essential oil, the possibility of further implementation of the "green chemistry" approach was considered, which would allow the simultaneous determination of API, preservative and marker component of essential oil.

The method developed by us for the simultaneous determination of benzydamine and methylparaben by gas chromatography was taken as a basis. Menthol will be chosen as a marker component of peppermint essential oil. The determination was performed on a gas chromatograph after preliminary extraction of the drug with chloroform.

The temperature gradient provided elution of all components of the drug in one injection.

The calculation of the quantitative content of the components was performed in relation to the internal standard.

Sufficient separation of all analytes from the components of the drug matrix was shown. Linearity was studied separately for each detectable substance. The coefficient of linearity for the three detectable components was more than 0.999. The correctness and reproducibility of the quantification were established. RSD% for all components does not exceed 0.25% for five parallel injections. The reliability of the procedure was studied by varying the parameters of the method, namely the initial temperature, the speed of the mobile phase and the sample volume.

The proposed methods for the determination of benzydamine and methylparaben are implemented at JSC "Farmak" in the internal specification for the control of the finished dosage form.

Keywords:

HPLC, benzydamine hydrochloride, green chemistry, gas chromatography.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ....	Помилка! Закладку не визначено.
ВСТУП	Помилка! Закладку не визначено.
РОЗДІЛ 1	СУЧАСНИЙ СТАН СТВОРЕННЯ ОРОМУКОЗНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ. БЕНЗИДАМІНУ ГІДРОХЛОРИД, СИНТЕЗ, ВЛАСТИВОСТІ, МЕТОДИ АНАЛІЗУ (Огляд літератури).....
	Помилка! Закладку не визначено.
1.1	Стан та перспективи створення оромукозних лікарських засобів
	Помилка! Закладку не визначено.
1.2	Синтез та фізико-хімічні властивості бензидаміну гідрохлориду.....
	Помилка! Закладку не визначено.
1.2.1	Схеми синтезу активної субстанції бензидаміну гідрохлориду та оцінка можливості отримання домішок в сировині
	Помилка! Закладку не визначено.
1.2.2	Фізико-хімічні властивості та спектральні характеристики бензидаміну гідрохлориду
	Помилка! Закладку не визначено.
1.3	Огляд методів аналізу бензидаміну гідрохлориду.....
	Помилка! Закладку не визначено.
1.4	Можливості «озеленення» методів визначення бензидаміну гідрохлориду
	Помилка! Закладку не визначено.
	Резюме.....
	Помилка! Закладку не визначено.
РОЗДІЛ 2	ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАГАЛЬНИХ ПІДХОДІВ ЗЕЛЕНОЇ ХІМІЇ , МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ
	Помилка! Закладку не визначено.
2.1	Обґрунтування методології досліджень.....
	Помилка! Закладку не визначено.
2.1	Об’єкти дослідження
	Помилка! Закладку не визначено.
2.2	Методи дослідження
	Помилка! Закладку не визначено.

2.2.1 Високоєфективна рідинна хроматографія **Помилка! Закладку не визначено.**

2.2.2 Газова хроматографія **Помилка! Закладку не визначено.**

2.2.3 Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області **Помилка! Закладку не визначено.**

2.2.4 Валідація методик. **Помилка! Закладку не визначено.** 5

Висновки до розділу 2 **Помилка! Закладку не визначено.**

РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ЯКОСТІ
ОРОМУКОЗНОГО СПРЕЮ БЕНЗИДАМІНУ
ГІДРОХЛОРИДУ **Помилка! Закладку не визначено.** 8

3.1 Розробка та валідація методики визначення супровідних домішок **Помилка! Закладку не визначено.**

3.2 Розробка та валідація методики кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом ВЕРХ **Помилка! Закладку не визначено.**

3.3 Розробка та валідація методики кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом газової хроматографії **Помилка! Закладку не визначено.**

3.4 Розробка методики визначення залишкових кількостей бензидаміну на поверхні технологічного обладнання **Помилка! Закладку не визначено.**

3.5 Ідентифікація Бензидаміну та його метаболіту **Помилка! Закладку не визначено.**

Висновки до розділу 3 **Помилка! Закладку не визначено.**

РОЗДІЛ 4 ДОСЛІДЖЕННЯ З РОЗРОБКИ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЇ
КОМБІНОВАНОГО СПРЕЮ ОРОМУКОЗНОГО З
БЕНЗИДАМІНУ ГІДРОХЛОРИДОМ **Помилка! Закладку не визначено.**

4.1 Вибір ефірної олії та постачальника **Помилка! Закладку не визначено.**

4.1.1 Мікробіологічні дослідження модельних сумішей спрею бензидаміну з різними ефірними оліями. **Помилка! Закладку не визначено.**

4.1.2 Дослідження ефірних олій різних постачальників **Помилка! Закладку не визначено.**

4.2 Розробка методика одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та ментолу в комбінованій лікарській формі..... **Помилка! Закладку не визначено.**

Висновки до розділу 4 **Помилка! Закладку не визначено.**

ВИСНОВКИ **Помилка! Закладку не визначено.**

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 158

ДОДАТКИ **Помилка! Закладку не визначено.**

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт.

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я.

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія.

ГХ – газова хроматографія.

ДФУ – Державна Фармакопея України.

ЛЗ – лікарський засіб.

ЛФ – лікарська форма.

НПЗП – нестероїдні протизапальні препарати.

ОФ ВЕРХ – обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія.

УВЕРХ – ультрависокоефективна рідинна хроматографія.

ФР – фармацевтична розробка.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Розширення фармацевтичної галузі у світі є реальністю сьогодення, яка ґрунтується на щоденних викликах і зростаючій потребі у лікарських засобах. Це означає зростання конкуренції на ринку виробництва препаратів та субстанцій, а як результат конкуренції – збільшення вимог до якості препаратів. Підвищення вимог відбивається на кількості експериментів, які проводяться під час фармацевтичної розробки та рутинного контролю при виробництві. Внаслідок цього збільшуються ризики негативного впливу виробництва лікарських засобів на навколишнє середовище та виробничий персонал, що є причиною стурбованості підприємств «великої фарми».

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

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

Сучасні підходи до фармацевтичної розробки передбачають імплементацію концепції «Quality by design», що забезпечує не тільки коректні методики

стандартизації з точки зору забезпечення якості лікарських засобів, але й урахування сучасних вимог до цих методик з точки зору «зеленої хімії».

На фармацевтичному ринку України однією з відносно нових, але при цьому ефективних, є лікарська форма оромукозні спреї, які наразі є вельми популярними і на ринках країн ЄС. Фармацевтична розробка оромукозних спреїв, що містять бензидаміну гідрохлорид, включена до плану наукових досліджень ПАТ «Фармак». Оскільки стратегія розвитку підприємства є екоспрямованою, логічно, що і як власно виробництво, так і аналіз субстанцій та лікарських форм мають бути максимально «зеленими». З цієї точки зору актуальною задачею наукового дослідження визначено формулювання підходів та розробку методик контролю якості лікарських форм з бензидаміну гідрохлоридом.

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

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

Мета і завдання дослідження

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

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- провести моніторинг сучасного ринку препаратів на основі бензидаміну гідрохлориду, здійснити аналіз літературних даних щодо методів їх аналізу та оцінити їх з точки зору «зеленої хімії»;
- сформулювати підходи щодо вибору методик контролю якості бензидаміну гідрохлориду з урахуванням принципів «зеленої хімії»;

- розробити методику визначення супровідних домішок бензидаміну гідрохлориду в готовій лікарській формі;
- розробити методику ідентифікації бензидаміну гідрохлориду та його метаболіту в присутності інших НПЗЗ для цілей судово-хімічного аналізу;
- розробити методику визначення залишкових кількостей бензидаміну гідрохлориду на поверхні технологічного обладнання;
- розробити методики одночасного кількісного визначення АФІ та допоміжних речовин, що відповідатиме вимогам «зеленої хімії»;
- за результатами досліджень щодо вибору ефірної олії для посилення антимікробної дії бензидаміну гідрохлориду запропонувати склад комбінованої лікарської форми;
- дослідити якість ефірної олії різних виробників на вміст основного маркера з метою вибору постачальника для комбінованої лікарської форми;
- обґрунтувати та розробити методику одночасного визначення АФІ та допоміжних речовин в комбінованій лікарській формі.

Об'єкт дослідження.

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

Предмет дослідження.

Розробка та валідація методик контролю якості лікарських засобів з бензидаміну гідрохлоридом – оромукозного спрею, розчину, комбінованого лікарського засобу, розробка методики визначення залишкових кількостей бензидаміну гідрохлориду на поверхні технологічного обладнання, обґрунтування використання підходів «зеленої хімії» у фармацевтичній розробці та рутинному аналізі лікарських препаратів з бензидаміну гідрохлоридом.

Методи дослідження

Для реалізації проекту та вирішення поставлених завдань було використано методи високоефективної рідинної хроматографії, газової хроматографії та УФ спектрофотометрії, а також процедура валідації методів за вимогами ДФУ та ІСН Q2.

Наукова новизна одержаних результатів

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

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

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

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

Практичне значення отриманих результатів

За результатами проведених досліджень теоретично обґрунтовано «дерево рішень», що має практичне значення як алгоритм для вибору «зелених» методик контролю якості при фармацевтичній розробці.

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

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

Особистий внесок здобувача

Дисертаційна робота є самостійною науковою завершеною працею. Постановка мети та методологія досліджень сформульовані разом з науковим керівником.

Наукові роботи опубліковані у співавторстві з В. А. Георгіянц, С. М. Гурєвою, О. В. Чорною, І. О. Журавель, Г. С. Абдуллаєвою, О. В. Чубенко, В. М. Кушнірук, Ю. М. Гончаровою. Співавторами наукових праць є науковий керівник та науковці, спільно з якими проведені дослідження. За результатами досліджень, над якими працювали співавтори наукових публікацій, особисто дисертантом проведено інформаційний пошук та аналіз літературних даних за темою дисертації, аналіз стану українського ринку бензидаміну гідрохлориду; розроблено підхід до вибору методів аналізу препарату на основі бензидаміну гідрохлориду з точки зору «зеленої хімії»; розроблено та валідовано методику визначення супровідних домішок бензидаміну гідрохлориду в готовій лікарській формі методом ВЕРХ; розроблено та валідовано методику кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом ВЕРХ; розроблено та валідовано методику визначення залишкових кількостей бензидаміну на поверхні технологічного обладнання; розроблено та валідовано методику кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом газової хроматографії; здійснено аналізу ефірних олій м'яти перцевої різних виробників на вміст ментолу; розроблено та валідовано методику одночасного визначення

бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену і ментолу в оромукозній лікарській формі.

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

Апробація результатів дисертації

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

Публікації

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

Обсяг і структура дисертації

Дисертаційна робота викладена на 185 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, 4 розділів, загальних висновків, списку використаних джерел та 3 додатків. Робота ілюстрована 41 таблицею та 37 рисунками. Список використаних джерел містить 172 найменування.

РОЗДІЛ 1
СУЧАСНИЙ СТАН СТВОРЕННЯ ОРОМУКОЗНИХ ЛІКАРСЬКИХ
ЗАСОБІВ. БЕНЗИДАМІНУ ГІДРОХЛОРИД, СИНТЕЗ, ВЛАСТИВОСТІ,
МЕТОДИ АНАЛІЗУ
(Огляд літератури)

1.1 Стан та перспективи створення оромукозних лікарських засобів

Розробка нових лікарських засобів (ЛЗ) для місцевого застосування залишається однією з головних задач сучасної фармацевтичної промисловості.

На теперішній час така лікарська форма (ЛФ) як оромукозні ЛЗ є однією з найбільш популярних та розповсюджених форм введення ліків при запальних процесах ротової порожнини. Основною перевагою та відмінністю від інших форм є наявність насос-дозатору, який створює повітряно-крапельний струмінь за рахунок механічного натискання на насос-дозатор [1–3].

Згідно ДФУ оромукозні лікарські препарати (*Praeparationes buccales*) – це тверді, м'які або рідкі ЛФ, що вводяться у порожнину рота чи горла з метою виявлення місцевої чи системної дії. Окрему роль серед оромукозних ЛЗ відіграють оромукозні розчини або спреї – рідкі лікарські препарати, які призначені для застосування у порожнині рота за допомогою підходящого аплікатора [4].

Дана ЛФ має цілий ряд переваг, таких як:

- швидкий терапевтичний ефект;
- підвищення фармакологічної активності за рахунок диспергування лікарської речовини;
- високий ступінь проникнення на слизові оболонки рота;
- швидке всмоктування, виключення негативного впливу травного тракту на діючу речовину;
- герметичність;

- точність дозування;
- безболісність;
- зручність і швидкість застосування;
- простота і економічність виробництва [5, 6].

Для виконання свого функціонального призначення ЛЗ повинен бути якісним, безпечним та ефективним на всіх етапах його життєвого циклу, він повинен бути розроблений, вироблений і проконтрольований у відповідності з існуючими вимогами [7–9].

У зв'язку з цим, при створенні складу рідких ЛФ, таких як оромукозні розчини та спреї, велика увага приділяється правильному підбору діючих і допоміжних речовин, розробці раціональної технології та умов зберігання, завдяки яким можливо забезпечити необхідний терапевтичний ефект [8, 10].

За результатами маркетингових досліджень встановлено, що сектор оромукозних спреїв на ринку України досить низький (близько 3%) і представлений, в основному, ЛЗ зарубіжного виробництва [10].

Аналіз асортименту лікарських засобів у вигляді спреїв, які випускаються на сьогоднішній день за кордоном, показав, що вони використовуються в основному для лікування запальних і алергічних захворювань носу, порожнини рота і глотки, при інфекційних і грибкових пошкодженнях шкіри. Засоби для лікування захворювань носа і горла займають близько 70% серед зареєстрованих засобів, що говорить про недостатню фармакотерапевтичну широту асортименту спреїв. За кордоном йде розробка спреїв системної дії: гормональних засобів, імуномодулюючих засобів на основі амінокислот, нестероїдних протизапальних засобів і противірусних засобів [12, 13].

Гострі запальні захворювання ротоглотки займають провідну позицію за зверненнями за лікарською допомогою серед всіх вікових категорій. Вони характеризуються поліетіологічністю, можливістю формування мікст-інфекції бактеріальних збудників з респіраторними вірусами [14].

Оскільки більшість запальних процесів у горлі не бактеріального походження, деякі міжнародні органи охорони здоров'я не рекомендують застосування антибіотиків для первинного лікування. Унаслідок переважно вірусного походження болю у горлі антибіотики всього лише усувають симптоми, крім того існує ризик розвитку ускладнень, тому їх призначення для лікування болю в горлі є спірним. Клінічна дилема, пов'язана з лікуванням болю у горлі, передбачає необхідність застосування препаратів, які виправдовують очікування пацієнтів щодо швидкого полегшення болю [15–18].

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), близько 20% населення нашої планети регулярно приймають нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), при цьому переважає безконтрольне (безрецептурне) їх застосування [19].

НПЗП виробляють понад 180 фармацевтичних компаній у 37 країнах світу. Велика частина імпортованих препаратів вироблена в країнах Азії (15,0%), переважно в Індії, в країнах Західної (15,9%), Східної (12,4%) і Південної (12,0%) Європи, переважно в Німеччині, Болгарії, Італії. Ринок НПЗП переважно представлений твердими (54,8%) ЛФ, а також м'якими ЛФ (20,0%) і препаратами для ін'єкцій (15,2%). Рідкі ЛФ і капсули займають відповідно 4,4% і 4,2% ринку, спреї та аерозолі для зовнішнього застосування – 1,4% [20–22].

Відносно новим і цікавим для застосування є препарат «Тантум Верде®» (Tantum Verde, виробник Aziende Chimiche Riunite Angelini Francesco, Італія), який відноситься до групи нестероїдних протизапальних препаратів, що активно діють на ланки патогенезу запального процесу слизової оболонки порожнини рота та глотки за рахунок наявності бензидаміну гідрохлориду у його складі. Механізм протизапальної дії бензидаміну гідрохлориду полягає в інгібуванні синтезу протизапальних цитокінінів; антибактеріальної дії – у проникненні через мембрани мікроорганізмів з подальшим пошкодженням клітинних структур, порушенням метаболічних процесів та лізисом клітини; місцева знеболююча дія обумовлена структурною подібністю молекули бензидаміну з молекулою місцевого антисептика, зокрема тетракаїну [23–26].

Стоматологічні ЛЗ представлені різноманітними ЛФ. Важливими характеристиками стоматологічних ЛЗ є коефіцієнт ліквідності ціни і коефіцієнт адекватності платоспроможності. Коефіцієнт ліквідності ціни відображає ступінь конкуренції на вітчизняному ринку та певною мірою характеризує доступність препарату. Низький показник коефіцієнта адекватності платоспроможності забезпечує доступність препарату та гарантує його продаж в умовах низького платоспроможного попиту населення. Коефіцієнт ліквідності препарату Тантум Верде становить 0,32, що робить його менш доступним для споживача. Тоді як показник адекватності платоспроможності для Тантум Верде складає 5,31%, що свідчить про низьку платоспроможність населення для придбання цього препарату [34–37].

Таким чином, визначено, що в асортименті препаратів для стоматології препарати Тантум Верде займають значне місце, що може бути підставою для розробки більш доступних для споживачів вітчизняних ЛЗ на основі бензидаміну гідрохлориду.

Якість ЛФ закладається при фармацевтичній розробці (ФР), забезпечується у процесі виробництва, підтверджується методами контролю якості. Всі ці три складові повинні відповідати сучасним вимогам до ЛФ, їх виробництва і контролю. Методи контролю, що визначають рівень якості ЛФ, повинні відповідати рівню і потребам фармацевтичного виробництва. Належним чином проведена фармацевтична розробка є важливою умовою забезпечення якості, безпечності та ефективності лікарського препарату протягом усього його життєвого циклу. Існують різні підходи до проведення ФР, а саме емпіричний, систематизований («Якість шляхом розробки») або комбінований із застосуванням обох перелічених підходів [38–40].

Успішне виконання цих умов дозволить фармацевтичній промисловості розвинути конкурентоспроможне виробництво ЛЗ і зайняти гідну позицію на міжнародному ринку.

Розробка оромукозних ЛЗ у вигляді розчинів та спреїв повинна здійснюватися згідно загальним правилам та вимогам ФР [45–47].

Першим етапом ФР оромукозних ЛЗ є вивчення фізико-хімічних характеристик, показників якості, розчинності АФІ, а також визначення схильності АФІ до деструктивних перетворень, на основі чого формується стабільність препарату. Так, для діючих речовин, які у водних розчинах здатні до гідролітичних перетворень необхідне введення буферних реагентів, а для речовин схильних до окиснення – введення антиоксидантів [49–51].

Ґрунтуючись на способі застосування оромукозних ЛЗ у вигляді розчинів та спреїв, можна зробити висновок, що більшість з них використовується у якості протимікробних та антисептичних засобів, що значно впливає як на вибір, так і на терапевтичну концентрацію АФІ [52–55].

На підставі отриманих даних про фізико-хімічні та технологічні властивості АФІ у подальшому здійснюється вибір допоміжних речовин з метою стабілізації діючих речовин, отримання ЛФ відповідної якості.

Створення ефективних ЛЗ вимагає застосування широкого кола допоміжних речовин. Жоден фармацевтичний фактор не має настільки значного і складного впливу на дію препарату, як допоміжні речовини.

При проведенні формуляції оромукозних ЛЗ використовують наступні групи допоміжних речовин: антимікробні консерванти, буферні агенти, стабілізатори, солюбілізатори, згущувачі, коригенти смаку для надання приємних органолептичних властивостей ЛЗ [51, 56–58].

Ковалевською І. В. з співавт. визначений вплив допоміжних речовин на деякі властивості АФІ, такі як фармакологічна активність лікарських речовин: підсилення дії АФІ або зниження їх активності, зміна характеру дії за рахунок комплексоутворення, молекулярних реакцій, інтерференції та ін. Таким чином, допоміжні речовини дозволяють регулювати біодоступність АФІ, підвищуючи ефективність лікарської терапії. Відомо, що основним призначенням допоміжних речовин є підвищення стабільності АФІ та ЛЗ препаратів з певними органолептичними і біофармацевтичними властивостями [58].

Вибір допоміжних речовин ґрунтується насамперед на оцінці можливості функціонального призначення, вивченні фізико-хімічних властивостей допоміжних речовин, а також на сумісності їх з компонентами препарату.

На підставі отриманих даних щодо фізико-хімічних та технологічних властивостей АФІ у подальшому здійснюється вибір допоміжних речовин (ДР) з метою стабілізації та отримання ЛЗ відповідної якості [49, 57, 59]. Вибір допоміжних речовин ґрунтується насамперед на оцінці можливості функціонального призначення, вивченні фізико-хімічних властивостей допоміжних речовин, а також на сумісності їх з компонентами препарату [60].

Гудзь Н.І. зі співавт. проведено узагальнення вимог до підбору допоміжних речовин при розробці рідких ЛЗ для орального застосування, до яких також відносяться і оромукозні ЛЗ, які можуть вплинути на якість, ефективність та безпечність ЛЗ. Проведені дослідження засвідчили необхідність наукового обґрунтування введення допоміжних речовин до складу рідких ЛЗ для орального застосування, наведена схема вибору допоміжних речовин при ФР рідких ЛЗ для орального застосування показала необхідність урахування функціонального призначення допоміжних речовин, їх безпечності, виробника, віку пацієнтів, можливих побічних реакцій тощо [50].

Для запобігання гідролітичних перетворень у розчинах та з метою підтримки певного значення рН середовища використовують різні системи буферів. Наявність буфера, разом з іншими рівними умовами, також може значно впливати на проникність АФІ. Вибір буфера ґрунтується на його сумісності зі всіма інгредієнтами, гарній переносимості, відсутності негативного впливу на лікування конкретного захворювання, певній буферній ємності в необхідному інтервалі рН. Найчастіше до складу оромукозних розчинів та спреїв вводять цитратний, фосфатний, боратний буфери, а також їх комбінації [63–74].

Відомо, що буфери і регулятори рН додають до ЛЗ для покращення розчинності та підвищення стабільності АФІ. Для регулювання значення рН у рідких ЛЗ для орального застосування використовуються лимонна, яблучна, оцтова кислоти та їх натрієві солі, натрієві солі фосфатів, натрію гідроксид,

кислота хлористоводнева. Вибору буферу та його концентрації необхідно приділяти увагу з точки зору безпеки та фізико-хімічних властивостей. Наприклад, такі регулюючі речовини, як ацетати, є леткими в кислому середовищі, їх концентрація може зменшуватися протягом технологічного процесу, якщо в останньому передбачається підвищення температури [74–77].

Антиоксиданти використовують для зменшення окиснення АФІ та допоміжних речовин у готовому ЛЗ під впливом світла, підвищених температур, у присутності неорганічних речовин або домішок металів. У складі рідких ЛЗ для орального застосування використовують власне антиоксиданти, відновлюючі агенти та антиоксиданти-синергісти. Власне антиоксиданти блокують ланцюгові реакції шляхом взаємодії з вільними радикалами (бутилокситолуол); відновлюючі агенти мають нижчий окисно-відновний потенціал, ніж діюча або допоміжна речовина, яку вони захищають (кислота аскорбінова); антиоксиданти-синергісти посилюють ефекти інших антиоксидантів (динатрію едетат) [70, 74].

До складу оромукозних ЛЗ можуть входити антимікробні консерванти, які використовують для запобігання чи пригнічення росту мікрорганізмів, які можуть створювати ризик інфікування людського організму, деградацію ЛЗ. Мікроорганізми можуть розмножуватися за нормальних умов зберігання чи застосування ЛЗ пацієнтом, особливо у багатодозових ЛЗ. При виборі консервантів необхідно врахувати їх максимально допустимі концентрації [9, 57, 78].

Основними вимогами, що висуваються до антимікробних консервантів, є ефективність дії та безпечність їх застосування. Розчини, що застосовуються, мають бути максимально токсичними для мікробів і в той же час залишатися нетоксичними для організму людини. Важливою характеристикою антимікробних консервантів є спектр їхньої дії, ефективність якої визначається мікробіологічними тестами для свіжовиготовленого препарату і впродовж термінів його зберігання і застосування [79].

Вибір антимікробних консервантів є досить складним етапом, що потребує врахування одразу багатьох важливих моментів, таких як сумісність з АФІ та

іншими допоміжними речовинами, оптимальну концентрацію для забезпечення необхідної антимікробної дії, відсутність токсичної дії на організм у вибраній концентрації, стабільність, відсутність взаємодії з матеріалами первинної упаковки і матеріалами, які контактують з розчином в ході технологічного процесу [80, 81].

Найбільш розповсюдженими антимікробними консервантами, які застосовуються у виробництві оромукозних ЛЗ є парабени (метилпарабен, пропілпарабен та їх комбінації), спирти (етанол), бензоати (бензойна кислота, натрію бензоат), сорбати (калію сорбат, сорбінова кислота) [82, 83].

Оскільки оромукозні ЛЗ застосовуються у ротовій порожнині, основним розчинником для них служить вода. При проведенні формуляції оромукозних розчинів та спреїв, які містять погано розчинні у воді речовини, можливо використання солюбілізаторів – речовин, у присутності яких підвищується розчинність компонентів ЛЗ у воді [84–86].

В якості солюбілізаторів використовують багатоатомні спирти (сорбіт, ксиліт, гліцерин), гліколі (пропіленгліколь), оксиетильовані сорбітани (полісорбат 20) та ін. Крім того, слід зазначити, що особливість застосування оромукозних розчинів та спреїв, а саме те, що вони повинні знаходитися у ротовій порожнині деякий час для отримання необхідної терапевтичної дії, викликає необхідність для надання розчину певних властивостей. Для отримання необхідних властивостей розчину також використовують експієнти, які збільшують в'язкість розчину. Такими речовинами є гліцерин, полісорбат 20 та ін. [81, 82, 87–91].

Однією з важливих характеристик оромукозних ЛЗ є органолептичні характеристики ЛФ, що визначається прийнятним при вживанні смаком, запахом і кольором. Маскування неприємних смакових якостей залежить не тільки від властивостей АФІ, ступеня їх гіркоти, солоності, але також і від наявності відповідного асортименту коригентів, що володіють необхідними маскуючими властивостями. Для цього використовують традиційний арсенал підсолоджувачів, таких як фруктоза, сахароза, ксиліт, глюкоза, сорбіт ($K_{\text{сол}}=0,5$), манітол та ін. Але через низький коефіцієнт солодкості сьогодні їм на зміну вийшли підсолоджувачі,

що мають більш високий коефіцієнт солодкості, такі як сахаринат натрію, ацесульфам калію та циклакат натрію. Для маскуванню специфічного запаху як АФІ, так і допоміжних речовин застосовують ароматизатори, найбільш поширеними з яких є м'ята, апельсин, малина, банан та ін. [92–98].

Для надання визначених властивостей оромукозних розчинів використовуються не тільки ароматизатори, але і відповідні до них барвники – кольорові допоміжні речовини, що мають дрібнодисперсний стан і здатні рівномірно розподілятися по всій поверхні ЛЗ, рівномірно їх забарвлюючи [99].

В якості барвників використовують хіноліновий жовтий, патентований синій, куркумін та ін. Так, наприклад, якщо розчин має аромат м'яти, доцільно отримати розчин зеленого кольору, для цього використовують суміш барвників хінолінового жовтого та патентованого синього в певних дозах [87, 100].

Таким чином, основними підходами до розробки оромукозних розчинів та спреїв є вибір АФІ та допоміжних речовин для забезпечення стабільної ЛФ, яка гарантує можливість її застосування відповідним шляхом. Особливостями розробки оромукозних ЛЗ є всебічне вивчення властивостей як діючих, так і допоміжних речовин, технологічного процесу та використання системного підходу до вибору допоміжних речовин, який базується на вивченні їх функціонального призначення, фізико-хімічних властивостей, взаємного впливу всіх складових ЛФ, у тому числі з пакувальними матеріалами.

Останнім часом найбільш розповсюдженими при захворюванні ротової порожнини є препарати на основі бензидаміну гідрохлориду, які випускаються у різних ЛФ та у комбінаціях з іншими лікарськими речовинами.

В Україні бензидаміну гідрохлорид представлений у препаратах:

- Тантум Верде, розчин та спрей 1,5 мг / мл;
- Тантум Верде, спрей 3 мг / мл;
- Тантум Верде, льодяники 3 мг;
- Т-Септ, спрей для ротової порожнини і таблетки для розсмоктування;
- Фортеза, розчин та спрей;
- Тантум Роза, розчин вагінальний 0,1%,

- Септолететотал, в комбінації з цетилпіридинію хлоридом у формі льодяників та спрею [27, 28].

Бензидаміну гідрохлорид – нестероїдний протизапальний препарат, що також проявляє неспецифічну антибактеріальну активність. Бензидамін широко використовується в клінічній практиці для місцевого лікування запальних станів, зменшує місцеве запалення, набряк, має антиексудативну дію. Місцеве застосування бензидаміну підвищує його болезаспокійливий і протизапальний ефекти в більшій мірі, ніж місцеве застосування інших протизапальних препаратів та відноситься до групи протизапальних препаратів супресорів синтезу цитокінів, додатково має виражену знеболюючу дію [29].

При місцевому застосуванні бензидамін діє як дезінфікуючий засіб. Його ефективність при місцевому застосуванні обумовлена здатністю проникати в епітеліальний шар і досягати ефективних концентрацій у запалених тканинах. При місцевому застосуванні в рекомендованих дозах бензидамін абсорбується слизовою оболонкою, проте його концентрація в плазмі крові при цьому настільки мала, що не чинить фармакологічної дії [30–32].

За класифікаційною системою АТС, засоби для застосування у стоматології належать до групи А01А, серед яких: препарати групи А01АD – інші засоби для лікування захворювань ротової порожнини (69,89%), а саме різні засоби (67,74%); А01АВ – протимікробні препарати для місцевого лікування захворювань ротової порожнини (26,88%), а саме А01АВ6 – метронідазол, комбінації (8,6%); А01АА – засоби для профілактики карієсу (3,23%) [27, 33].

На даний момент на ринку України зареєстровано 93 торговельні назви, з них 56% складають вітчизняні ЛЗ та 44% – препарати зарубіжного виробництва.

1.2 Синтез та фізико-хімічні властивості бензидаміну гідрохлориду

З огляду на наведене вище, перспективним для України є розробка власних оромукозних засобів, що містять бензидаміну гідрохлорид. Для визначення підходів до оптимізації розробки методик контролю якості, ми проаналізували наявні в літературі відомості щодо його синтезу, фізико-хімічних властивостей, а також методів аналізу АФІ та лікарських форм.

1.2.1 Схеми синтезу активної субстанції бензидаміну гідрохлориду та оцінка можливості отримання домішок в сировині

Для визначення та специфікації супутніх домішок, слід аналізувати схему синтезу з визначенням потенційних домішок, якими зазвичай є напівпродукти або побічні продукти синтезу. Відомим способом одержання бензидаміну гідрохлориду є його синтез із метилового ефіру антранілової кислоти та бензилхлориду з наступною циклізацією, алкілуванням та очисткою (рис 1.1.) [41].

Виходячи з наведеної схеми синтезу бензидаміну гідрохлориду (I), можливими домішками субстанції можуть бути фармакопейна домішка А (3-диметиламінопропіл-2-бензиламінобензоат), домішка В (3-(1,5-дибензил-1H-індазол-3-іл)оксипропілдиметиламін) та домішка С (1-бензил-1H-індазол-3-ол), наведені на рис. 1.2. Усі специфіковані фармакопейні домішки являють собою побічні продукти та інтермедіати синтезу (рис. 1.1).

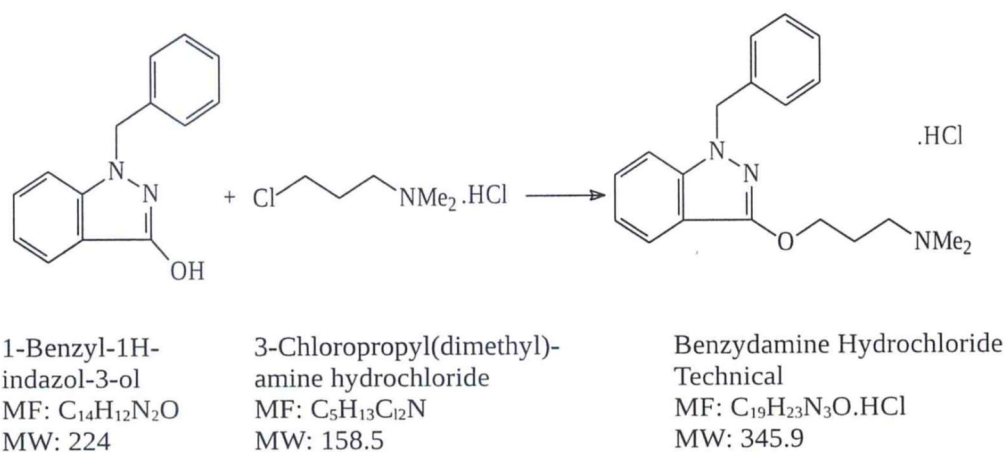
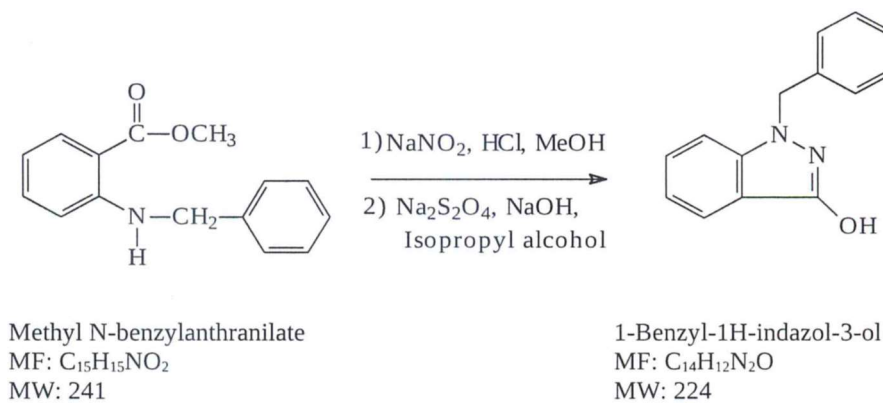
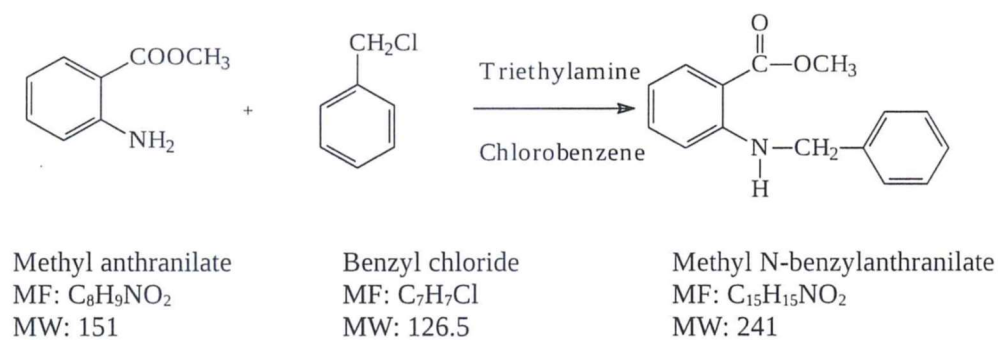


Рис. 1.1 Схема синтезу бензидаміну гідрохлориду [41]

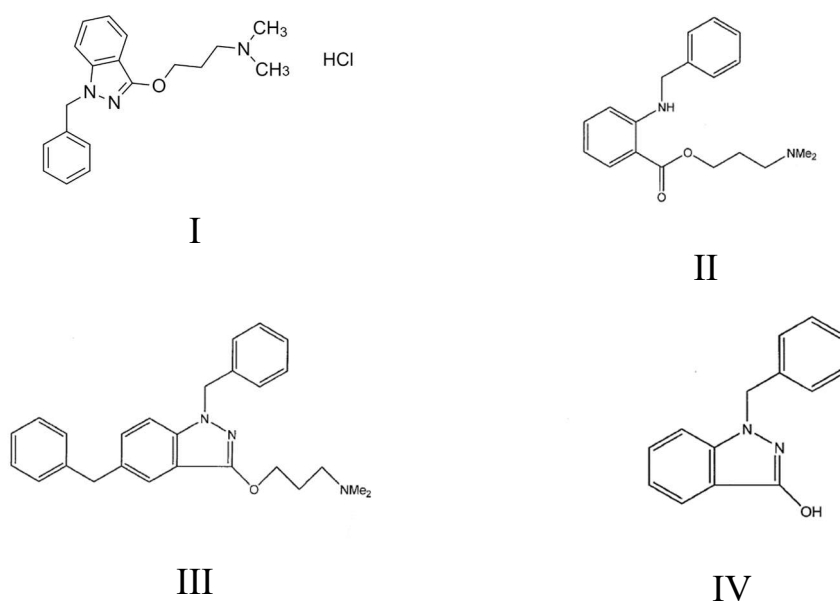


Рис. 1.2 Структура бензидаміну (I) та його домішок А (II), В (III) та С (IV)

Таким чином, під час синтезу субстанції можливе утворення домішок А, В та С, які регламентує Британська фармакопея в монографії на Бензидаміну гідрохлорид. [42].

1.2.2 Фізико-хімічні властивості та спектральні характеристики бензидаміну гідрохлориду

Важливим етапом розробки оромукозних ЛЗ на основі бензидаміну гідрохлориду є визначення структури та властивостей активного фармацевтичного інгредієнту (АФІ), а саме фізико-хімічних та фармако-технологічних характеристик АФІ, показників якості, у тому числі вміст вологи та основної діючої речовини, наявність домішок, розчинність АФІ у воді та інших розчинниках, схильність до деструктивних перетворень, що є відповідальною стадією, оскільки за її результатами формується стабільність ЛЗ.

За хімічною назвою бензидаміну гідрохлорид (I) є N,N-диметил-3-[[1-(фенілметил)-1H-індазол-3-іл]окси]-1-пропанамін (у формі гідрохлориду) [42].

Речовина являє собою білий порошок з температурою плавлення 160 °С, температурою кипіння 474,4 °С, добре розчиняється у воді та спиртах,

хлороформі, ДМСО, з молекулярною масою 345,87 [42–43]. Основа бензидаміну має $pK_a=9,26$ [44].

1.3 Огляд методів аналізу бензидаміну гідрохлориду

У сучасному фармацевтичному аналізі бензидаміну гідрохлориду, як для інших АФІ, домінуючу роль відіграє метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Цей метод дозволяє розділяти складні суміші органічних речовин з наступним детектуванням і квантифікацією. ВЕРХ – це метод розділення та аналізу сумішей речовин, в якому рухомою фазою є рідина. Найбільшу універсальність отримав метод обернено-фазової ВЕРХ (ОФ ВЕРХ), в якому розділення відбувається на неполярному сорбенті (гідрофобні силікагелі з прищепленими групами (C8, C18, CN, NH₂, Ph, Diol), а в якості рухомої фази виступає полярний органічний розчинник (метанол, ацетонітрил, тетрагідрофуран та ін.) в суміші з водою або буферним розчином. Утримування речовин пропорційно зростає із збільшенням їхньої гідрофобності. Вода має найменшу елююючу здатність, тому до рухомої фази вводять органічні розчинники для підвищення елююючої здатності системи [101–107].

Селективність рухомих фаз пов'язана зі здатністю до специфічних взаємодій з молекулами, що розділяються. Ця взаємодія залежить та визначається структурними особливостями аналітів та їхньою хімічною природою. Варіант ОФ ВЕРХ домінує серед інших варіантів рідинної хроматографії за рахунок гнучкості, оскільки варіювання складу рухомої фази дозволяє розділяти навіть сильно споріднені речовини. Цей метод дозволяє розділяти речовини різного ступеню полярності за рахунок іон-парних механізмів. Він також дозволяє аналізувати сполуки, які мають різний ступень розчинності у воді та органічних розчинниках. Використання буферних розчинів дозволяє розділяти компоненти, які мають широкий діапазон pK . [103, 107]

Нерухома фаза у хроматографії також впливає на роздільну здатність системи. Шлях обробки силікагелів призводить до варіювання властивостей сорбентів. Тому дві різні колонки з однаковою привитою фазою можуть мати різні властивості. Ступінь покриття поверхні силікагелю гідрофобним модифікатором складає приблизно 10–60%, у деяких випадках вона може досягати 90%. Наявність залишкових силанольних груп на сорбенті призводить до того, що обернено-фазовий механізм утримування може супроводжуватися адсорбційним. Для елімінування вільних силанольних груп сорбенти піддають ендкепінгу та подвійному ендкепінгу – додатково обробляють триметилхлорсиланом. Недоліком більшості обернено-фазових сорбентів на основі силікагелю є обмежений допустимий діапазон рН від 2 до 8. Але наразі наявні нові сорбенти, стабільні у більш широкому діапазоні рН (від 1,5 до 12). [105, 106].

Рухома фаза вимиває десорбовані молекули з колонки і переносить їх у детектор, який реєструє сигнал, пропорційний вмісту аналітів в рухомій фазі. Найбільш поширеними детекторами у ВЕРХ є УФ-спектрофотометричний (селективний до наявності хромофорних груп), діодно-матричний та рефрактометричний. За рахунок великого різноманіття рухомих фаз і комерційнодоступних сорбентів метод ВЕРХ слугує універсальним інструментом розділення сумішей і може застосовуватись до практично будь-яких задач, які зводяться до розділення багатокomпонентних систем [106–108].

У більшості випадків, описаних у літературі, аналітичні процедури визначення бензидаміну та його споріднених домішок базуються саме на методі ОФ ВЕРХ з використанням октадецилсилінольної фази та УФ-детектування.

Carlucci G. з співавт. приведено визначення бензидаміну і п'яти його споріднених домішок у розчині для орального застосування на колонці Gemini C18 з використанням амонійного буферу з рН 10,5. Автори наводять дані з валідації запропонованого методу [109].

У роботі [110] описане визначення бензидаміну та його основного метаболіту N-оксиду у плазмі людини з використанням флюоресцентного

детектора. Визначення проводили на різних концентраційних рівнях аналітів у випробовуваних зразках.

Відома робота [111], яка описує методику одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та хлоргексидину глюконату на колонці Nucleosil C18. У якості рухомої фази використовували фосфатний буферний розчин з рН 3,0, модифікований 40 мМ триетиламіном. Аналіз проводили з використанням внутрішнього стандарту, у якості якого виступав гідрохлортіазид. Визначення проводили з використанням спектрофотометричного детектора за довжини хвилі 230 нм. Методику валідували згідно вимог ІСН за наступними показниками: лінійність, точність, специфічність, прецезійність, робасність.

Reid E. з спіавт. наведено аналіз бензидаміну у готовій ЛФ у вигляді крему. Аналіз проводили з попереднім розчиненням зразка у водно-ацетонітрильній суміші, з подальшим центрифугуванням та хроматографуванням на колонці Novarac C18. У якості буферного розчину використовували ацетатний буфер з рН 4,0 [112].

У Британській Фармакопеї наведено методику визначення домішок у субстанції бензидаміну гідрохлориду з використанням іон-парного реагенту октилсульфонату з використанням сорбенту C18 і фосфатного буферного розчину [42].

Окрім методу рідинної хроматографії також зустрічаються інші способи визначення бензидаміну у присутності хлортіазиду та клонозепаму. Кількісне визначення проводили спектрофотометрично, денситометрично та колориметрично [113].

В роботі El-Didamony A.M. [114] пропонується простий, швидкий та чутливий спектрофотометричний метод визначення бензидаміну гідрохлориду, левамізолу гідрохлориду та мебевеїну гідрохлориду у фармацевтичних композиціях. Метод, заснований на реакції визначуваних препаратів з метиловим оранжевим у буферному водному розчині при рН 3,6. Сформовані жовті іонно-парні комплекси екстрагують дихлорметаном і кількісно вимірюють при максимумі поглинання 422 нм. Досліджено аналітичні параметри та їх вплив на

відомі системи. Екстракти інтенсивно забарвлені та стабільні при кімнатній температурі. Калібрувальні графіки були лінійними в діапазоні концентрацій 2–10 мкг / мл бензидаміну гідрохлориду, 6–24 мкг / мл левамізолу гідрохлориду та 4–14 мкг / мл мебеверіну гідрохлориду. В усіх випадках була встановлена стехіометрія реакції 1:1 та обчислена константа умовної стійкості комплексів. Запропонований метод був успішно поширений на фармацевтичні препарати – таблетки. Допоміжні речовини, що використовувались як добавки в комерційних композиціях, не заважали аналізу. Запропонована методика характеризується швидкістю, економічністю та високою специфічністю аналітичної процедури і може використовуватися для рутинного контролю якості [114].

Sharma D. з співавт. запропоновано УФ-спектрофотометричне визначення бензидаміну гідрохлориду при максимумі поглинання 305,6 нм у фосфатному буфері з рН 6,8. Методику було валідовано за показниками лінійності, точності, повторюваності, надійності, чутливості. ЛЗ піддавали впливу кислотного та лужного гідролізу, окиснення, фотолітичної та термічної деградації та аналізували зразки за допомогою запропонованого способу, щоб продемонструвати специфічність методу. Запропонований метод відповідає закону Ламберта в діапазоні концентрацій 5–50 мкг / мл з коефіцієнтом кореляції 0,999. Відносне стандартне відхилення для усіх випробуваних параметрів не перевищувало $\leq 2\%$, ніяких істотних змін в оптичній щільності після досліджень примусової деградації не спостерігалось. Запропоновану методику було визнано простою, швидкою, точною, селективною, повторюваною, економічною і надійною, яка може бути успішно застосована для визначення бензидаміну гідрохлориду в розчині та у готовій ЛФ [115].

Таким чином, аналізуючи матеріал, обговорений у даному підрозділі можна зробити висновок, що найбільш розповсюдженими методами кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду є рідинна хроматографія та УФ-спектрофотометрія.

Метод ВЕРХ має беззаперечні переваги пов'язані з селективністю та універсальністю методу. Проте необхідність використання великої кількості

органічних розчинників, а також відносна тривалість аналізу відносяться до недоліків методу. Метод УФ-спектрофотометрії можна віднести до відносно експресних методів, проте його недостатня селективність особливо у присутності інших речовин, що поглинають в УФ області відноситься до недоліків методу.

1.4 Можливості «озеленення» методів визначення бензидаміну гідрохлориду

Фармацевтичний аналіз неминує пов'язаний з використанням хімічних і зокрема органічних речовин, реактивів, розчинників, які безперечно негативно впливають на довкілля. Відповідно, зростаюча турбота суспільства про навколишнє середовище вимагає запровадження обмежень на застосування токсичних речовин, які забруднюють довкілля [116–118].

Сучасна ВЕРХ, як домінуючий метод фармацевтичного аналізу передбачає використання токсичних розчинників, таких як гексан, метанол, ацетонітрил, тетрагідрофуран та ін. Окрім того, в якості модифікаторів дуже популярними є органічні аміни, такі як триетиламін, гексиламін та ін., а також алкілсульфати та сульфонати [101, 102].

Враховуючи сучасний рівень розвитку фармацевтичної галузі та об'ємів виробництва препаратів, можна припустити, що одна лабораторія контролю якості середнього заводу використовує до 50 л органічних розчинників на день, які надалі надходять до відходів виробництва і негативно впливають на персонал лабораторії та навколишнє середовище.

Окрім негативного впливу розчинників і органічних речовин на довкілля, необхідно також підкреслити значні енерговитрати, які пов'язані з роботою обладнання. Саме тому один з принципів «зеленої хімії» є мінімізація ресурсовитрат. Перехід до експрес методик аналітичного визначення, використання мікроколонок, спектральних методів на заміну хроматографічних – головні пріоритети аналітичної хімії майбутнього [119–122]. Існує 12 базових принципів зеленої хімії:

1. Краще запобігти втратам, ніж переробляти та очищувати залишки.
2. Методи синтезу слід вибирати таким чином, щоб всі використані матеріали були максимально переведені у кінцевий продукт.
3. Методи синтезу за можливості треба обирати такі, щоб використовувані та синтезовані речовини були як можна менш шкідливими для людини та довкілля.
4. Створюючи нові хімічні продукти, необхідно намагатися зберегти ефективність праці, якої було досягнуто раніше, при цьому токсичність має зменшуватись.
5. Допоміжні речовини у виробництві, такі як розчинники або розділюючі агенти, краще не використовувати зовсім, а якщо це неможливо, їх використання має бути нешкідливим.
6. Обов'язково необхідно враховувати енергетичні витрати та їх вплив на оточуюче середовище і вартість продукту. Синтез за можливості необхідно проводити при температурі, близькій до температури оточуючого середовища та за атмосферного тиску.
7. Вихідні матеріали та матеріали, що витрачаються, повинні бути відновлюваними в усіх випадках, коли це технічно та економічно вигідно.
8. Там де можливо, необхідно уникати одержання проміжних продуктів (блокуючих груп, приєднання та зняття захисту та ін.).
9. Завжди слід надавати перевагу каталітичним процесам (якомога найбільш селективним).
10. Хімічний продукт має бути таким, щоб після використання він не залишався у навколишньому середовищі, а розкладався на безпечні продукти.
11. Необхідно розвивати аналітичні методики, щоб було можливо слідкувати в реальному часі за утворенням шкідливих продуктів.

12. Речовини і форми речовин, які використовують у хімічних процесах, необхідно вибирати таким чином, щоб ризик хімічної небезпеки, включаючи витік, вибух і пожежу, були мінімальними.

Планування роботи на базі цих принципів дозволить мінімізувати шкоду довкіллю. На основі цих принципів сформульовані наступні підходи до розробки «зелених» аналітичних методик [120–122]:

1. Прямий аналіз, уникаючи підготовки проби.
2. Зменшення об'єму зразку.
3. Аналіз *in situ*.
4. Використання інтегрованих процесів з метою економії енергії та запобігання витратам великої кількості реагентів.
5. Автоматизація та мініатюризація.
6. Зменшення або відсутність дериватизації.
7. Зменшення відходів.
8. Розробка методів одночасного аналізу декількох аналізів.
9. Зменшення споживання енергії.
10. Використання відновлюваних ресурсів.
11. Заміна токсичних реагентів або зменшення їх використання.
12. Велика стурбованість безпекою оператора аналітики.

Виходячи з викладеного вище, класична ВЕРХ не може розглядатись як пріоритетний метод при розробці нових препаратів і аналітичних методик, а її використання є виправданим лише за відсутності альтернативних методів аналізу.

В якості альтернативного методу, особливо для розділення складних сумішей рядом авторів розглянуто методи ультрависокоєфективної рідинної хроматографії (УВЕРХ) для визначення продуктів деградації та одночасного кількісного визначення кількох компонентів. Ця техніка передбачає роботу з мікроколонками з розміром частинок 2,1 мкм. При цьому вдається досягати ефективного розділення за значно менший час аналізу і відповідно витрачаючи меншу кількість рухомої фази [123–125].

Крім того, для кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду у готовій ЛФ, у якості альтернативи методу рідинної хроматографії може бути використаний метод газорідинної хроматографії. Цей метод забезпечує розділення летких і термостабільних сполук. Цим вимогам відповідає приблизно 5% відомих органічних речовин, але саме ці речовини посідають майже 70% речовин, які використовуються у сфері фармацевтичної промисловості та у побуті.

Метод газорідинної хроматографії має багато переваг перед методом ВЕРХ, насамперед з точки зору збереження навколишнього середовища, а також вимог «зеленої хімії» [126, 127].

Рухомою фазою у методі газорідинної хроматографії служить інертний газ (газ-носіє), що протікає через нерухому фазу, яка має велику поверхню. В якості газа-носія використовують гелій або азот, водень, аргон. Газ-носіє забезпечує перенесення аналітів через хроматографічну колонку. Завдяки інертній природі газа-носія, взаємодія його з аналітами і нерухомою фазою відсутня [128–130].

Для газової хроматографії (ГХ) існують спеціальні вимоги щодо нерухомих фаз. Так, нерухома фаза має бути хімічно та термічно стійкою, рівномірно розподіленою на внутрішній поверхні колонки [128–130].

Для розділення компонентів аналізованої суміші, особливо у випадку спорідненості їх фізико-хімічних властивостей, на перший план виходить ефективність хроматографічної системи, яка по суті визначається ефективністю колонки. Найбільш ефективними є капілярні колонки, які можуть мати сотні тисяч теоретичних тарілок.

Капілярні колонки є порожніми капілярами діаметром від 0,1 мм до 0,53 мм і довжиною від десяти до сотні метрів. Нерухома рідка фаза хімічно «щеплена» до внутрішній поверхні стінок капіляра. Сьогодні існує велика кількість різноманітних нерухомих рідких фаз, які дозволяють розділяти аналіти різної природи.

У якості детекторів у ГХ, особливо у розрізі фармацевтичної промисловості, використовують полумнево-іонізаційний детектор, який по суті селективний до атомів вуглецю органічних молекул і сигнал якого пропорційний їх кількості. Цей

детектор може надійно виявляти низькі концентрації аналітів в пробі (до 10^{-6})% [128–130].

Кількісний газохроматографічний аналіз базується на залежності між інтенсивністю аналітичного сигналу, який прямо пропорційний площі піку S і кількості визначуваного компонента в аналізованому зразку. Основні методи кількісного аналізу у ГХ – метод зовнішнього стандарту, внутрішнього стандарту, метод стандартних добавок і внутрішньої нормалізації. У фармацевтичному аналізі найпоширенішим методом є метод внутрішнього стандарту, який мінімізує похибки, пов'язані з пробопідготовкою та дозуванням введеного розчину. Вимогою до внутрішнього стандарту є його хімічна спорідненість з аналітом і обов'язкова відсутність у аналізованому розчині [129].

Газохроматографічне визначення бензидаміну описане у Британській Фармакопеї. Його проводять після хлороформної екстракції розчину бензидаміну хроматографуванням на неполярній фазі OV-17 [42].

Таким чином, як витікає з обговореного вище матеріалу, існують більш прогресивні методи визначення бензидаміну гідрохлориду, особливо враховуючи принципи «зеленої хімії», ці методи потребують особливої уваги для прийняття рішень при розробці нових методик аналізу ЛЗ на основі бензидаміну гідрохлориду.

Резюме

Узагальнюючи дані літературного огляду можна зробити наступні висновки:

1. Оромукозні рідкі ЛЗ в даний час залишаються однією з найбільш доступних ЛФ завдяки традиційності виробництва, зручності застосування, відносної дешевизни в порівнянні з іншими ЛФ.
2. На теперішній час яскравим представником НПЗП, які використовуються для лікування захворювань ротової порожнини є бензидаміну гідрохлорид та ЛЗ, створені на його основі.

3. При проведенні фармацевтичної розробки ЛЗ на основі бензидаміну гідрохлориду у вигляді розчинів та спреїв, а також у комбінації з іншими речовини застосовують комбінований підхід до її проведення для забезпечення якості, безпеки та ефективності розробленого препарату протягом усього його життєвого циклу.
4. Аналіз існуючих методів визначення бензидаміну гідрохлориду показав, що найбільш використовуваними методами є ВЕРХ та УФ-спектрофотометрія. Проте, ці методи мають ряд недоліків: необхідність використання великої кількості органічних розчинників, а також відносна тривалість аналізу методом ВЕРХ; недостатня селективність УФ-спектрофотометрії.
5. Ґрунтуючись на тенденціях «зеленої хімії» та з урахуванням недоліків існуючих методів визначення бензидаміну гідрохлориду у лікарських формах передбачається розробка і валідація нових методик його кількісного аналізу.

РОЗДІЛ 2

ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАГАЛЬНИХ ПІДХОДІВ ЗЕЛЕНОЇ ХІМІЇ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Обґрунтування методології досліджень

Глобальна фармацевтична промисловість є однією з провідних областей промисловості, що постійно розвиваються та розширюються. Таке величезне зростання неминуче спричиняє все більшу стурбованість проблемами навколишнього середовища, а саме забрудненням, переробкою відходів, споживанням енергії та, як наслідок, несприятливим впливом на здорове майбутнє людства [117].

Український ринок не є виключенням. Нині в Україні існує більше ста фармацевтичних компаній, і їх кількість щороку збільшується [131]. Основна стратегія розвитку вітчизняного ринку – розширення обсягів лікарських засобів, що випускаються на ринок, та постійне збільшення нових лікарських засобів, що з'являються на ринку в результаті стратегії досліджень та розробок.

У той же час, нормативно-правові вимоги до якості та виробничого процесу різко підвищуються, прагнучі до гармонізації з вимогами Європейського Союзу та FDA, що пов'язане, головним чином, з необхідністю проведення більшої кількості випробувань для контролю якості, валідації технологічних процесів, імплементації підходу «Якість шляхом розробки» на стадії розробки нових лікарських засобів і в ході поточної верифікації технологічних процесів протягом їх життєвого циклу [102].

У сучасному фармацевтичному аналізі основну роль відіграють різні хроматографічні методи [101, 116]. Вони суттєво відрізняються один від одного не лише своєю здатністю до розділення, але й впливом на працівників лабораторії, кількістю відходів та необхідністю у ресурсах.

Результат розвитку фармацевтичної галузі також означає суттєве зростання відходів, які потребують вторинної переробки, після використання величезних обсягів токсичних розчинників та хімікатів, необхідність прискорення процесів з метою економії енергії та людських ресурсів і, нарешті, необхідність придбання нового обладнання та комплектуючих матеріалів до нього [132, 133]. Ці питання стають ключовими для збереження навколишнього середовища [134].

Існує лише один спосіб управління викладеною вище проблемою. Рішення пов'язане з підходом «зеленої хімії», головна мета якого – скорочення ресурсів, мінімізація відходів, споживання енергії та, де це можливо, заміна токсичних хімічних речовин на менш шкідливі та безпечні для людини [135, 136].

Наша мета – конкретизувати підходи до впровадження «зеленої аналітичної хімії» в R&D лабораторіях для розробки нових методів контролю якості лікарських засобів як для генеричних, так і для оригінальних композицій, запропонувати алгоритм (дерево рішень) щодо розробки «зеленого» методу та обговорити можливість його впровадження під час розробки методів контролю якості перорального спрею на основі бензидаміну гідрохлориду.

Основну роль у сучасному фармацевтичному аналізі відіграє ВЕРХ [102, 105]. Щорічно одиниця сучасного обладнання для ВЕРХ виробляє до п'ятисот літрів відходів, перекачуючи через колонку 1–1,5 мл на хвилину рухомої фази, що містить органічні розчинники, модифікатори рухомих фаз, буферні агенти, тощо [103, 104]. Найпоширенішими розчинниками у ВЕРХ є токсичний ацетонітрил і шкідливий для людей метанол [137, 138]. Виробники фармацевтичних препаратів приймають рішення про використання розчинників, базуючись на їх токсичності (таблиця 2.1). Оцінка токсичності інколи дуже відрізняється, і деякі розчинники є кращими або рекомендованими одним виробником, і в той же час не рекомендовані до використання іншим. Також через токсичність деякі розчинники рекомендується замінювати на альтернативні, менш токсичні.

Оцінка токсичності розчинника [21]

Клас	Розчинник	Висновок (Pfizer)	Висновок (GSK)	Висновок (Sanofi)
Спирти	Метилловий	Бажаний	Деякі проблеми	Рекомендований
	Етиловий	Бажаний	Деякі проблеми	Рекомендований
	1-Пропиловий	Бажаний	Деякі проблеми	Рекомендований
	2-Пропиловий	Бажаний	Деякі проблеми	Рекомендований
	1-Бутиловий	Бажаний	Мало проблем	Рекомендований
	2-Бутиловий	—	Мало проблем	Рекомендований
	терт-Бутиловий	Бажаний	Деякі проблеми	Бажано замінити
	Етилен гліколь 2-Метоксіетанол	Придатний —	Великі проблеми	Бажано замінити Бажано замінити
Вуглеводні	н-Пентан	Небажаний	—	Заборонений
	н-Гексан	Небажаний	Великі проблеми	Бажано замінити
	Циклогексан	Придатний	Деякі проблеми	Бажано замінити
	Метилциклогексан	Придатний	—	Бажано замінити
	Гептан	Придатний	Деякі проблеми	Бажано замінити
	Ізо-Октан	Придатний	Деякі проблеми	Заборонений
	Бензол	Небажаний	Великі проблеми	Бажано замінити
	Толуол	Придатний	Деякі проблеми	Бажано замінити
Ксилени	Придатний	Деякі проблеми	—	

Продовж. табл.2.1

Дипольярні апротонні	ДМСО	Придатний	Деякі проблеми	Бажано замінити
	Ацетонітрил	Придатний	Великі проблеми	Рекомендований
	ДМФА	Небажаний	Великі проблеми	Бажано замінити
	Диметилацетат*	Небажаний	Великі проблеми	Бажано замінити
	н-Метилпіролідон	Небажаний	Великі проблеми	Бажано замінити

Примітка. *Позначено як диметилацетат в оригінальній публікації Pfizer

Першим кроком до скорочення відходів методу ВЕРХ може бути розгляд альтернативного методу. Так, метод УВЕРХ є набагато більш сприятливим для навколишнього середовища, ніж традиційний ВЕРХ, оскільки йому потрібно значно менше рухомої фази, яку потрібно перекачувати через хроматографічну систему. Однак, підготовка зразків все ще може бути проблемою для підходу «зеленого» методу, оскільки зразок потрібно розвести до робочих концентрацій, які зазвичай знаходяться у діапазоні мікрограмів. Цей метод може бути використаний, якщо будь-які інші методи (УФ-спектрофотометрія, ГХ) не підходять внаслідок недостатньої селективності або точності методу. Недоліками УВЕРХ може бути недостатня селективність для деяких споріднених речовин, висока ціна обладнання та запчастин.

Інший хроматографічний метод, який широко застосовується в аналітичних лабораторіях, – це ГХ. Враховуючи те, що у якості рухомої фази в ГХ використовують інертні гази, та те, що зазвичай об'єм проби складає 1 мкл, ГХ являє собою «зелений» метод, однак її недоліком є лімітована кількість речовин, що здатні переходити у газоподібний стан при випаровуванні у робочих діапазонах приладу.

Інша альтернатива методу ВЕРХ – це метод УФ-спектрофотометрії, який дозволяє заощаджувати величезні кількості розчинників. Метод УФ-

спектрофотометрії не потребує мобільної фази для експерименту, і зазвичай розведення зразка відбувається у водному або неорганічному буферному середовищі. Тож цей метод можна розглядати як один з найбільш «зелених». Однак недоліком цього методу є його низька селективність для складних сумішей, або багатокomпонентних систем, у яких спостерігається інтерференція спектрів поглинання декількох компонентів.

Таким чином, за відповідністю основним принципам аналітичної «зеленої хімії» найбільш часто застосовувані в фармацевтичному аналізі фізико-хімічні методи можна розташувати у ряд УФСФ-ГХ – УВЕРХ – ВЕРХ, що було покладено в основу запропонованого нами «дерева рішень» для вибору методів аналізу з позицій «зеленої хімії» як альтернатива застосовуваним на сьогодні методикам ВЕРХ (рис. 2.1).

Необхідно зауважити, що не всі аналітичні процедури можуть бути замінені альтернативним «зеленим» методом, особливо коли йдеться про розділення домішок або під час одночасного визначення декількох сполук. За своєю суттю ВЕРХ на сьогодні є найбільш ефективним методом технікою для вирішення таких завдань, і в цьому випадку вдосконалення методу може бути досягнуто шляхом зменшення підготовки зразків, кількості розведень або об'єму проби, а також одночасним визначенням декількох компонентів (різних АФІ, допоміжних речовин) (рис. 2.1).

У тих випадках, коли визначення може проводитися тільки за допомогою методу ВЕРХ, потрібно розглядати шляхи заміни токсичних рухомих фаз на менш токсичні, наприклад, заміну ацетонітрилу етанолом. Основним недоліком етанолу є його висока в'язкість, проте проблему можна вирішити за рахунок підвищення температури елюювання. Етанол сьогодні широко використовується в УВЕРХ і дозволяє досягти достатнього розділення для різноманітних сполук різної хімічної природи. Крім того, у деяких випадках можливим є перехід на водні фази.

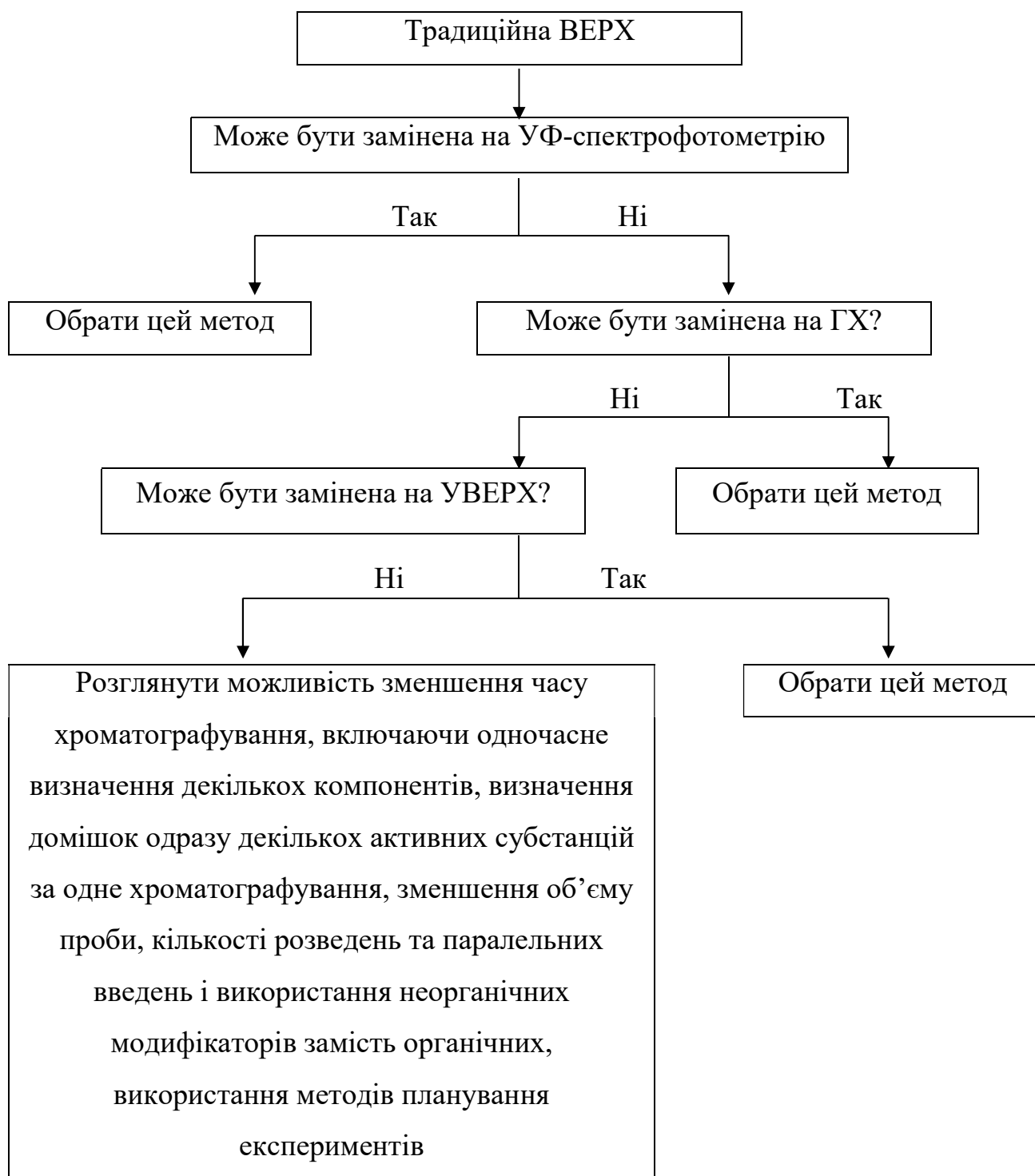


Рис. 2.1 «Дерево рішень» щодо вибору методик аналізу з позицій «зеленої хімії»

Підхід «зеленої хімії» (рис. 2.1) був реалізований в ході фармацевтичної розробки перорального спрею на основі бензидаміну гідрохлориду. Лікарська форма містить АФІ бензидаміну гідрохлорид та допоміжні речовини – метилпарагідроксибензоат, гліцерин, етанол, полісорбат та сахарин натрію. Нами опрацьована схема етапів розробки аналітичних методик у розрізі використання підходу «зеленої хімії», яка наведена на рис. 2.1. Це дерево рішень, яке включає в собі етапи та послідовність дій розробника в залежності від отриманих експериментальних даних в процесі розробки аналітичного метода.

Для лікарської форми у вигляді оромукозного спрею, ідентифікація та кількісне визначення є обов'язковими показниками якості. Для АФІ – бензидаміну гідрохлориду, методи ВЕРХ та ГХ є найбільш поширеними для цього визначення [42, 111]. Консервант – метилпарабен – також повинен бути ідентифікований та кількісно визначений у даній композиції. Для вирішення цього завдання найбільш зручним є метод ВЕРХ [139], проте для визначення парабенів описаний також метод ГХ [140]. Визначення домішок бензидаміну також проводиться методом ОФ ВЕРХ [109].

З точки зору принципів «зеленої хімії» (принцип 8 – Розробка методів одночасного аналізу декількох аналітів), найкращим рішенням, у нашому випадку, є одночасне визначення АФІ, допоміжних речовин, а також супровідних домішок в одному зразку. Такий підхід дозволяє зменшити споживання енергії на експлуатацію обладнання (принцип 9 – Скорочення споживання енергії), зменшення відходів, що утворюються з мобільної фази (принцип 7 – Зменшення відходів), та токсичних речовин (принцип 11 – Заміна токсичних реагентів або зменшення їх використання), а також мінімізація часу негативного впливу на оператора аналітичного обладнання (принцип 12 – Велика стурбованість безпекою аналітичного оператора).

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

Наступним кроком було оцінено можливість використання ГХ. Метод дозволяє кількісно оцінити декілька аналітів за допомогою однієї інжекції. У нашому випадку бензидамін може бути перетворений у форму основи після гідролізу та екстрагований невеликою кількістю неполярного розчинника, наприклад, хлороформу, з подальшим хроматографуванням екстракту. Однак метод ГХ не є селективним для визначення домішок бензидаміну гідрохлориду і не може бути використаний у цьому випадку.

Таким чином, дерево рішень веде нас до методу рідинної хроматографії. У нашому випадку підхід «зеленої хімії» мав би передбачати одночасну процедуру кількісного визначення діючих речовин, консервантів та супровідних домішок за допомогою однієї хроматографічної операції із спробою підбору «дружніх хімічних речовин». Тому ми обрали метод ВЕРХ, замінивши при цьому октансульфонат натрію та фосфатний буфер, які використовувалися в монографії Британській Фармакопеї у якості компонентів рухомої фази, на перхлорат натрію та перхлорну кислоту, які, очевидно, є безпечніші для навколишнього середовища та менш дорогі порівняно з алкілсульфонатом натрію. Розділення проводили на сорбенті С 18 з використанням ацетонітрил-буферного розчину в якості рухомої фази, скорочуючи час загальної експлуатації обладнання та робочий час оператора хроматографа. Однак, під час попередніх досліджень нами встановлено, що внаслідок різниці у концентраціях АФІ та домішок, не вдається досягти коректних результатів. Тому прийнято рішення розробити окремо:

- Методика визначення супутніх домішок – методом ВЕРХ
- Методика одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду
 - ✓ методом ВЕРХ аналогічно методиці визначення домішок
 - ✓ методом ГХ як альтернативна

Таким чином, підхід до «озеленення» методик був застосований для лікарської форми бензидаміну і привів до одночасного визначення трьох параметрів якості, таких як двох аналізів кількісного визначення та визначення супровідних домішок за допомогою двох хроматографічних процедур замість

трьох, а також можливість альтернативного кількісного визначення АФІ та конскрванта більш «зеленим» методом ГХ.

2.1 Об'єкти дослідження

Об'єктами дослідження для розробки методик контролю якості з використанням принципів «зеленої хімії» були Фармакопейні стандартні зразки та зразки препарату на основі бензидаміну гідрохлориду.

Бензидаміну гідрохлорид являє собою 3-[(1-Бензил-1Н-індазол-3-іл)оксі]-N,N-диметилпропан-1-амін гідрохлорид. Емпірична формула $C_{10}H_{12}ClN_3O$, молярна маса 345,9 г/моль. Згідно монографії Європейської Фармакопеї це білий або майже білий гігроскопічний кристалічний порошок, дуже добре розчинний у воді, розчинний у 96 % спирті та хлористому метилені, помірно розчинний у ацетоні, практично не розчинний у гептані [43]. Для приготування модельних розчинів використовували стандарт бензидаміну гідрохлориду Британської Фармакопеї (P=97,4 %).

Для приготування модельних розчинів використовували стандартні зразки Британської фармакопеї домішок В і С бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену, а також стандартний зразок ментолу виробництва Sigma Aldrich (Німеччина).

Аналізу підлягали наступні зразки препарату:

- препарат Бензидаміну гідрохлорид спрей 1,5 мг/ мл виробник ПАТ «Фармак» серія 10715;
- препарат Бензидаміну гідрохлорид спрей 1,5 мг/мл виробник ПАТ «Фармак» серія 20715;
- препарат Бензидаміну гідрохлорид спрей 1,5 мг/мл виробник ПАТ «Фармак» серія 30715.
- препарат Бензидаміну гідрохлорид розчин оромукозний 1,5 мг/мл виробник ПАТ «Фармак» серія 10715.

- препарат Бензидаміну гідрохлорид розчин оромукозний 1,5 мг/мл виробник ПАТ «Фармак» серія 10715.
 - препарат Бензидаміну гідрохлорид розчин оромукозний 1,5 мг/мл виробник ПАТ «Фармак» серія 20715.
 - препарат Бензидаміну гідрохлорид розчин оромукозний 1,5 мг/мл виробник ПАТ «Фармак» серія 30715.
 - Дослідний зразок комбінованої лікарської форми Бензидаміну гідрохлориду спреї з олією м'яти перцевої.
- Ефірні олії м'яти перцевої (Flora secret (ТОВ «ПКК «ДНД»); Квіта (ФОП Скріпченко); Ароматика «ТОВ Ароматика»; Mentha arvensis leaf oil «ПП Репичесто»; М'ята, антологія натуральної косметики «ТОВ Фармаком»)

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Високоєфективна рідинна хроматографія

Хроматографування проводили з використанням високоєфективного рідинного хроматографа ShimadzuLC-20 (Японія), беручи до уваги вимоги статті ДФУ 2.2.29 [4]. Рідинний хроматограф був оснащений автосамплером, бінарним насосом, дегазатором та термостатом колонок. В ході аналізуаналітичний сигнал отримували за допомогою діодно-матричного детектора.

Аналіз проводили з використанням методу зовнішнього стандарту, хроматографуючи послідовно розчин порівняння та випробовувані розчини, отримуючи по три хроматограми кожного розчину. У якості стандартів для розчину порівняння використовували стандартні зразки Британської фармакопеї. Вміст бензидаміну та метилпарабену визначали з середніх значень площ піків отриманих з хроматограм розчину порівняння та випробовуваного розчину.

Концентрації аналізованих компонентів (C_i) розраховували згідно формули (2.1):

$$\frac{C_i}{C_0} = \frac{S_i}{S_0}; \quad (2.1);$$

де C_i та C_0 концентрації визначуваних компонентів та стандартного зразка відповідно; S_i та S_0 площі піків визначуваних компонентів та стандартного зразка відповідно.

2.2.2 Газова хроматографія

Хроматографію проводили за допомогою газового хроматографа Agilent 7890 (США), беручи до уваги вимоги статті ДФУ 2.2.28 [4]. Газовий хроматограф був оснащений полуменево-іонізаційним детектором, автоматичним дозатором та інжектором з інжектором для введення проб із діленням потоку. Для збору даних було використано програмне забезпечення Chemstation.

Аналіз проводили з використанням методу внутрішнього стандарту. У якості стандартів використовували стандартні зразки Британської фармакопеї. Вміст бензидаміну, метилпарабену та ментолу визначали з середніх значень відносних площ піків аналітів відносно внутрішнього стандарту.

2.2.3 Абсорбційна спектрофотометрія в ультрафіолетовій області

Дослідження проводили на спектрофотометрі Shimadzu 1800 (Японія) з програмним забезпеченням UV-Probe, беручи до уваги вимоги статті ДФУ 2.2.25 [4].

У якості стандарту для розчину порівняння використовували стандартний зразок бензидаміну Британської фармакопеї. Визначення проводили шляхом вимірювання оптичної густини випробуваного розчину та розчину порівняння із наступним перерахунком згідно формули (2.2):

$$X = \frac{m_0 \cdot A \cdot 1000}{A_0}; \quad (2.2)$$

де A – оптична густина випробуваного розчину; A_0 – оптична густина розчину порівняння; m_0 – маса наважки стандартного зразку в г.

2.2.4 Валідація методик

Валідація аналітичних методик проводилась відповідно до вимог ІСН Q2 та ДФУ за наступними критеріями: специфічність, лінійність, межі виявлення та кількісного визначення, прецизійність, правильність, робасність [141].

Специфічність (specificity) – здатність методики однозначно визначати аналізовану речовину в присутності інших компонентів, які можуть бути присутніми у пробі. Як правило, це можуть бути домішки, продукти розкладу, плацебо і т.ін.

Правильність (accuracy) аналітичної методики визначає ступінь близькості між відомим істинним значенням або прийнятою довідковою величиною і значенням, одержаним за даною методикою.

Прецизійність (precision) аналітичної методики виражає ступінь близькості (або ступінь дисперсії) для серіями вимірювань, отриманих при паралельних вимірюваннях одного однорідного зразку, у встановлених умовах. Дослідження прецизійності проводять за наступними характеристиками: повторюваність, проміжна прецизійність та відтворюваність.

Повторюваність (repeatability) виражає прецизійність методики при її виконанні в одних і тих самих умовах протягом короткого інтервалу часу.

Проміжна (внутрішньолабораторна) прецизійність (intermediate precision) виражає вплив зміни умов аналізу всередині лабораторії: різні дні, обладнання, аналітики і т.ін.

Відтворюваність (reproducibility) виражає міжлабораторну прецизійність.

Лінійність (linearity) аналітичної методиким – це здатність методики (у межах визначеного діапазону) давати результати, прямопропорційні концентрації (кількості) аналізованої речовини у пробі.

Межа визначення (detection limit) окремої аналітичної методики являє собою найменшу кількість аналіту в пробі, яку можна визначити, але яка не обов'язково виражена точним значенням.

Межа кількісного визначення (quantitation limit) окремої аналітичної методики являє собою найменшу кількість аналіту в пробі, яку можна оцінити кількісно із прийнятною правильністю та прецизійністю.

Діапазон використання (range) аналітичної методики – це інтервал між верхнім та нижнім значеннями концентрації аналіту в пробі, в межах якого доведена прийнятна прецизійність, правильність та лінійність методики.

Робастність (robustness) аналітичної методики – це її здатність залишатися незмінною за невеликих, умисних змін умов проведення аналізу і характеризує надійність методики за звичайних умов.

Дослідження з розробки та валідації аналітичних методик проводили на базі АТ «Фармак», м. Київ та кафедри фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету.

При розробці та валідації аналітичних методик використовували:

- мірний посуд класу А мірні колби на 10, 20, 50, 100 мл, піпетки на 1, 2, 5, 10 мл;
- дозатори на 1 мл;
- реактиви, які відповідають вимогам Європейської Фармакопеї;
- аналітичні ваги Sartorius з точністю вимірювання до 0,1 мг;
- рН-метр: рН Mettler Toledo-SevenCompact pH meter S220;
- Хроматографування проводили за допомогою рідиного хроматографа Shimadzu LC-20 з діодно-матричним детектором, автоматичним дозатором, дегазатором та насосом для чотирьохкомпонентних сумішей. Для обробки даних використовували програмне забезпечення LC Solution software. ВЕРХ: Shimadzu LC 20;

Висновки до розділу 2

1. Розроблено дерево рішення по вибору розробки аналітичних процедур з точки зору «зеленої хімії».

2. Запропоноване дерево рішення дає змогу визначити методи для розробки методів кількісного визначення та супровідних домішок препарату на основі бензидаміну гідрохлориду.
3. Використані при розробці готової лікарської форми АФІ та допоміжні речовини, відповідають вимогам Європейської Фармакопеї діючого видання, дозволені до медичного застосування та використовуються для виробництва рідких лікарських форм.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

Chorny V., Kushniruk, V., Georgiyants V. Design and implementation of green chemistry approaches into pharmaceutical analysis of benzydamine dosage forms. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2019. №5(21). P. 12-17.

РОЗДІЛ 3
РОЗРОБКА МЕТОДИК КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ОРОМУКОЗНОГО СПРЕЮ
БЕНЗИДАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ

Склад лікарської форми, що підлягав розробці методів аналізу включає речовини згідно таблиці 3.1:

Таблиця 3.1

Склад спрею та розчину готової лікарської форми на основі бензидаміну
гідрохлориду

<i>Найменування сировини</i>	<i>Бензидамін, спрей</i> <i>1,5 мг/мл</i>	<i>Бензидамін, розчин</i> <i>1,5 мг/мл</i>
Бензидаміну гідрохлорид (в перерахунку на 100% суху речовину)	1,5 мг	1,5 мг
Етанол 96%	80,0 мг	80,0 мг
Гліцерол	50,0 мг	50,0 мг
Метилпарагідроксibenзоат	1,0 мг	1,0 мг
Натрію сахаринат	0,24 мг	0,24 мг
Натрію гидрокарбонат	0,02 мг	0,02 мг
Полісорбат 20	0,05 мг	0,05 мг
Ароматизатор м'ятний	0,3 мг	0,3 мг
Хіноліновий жовтий 70 % (E 104)	-	0,016 мг
Патентований синій V 85 % (E 131)	-	0,0024 мг
Вода очищена	До 1 мл	До 1 мл

У відповідності до регуляторних вимог України в даній лікарській формі кількісному визначенню підлягають активна речовина – бензидаміну гідрохлорид та антимікробний консервант - метилпарагідроксибензоат. Крім кількісного визначення обов'язковим показником якості є контроль супровідних домішок.

3.1 Розробка та валідація методики визначення супровідних домішок

На сьогоднішній день, ДФУ не має монографії ні на субстанцію бензидаміну гідрохлориду, ні на готову лікарську форму на основі бензидаміну гідрохлориду. Готова лікарська форма описана у Британській Фармакопеї [142]. АФІ бензидаміну гідрохлориду описана у Британській та Європейській Фармакопеї [42, 43].

Монографія Фармакопеї Британії на готову лікарську форму містить методику ТШХ для визначення супровідної домішки С. Інші домішки, зокрема неспецифіковані не визначаються за умов методики в монографії. Це не дає можливості визначати інші продукти деградації, які повинні бути визначені згідно вимог регуляторних органів України та Європи. Тому використання підходу Британської Фармакопеї може бути розглянуто як мінімальна, але не достатня вимога що до забезпечення якості готового лікарського засобу.

Використання методики Європейської Фармакопеї на супровідні домішки також не забезпечує селективності методики для готової лікарської форми, оскільки препарат містить досить складну «матрицю» допоміжних речовин, яка ймовірно буде спричиняти накладання піків плацебо з домішками препарату.

Для готової лікарської форми були встановлені критерії прийнятності для нормування домішок, згідно вимог ІСН Q3b, які залежать від максимальної добової дози препарату. Так для оромукозного спрею та розчину на основі бензидаміну, максимальна добова доза бензидаміну складає 13 мг. Відповідно для нормування домішок були вибрані критерії прийнятності (табл. 3.2).

У якості специфікованої домішки обрали домішку С, яка є побочним продуктом синтезу бензидаміну гідрохлориду, нормується монографією на готову лікарську форму та одночасно може бути продуктом деградації діючої речовини.

Нормування домішок в ГЛЗ

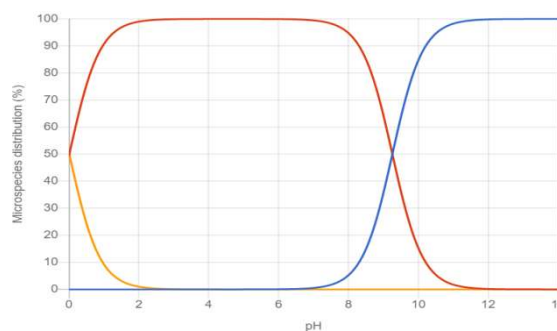
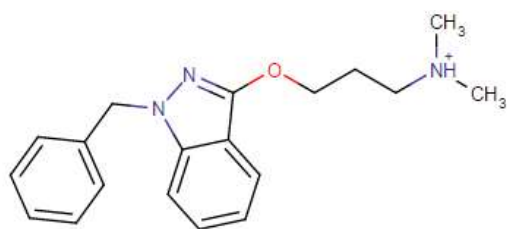
<i>Максимальна добова доза АФІ</i>	<i>Межа інформування</i>	<i>Межа ідентифікації</i>	<i>Межа кваліфікації</i>
13 мг	0,10%	0,2%	0,5%
	Не враховують до- мішки нижче 0,10%	Критерій прийнят- ності для неідентифі- кованної домішки	Критерій прийнятності для домішки С

Розробка методики ВЕРХ – це вирішення задачі розділення компонентів у суміші шляхом вибору відповідних параметрів хроматографічної системи. У методі ВЕРХ основними змінними параметрами є нерухома фаза, рухома фаза, вміст органічного розчинника, довжина хвилі детектування та робоча температура елюювання.

Хроматографування проводили за допомогою рідиного хроматографа Shimadzu LC-20 з діодно-матричним детектором, автоматичним дозатором, дегазатором та насосом для чотирьохкомпонентних сумішей. Для обробки даних використовували програмне забезпечення LC Solution software.

Першим кроком розробки ВЕРХ методики є оцінка аналітів. Досліджуваний препарат складався з бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену, неорганічних солей та води для ін'єкцій. Отже, бензидамін, його домішки та метилпарабен були єдиними сполуками, які мають поглинання в УФ-області.

Бензидаміну гідрохлорид (I) – похідне третинного аміноіндазолу – {3-[(1-бензил-1Н-індазол-3-іл)окси]пропіл}диметиламін (у вигляді солі гідрохлориду). Його рК становить 9,26. Ця сіль утворена слабкою основою та сильною кислотою. Бензидамін знаходиться у протонованому стані (Ia) при рН нижче 7,2 та у депротонованому стані при рН вище 11,4 [105].



Ia

Ідентифікованою домішкою бензидаміну є 1-бензил-1-Н-індазол-3-ол (домішка С – IV, рис.1.2.); його рК дорівнює 7,9 [105].

З теорії хроматографії відомо, що іонізовані сполуки не утримуються нерухомою фазою [105], а отже, елюються у порожньому об'ємі. Речовина повинна залишатися у нейтральній формі, щоб утримуватись нерухомою фазою [105]. Бензидамін та його домішка С існують у нейтральній формі при значенні рН 10 і вище. Однак використання рухомих фаз з таким рН неприйнятне для більшості обернених фаз через гідроліз алкільних груп. Зважаючи на це для рухомої фази було обрано низьке значення рН, за якого бензидамін та його домішки протоновані та існують у позитивно зарядженому стані.

Прийнято вважати хаотропний аніон буферної солі протилежним аніоном [143]. У якості буферу рухомої фази випробовували перхлорний і фосфатний розчини. Було показано, що фосфатний буфер не забезпечує достатньої роздільної здатності між домішкою С та бензидаміном, як це досягається при використанні перхлоратного буфера (рис. 3.2).

Співвідношення органічного розчинника в рухомій фазі було обрано враховуючи оптимальну роздільну здатність аналітів. Ефективність системи становила близько 12000 теоретичних тарілок.

Тестували дві колонки з використанням октилової та октилдецилільної фаз. Найкращі показники були досягнуті на сорбенті С18. Довжину хвилі детектування було обрано враховуючи те, що максимум поглинання бензидаміну спостерігається при довжині хвилі 320 нм. Проте за вказаних умов спостерігалася незадовільна симетрія піку бензидаміну (Рис. 3.3а).

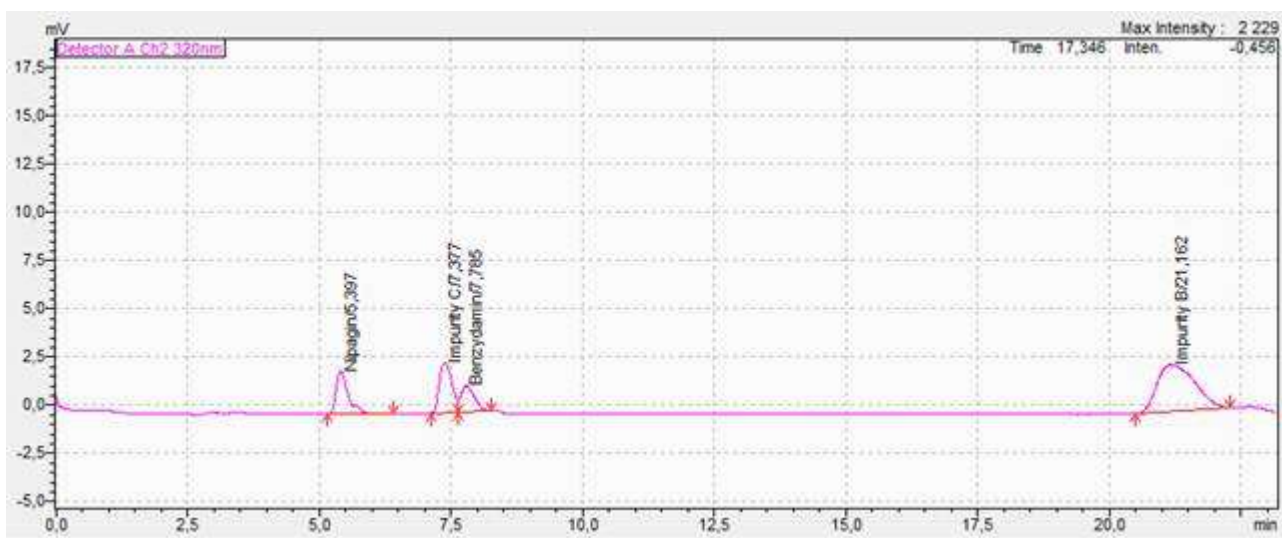
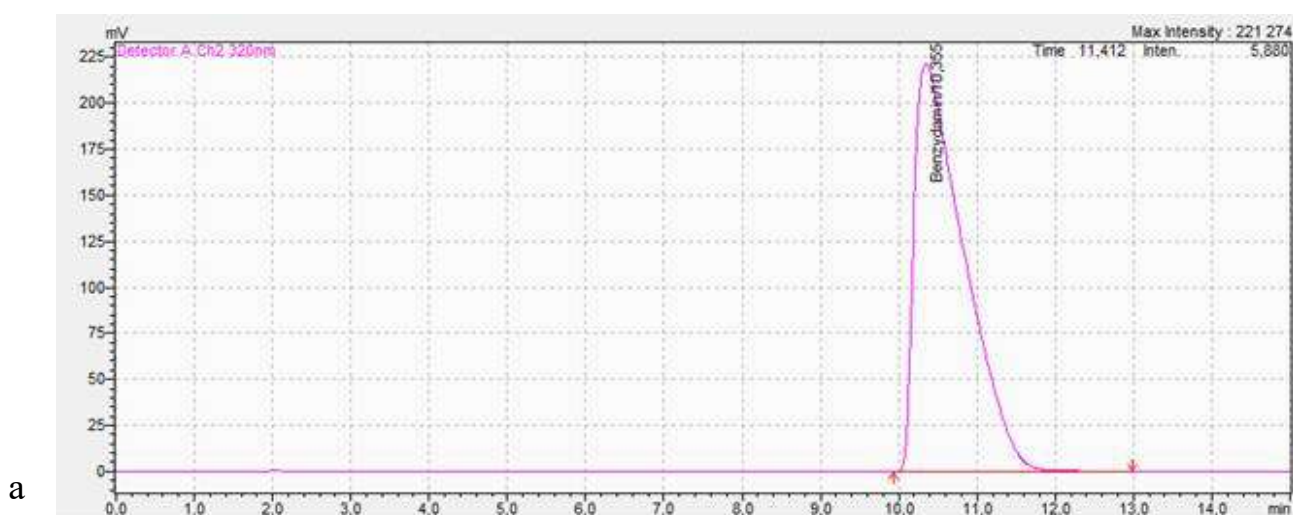
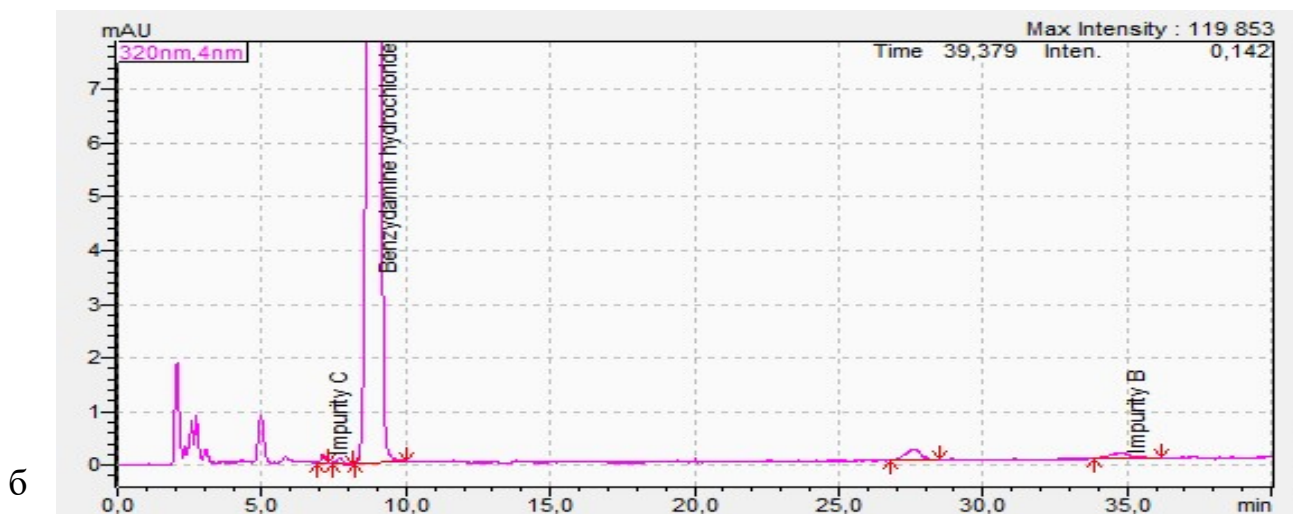


Рис. 3.2 Хроматограма, отримана із використанням фосфатного буфера як хаотропної солі



а



б

Рис 3.3 Хроматограми розробки методики

З метою покращення симетрії піку шляхом пасивації силанольних груп нерухомої фази до рухомої фази додавали триетиламін. На цьому етапі було досягнуто задовільного дозволу між критичною парою аналітів (рис. 3.3б).

Валідацію проводили для наступної методики:

Випробовуваний розчин. 10 мл препарату доводять розчинником до 100 мл та перемішують.

Розчин порівняння (а). 1,0 мл випробовуваного розчину доводять розчинником до об'єму 100,0 мл та перемішують. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

Розчин порівняння (b). 150 мг СЗ 1-бензил-1Н-індазол-3-ол (бензидаміну домішки С) (BP CRS або каталог «LGC», або аналогічної якості) розчиняють в 50 мл розчинника, за необхідності витримують на УЗ-бані протягом 5 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 100,0 мл та перемішують. 1 мл приготованого розчину доводять до 100 мл розчинником та перемішують.

Розчин для перевірки придатності хроматографічної системи. 1,0 мл випробовуваного розчину та 1,0 мл розчину порівняння (b) поміщають у мірну колбу об'ємом 100 мл та доводять розчинником до позначки, перемішують. Розчин готують безпосередньо перед використанням.

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

- колонка: Grace Alltima розміром 250 мм × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії Р з розміром часток 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються умови придатності хроматографічної системи;

- рухома фаза: 3,0 г натрію перхлорату Р розчиняють у 500 мл води Р, додають 1,0 мл триетиламіну Р, доводять рН хлорною кислотою Р до 3,0, додають 500 мл ацетонітрилу Р та перемішують (рухому фазу готують безпосередньо перед використанням);

- швидкість рухомої фази – 1 мл/хв;

- температура термостату колонки 25 °С.:

- детектування за довжини хвилі 320 нм;
- час хроматографування 40 хв.

Хроматографують по 20 мкл розчинника, розчину для перевірки придатності хроматографічної системи, випробовуваного розчину та розчину порівняння (а). Для дотримання умов придатності хроматографічної системи допускається зміна кількості ацетонітрилу Р в рухомій фазі на 5 %. Порядок виходу піків наступний: домішка С, бензидаміну гідрохлорид.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються наступні умови:

- коефіцієнт розділення між піками бензидаміну гідрохлориду та домішки С на хроматограмі розчину для перевірки придатності хроматографічної системи не менше 2,0;

- коефіцієнт симетрії для піку бензидаміну на хроматограмі розчину порівняння становить від 0,9 до 1,5

- відносне стандартне відхилення, розраховане для 3-х паралельних інжекцій, для кожного із визначуваних компонентів, у % становить не більше 2,0%

Нормування:

домішка С: площа відповідного піка з не має перевищувати 0,5 площі піку домішки С на хроматограмі розчину порівняння (b) (0,5 %);

неспецифікована домішка: площа піка кожної несспецифікованої домішки не має перевищувати 0,2 площі піка бензидаміну гідрохлориду на хроматограмі розчину порівняння (a) (0,2 %);

сума домішок: має бути не більше 1,5 %;

не враховують: піки розчинника, піки з відносним часом утримування меншим за 0,4 відносно піку бензидаміну гідрохлориду, пік метилпарагідроксибензоату та піки, площа яких становить менше 0,1 площі піка бензидаміну гідрохлориду на хроматограмі розчину порівняння (a) (0,1 %).

Дослідження примусової деградації лікарського засобу. Дослідження примусової деградації препарату допомагає виявити можливі продукти деградації, перевірити специфічність методу та довести відсутність коелюювання піків.

Зразок препарату «Бензидаміну гідрохлорид спрей 1,5 мг / мл» піддавали стрес-тесту для оцінки можливості інтерференції між бензидаміну гідрохлоридом, домішкою С та можливими неідентифікованими продуктами деградації. Досліджували вплив лугу, кислоти, окислення, фотолізу та температури. Щоб підтвердити природу продуктів деградації, вводили холостий розчин і розчин плацебо.

Дослідження деградації показали, що бензидаміну гідрохлорид стабільний у лужному середовищі, стійкий до дії температури та фотолізу. Значна деградація бензидаміну гідрохлориду відбувалася при обробці H_2O_2 (окиснення) та кислотою з утворенням відповідно невідомого продукту та домішки С (рис. 3.4).

Невідомий продукт деструкції вивчали за допомогою рідинної хроматографії з мас-спектрометрією. Визначено, що невідомою домішкою був бензидаміну N-оксид із відповідною масою 326, 2 m/z (рис. 3.5).

Коефіцієнт чистоти, отриманий для піку АФІ для всіх зразків складу, підданих стрес-тесту, становив понад 990,00. Піки всіх індивідуальних домішок, що утворювались в результаті стрес-тестів, не перекривали один одного та пік бензидаміну. Метод був визнаний специфічним для всіх потенційних продуктів розпаду бензидаміну (рис. 3.6).

Валідація методики визначення супровідних домішок. Розроблена ВЕРХ методика була валідована відповідно до вимог ДФУ [144] та ІСН за наступними критеріями: лінійність, межі виявлення та кількісного визначення, прецизійність, правильність, робасність та специфічність [141].

Специфічність ВЕРХ методики може бути встановлена шляхом оцінки роздільної здатності між піками, аналізу чистоти піків та відсутності інтерференції між піками матриці. Було показано, що роздільна здатність між піками домішки С та бензидаміну гідрохлориду на хроматограмі розчину для перевірки придатності системи становить 3,48 (рис. 3.7).

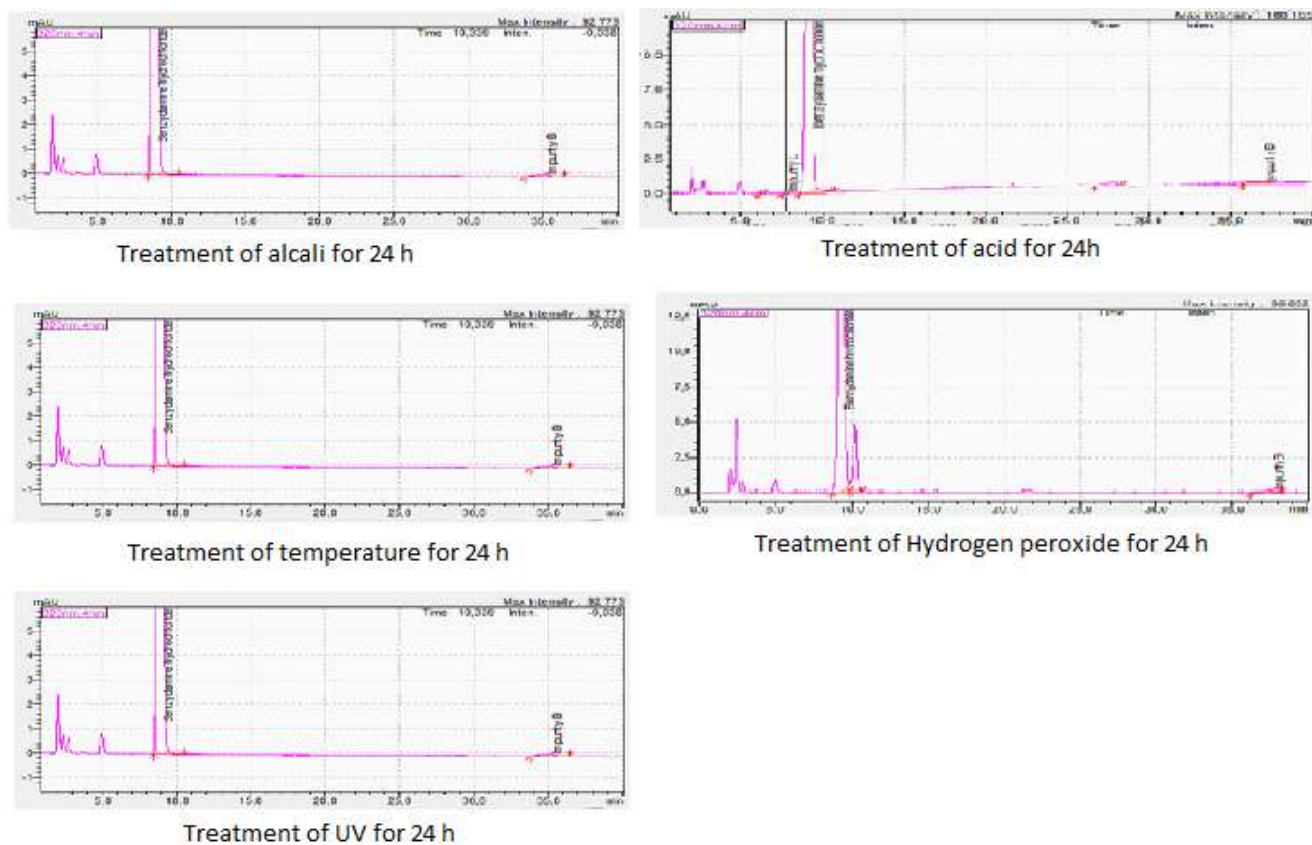


Рис. 3.4 Хроматограми стрес-тестів бензидаміну гідрохлориду у готовій лікарській формі

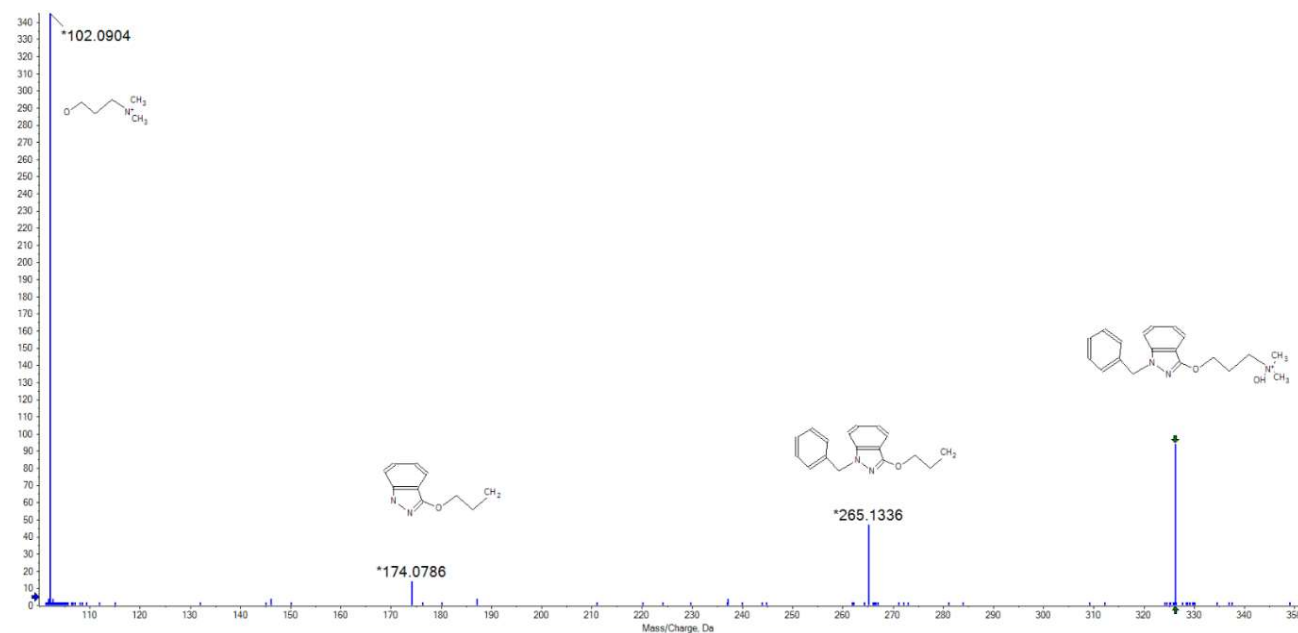


Рис. 3.5 Мас-спектр невідомої домішки (ідентифікована як домішка - бензидаміну N-оксид)

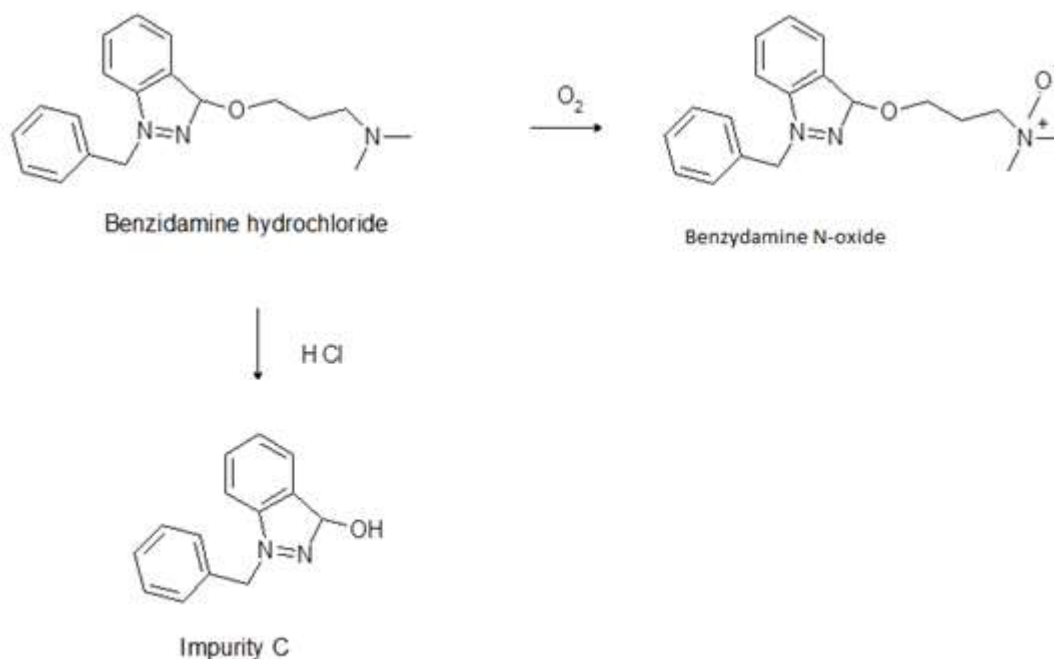


Рис. 3.6 Схема деградації бензидаміну гідрохлориду

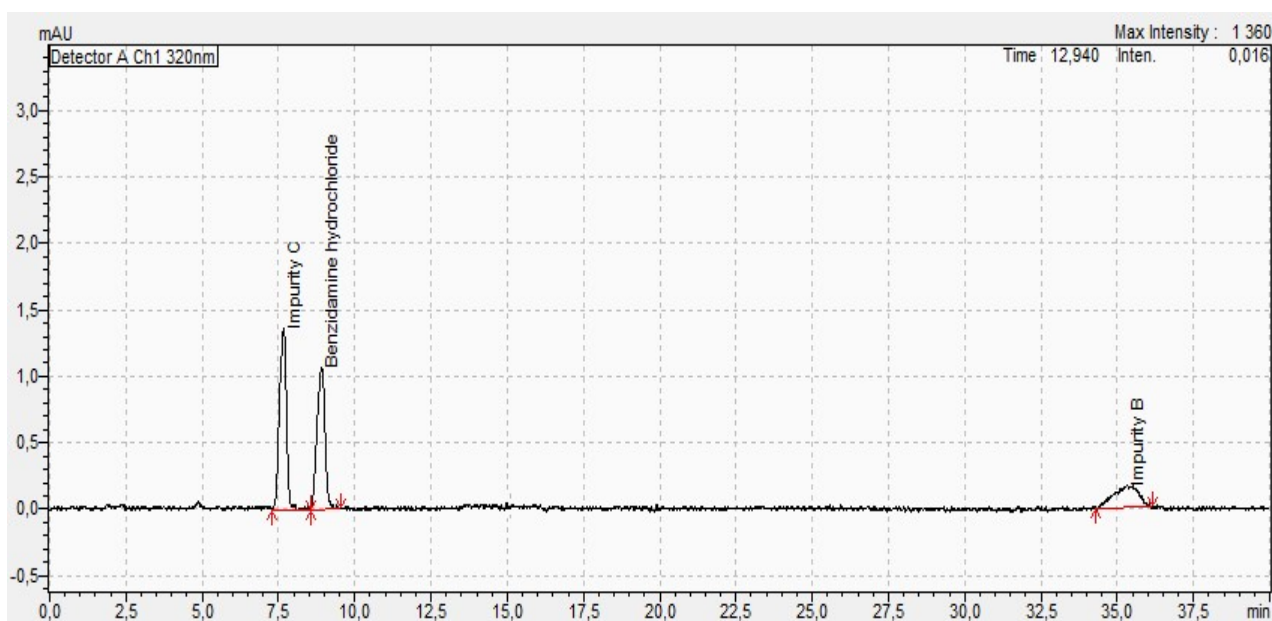


Рис. 3.7 Хроматограма розчину для перевірки придатності хроматографічної системи

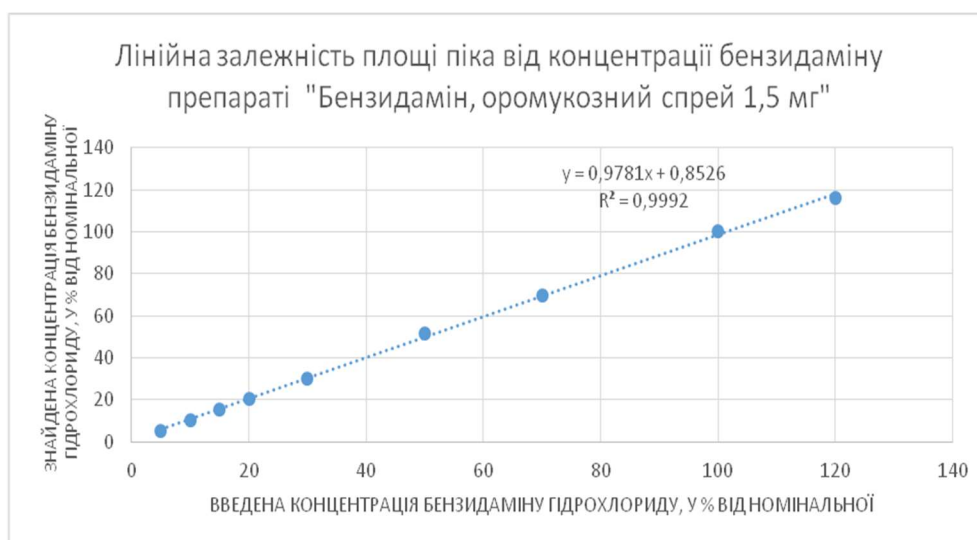
Час утримування бензидаміну гідрохлориду на хроматограмі випробуваного розчину збігається з часом утримування бензидаміну гідрохлориду на

хроматограмі для перевірки придатності хроматографічної системи. На хроматограмі розчину плацебо не виявлено піків, час утримування яких збігається з часом утримування бензидаміну гідрохлориду або домішки С.

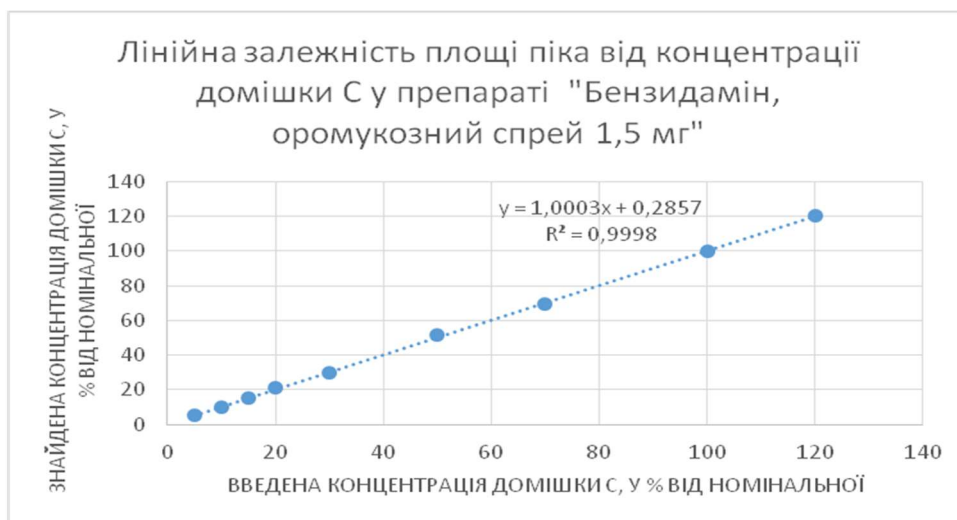
Лінійність, збіжність і правильність для неідентифікованої домішки та домішки С вивчали в діапазоні концентрацій 0,05%–1,2% відносно номінальної концентрації бензидаміну гідрохлориду у складі препарату (1,5 мг/мл). Дев'ять окремих модельних розчинів готували з концентрацією бензидаміну гідрохлориду та домішки С 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,2%, 0,3%, 0,5%, 0,7%, 1,0%, 1,2% відносно номінальної концентрації бензидаміну гідрохлориду у складі препарату. Кожен розчин вводили тричі.

В нормалізованих координатах будували графік залежності концентрації бензидаміну гідрохлориду та домішки С від площі відповідних піків.

Відповідно до експериментальних даних побудовано лінійну залежність у системі нормалізованих координат «введений вміст гідрохлориду бензидаміну» від «знайденого вмісту бензидаміну гідрохлориду», тобто: $Y = B \cdot X_i + A$ (рис. 3.8а). Графік залежності введеної концентрації домішки С від визначеної концентрації побудовано аналогічно (рис. 3.8б).



а



б

Рис. 3.8 Графік залежності визначеного вмісту бензидаміну гідрохлориду (а) та домішки С (б) від введеного

Критерії оцінки лінійності методики наведені у таблиці 3.2, метрологічні характеристики лінійності – у табл. 3.3.

Метрологічні характеристики лінійної залежності відповідають вимогам прийнятності, що регламентовані ДФУ. Значення коефіцієнту кореляції для неідентифікованої домішки та домішки С становить більше 0,999. Значення вільного члену рівняння знаходяться в межах критерію прийнятності та складають 0,85 та 0,29 для неідентифікованої домішки та домішки С відповідно. Методика також характеризується достатньою правильністю та прецезійністю для визначаємих домішок. Виконуються вимоги до критерію незначущість систематичної похибки.

Отже можна зробити висновок, що методика визначення спровідних домішок в оромукозному розчині та спреї бензидаміну 1,5 мг/мл характеризується достатньою лінійністю, правильністю та збіжністю.

Визначення межі виявлення (LOD) та межі кількісного визначення (LOQ). Межі виявлення та кількісного визначення домішки С та неідентифікованої домішки (табл. 3.4) розраховували на основі результатів лінійної регресії, використовуючи значення стандартного відхилення вільного члена рівняння та нахилу лінії регресії калібрувальної кривої за формулами 3.1 та 3.2.

Таблиця 3.3

Розраховані дані для домішки С та неідентифікованої домішки

Введено в % до концентрації ї розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Неідентифікована домішка		Домішка С		
	Знайдено в % до концентрації ї розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	Знайдено в % до введеног о $Z_i = 100 \cdot$ (Y_i/X_i) %	Введено в % до концентрації ї розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Знайдено в % до концентрації ї розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	Знайдено в % до введеног о $Z_i = 100 \cdot$ (Y_i/X_i) %
5,00	4,91	98,20	5,00	5,10	102,00
10,00	10,31	103,13	10,00	10,02	100,20
15,00	15,33				
20,00	20,58	102,92	20,00	20,95	104,75
30,00	29,86				
50,00	51,53	103,83	50,00	51,41	102,82
70,00	69,81	99,74	70,00	69,39	99,13
100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
120,00	116,23	96,88	120,00	120,73	100,61
Середнє значення		100,64			101,28
RSD _Z , %		2,35			2,01
Відносний довірчий інтервал $\Delta_Z(\%) = t(95, n - 1)$ $\times RSD_Z$ $= 1,860$ $\times RSD_Z, \%$		4,37			3,74
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{As}, \%$ (гранична невизначеність)		5.0			5.0

Продовж. табл.3.3

Систематична похибка $\delta = \bar{Z} - 100 $	0,64			1,28
Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\% = \frac{\Delta z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta z}{3} = \frac{4,37}{3} = 1,45 (0,64 \leq 1,45)$ якщо не виконується 1), то $\delta \leq 0,32 \times 5.0 = 1.6\%$ (1,45 ≤ 1.6)	Не виконується Виконується	Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\% = \frac{\Delta z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta z}{3} = \frac{3,57}{3} = 1,24 (1,28 \geq 1,24)$		Виконується
Загальний висновок про методику	Коректна			Коректна

Таблиця 3.4

Метрологічні характеристики лінійної залежності для неідентифікованої домішки та домішки С

<i>Параметр</i>	<i>Умовне позначення</i>	<i>Критерій прийнятності</i>	<i>Отримане значення для неідентифікованої домішки</i>	<i>Отримане значення для домішки С</i>
Коефіцієнт кореляції	r	0,9976	0,9992	0,9998
Вільний член рівняння	a	≤ 2,1	0,8526	0,2857
Нахил лінії регресії	b	—	0,9780	1,0003
Стандартне відхилення	S _A	—	0,62	0,36
Тангенс кута нахилу для розрахованої	S _b	—	0,0102	0,0058

регресійної прямої;				
Залишкове стандартне відхилення	S_r	—	1,21	0,69

$$LOD = \frac{3,3 \cdot S_A}{B}; \quad (3.1)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot S_A}{B}; \quad (3.2)$$

Було показано, що неідентифіковану домішку можна кількісно визначити при концентрації 0,0633% відносно концентрації бензидаміну гідрохлориду у випробуваному розчині, а домішку С – при концентрації 0,0356% відносно концентрації бензидаміну гідрохлориду у випробуваному розчині.

Проведено розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння для неідентифікованої домішки (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Межі виявлення та кількісного визначення

Параметр	Бензидаміну гідрохлорид, %	Домішка С, %
LOD	0,0209	0,0118
LOQ	0,0633	0,0356

Невизначеність кінцевої аналітичної операції розраховували за співвідношеннями 3.3., 3.4.

Результати розрахунків наведено у табл. 3.6.

Розрахунок $\Delta A_s, \%$ проводили з урахуванням невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції:

$$\Delta_{A_s, \%} = \sqrt{[1,025]^2 + [3,51]^2} = 3,66\% \quad \Delta_{A_{steor}} = 5,0 \%$$

Таким чином, повна прогнозуєма невизначеність результатів для визначення неідентифікованої домішки не більше критичного значення $\Delta_{\text{Астерор}} = 5,0 \%$, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях

$$\Delta_{FAO}, \% = \sqrt{2} \times \frac{RSD_{max} \times t_{95\%,n-1}}{\sqrt{n}} \quad (3.3);$$

$$\Delta_{FAO}, \% = \sqrt{2} \times \frac{2 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 3,51\% \quad (3.4);$$

Таблиця 3.6

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину для неідентифікованої домішки

<i>№ n/n</i>	<i>Операції пробопідготовки</i>	<i>Невизначеність</i>
Розчин порівняння		
1.	Взяття аліквоти для виготовлення стандартного розчину 1 мл	0,98%
2.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Випробовуваний розчин		
5.	Взяття аліквоти для виготовлення тестового розчину 10 мл	0,25 %
6.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0,98^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2} = 1,025$		

Аналогічно розраховували невизначеність для розчинів домішки С (табл.3.7).

Таблиця 3.7

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину для домішки С

<i>№ n/n</i>	<i>Операції пробопідготовки</i>	<i>Невизначеність</i>
Розчин порівняння		
1.	Взяття наважки стандарту	$(0,2 \text{ мг} / 75 \text{ мг}) \cdot 100 \% = 0,26 \%$
2.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
3.	Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	0,25 %
4.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Випробовуваний розчин		
5.	Взяття аліквоти препарату 10 мл	0,25 %
6.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0,26^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2} = 0,49\%$		

Розрахунок $\Delta_{AS}, \%$ проводили з урахуванням невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції:

$$\Delta_{As}, \% = \sqrt{0,49^2 + 3,51^2} = 3,54\% \text{ в } \Delta_{A_{\text{стєор}}} = 5,0 \%$$

Отже, невизначеність для домішки С бензидаміну є прийнятною.

Перевірка придатності хроматографічної системи.

Розчин для перевірки придатності системи вводили тричі. Результати вивчення придатності хроматографічної системи наведені в таблиці 3.8.

Таблиця 3.8

Придатність хроматографічної системи

<i>Критерії придатності системи</i>			
<i>Площа піку бензидаміну гідрохлориду</i>	<i>RSD, %</i>	<i>Симетрія піку бензидаміну гідрохлориду</i>	<i>Розділення між бензидаміну гідрохлоридом та домішкою С</i>
19293	1,43	1,005	3,48
19269			
19801			

Примітка. RSD, % – відносне стандартне відхилення у %.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються наступні вимоги:

- роздільна здатність між піками бензидаміну та домішкою С складає не менше 2,0;
- Коефіцієнт симетрії для піку бензидаміну з хроматограм розчину порівняння становить від 0,8 до 1,2;
- Відносне стандартне відхилення, розраховане для 3-х паралельних інжекцій, для кожного із визначуваних компонентів, у % становить не більше 2,0%

Робасність методу була показана шляхом вивчення надійності хроматографічної методики та стабільності випробуваних розчинів у часі.

Як видно з одержаних еспериментальних результатів (табл. 3.9), випробовуваний розчин є стабільним і придатним для аналізу упродовж 48 годин.

Таблиця 3.9

Стабільність розчинів у часі

Термін зберігання	Відхилення площі піку домішки С ($S(TS)/S(RS)$) відносно контролю, %	
	Отримане значення	Критерій прийнятності
Контрольний розчин	—	—
48 години	0,56 %	$\leq 5\%$

Примітка. $S(TS)/S(RS)$, % - співвідношення площ піків випробуваного та стандартного розчину у %.

Надійність хроматографічної методики. Оцінювали за впливом на результати аналізу швидкості потоку (табл. 3.8) та рН розчину (табл. 3.9)

А) Швидкість потоку – стандартний та випробуваний розчини вводили тричі зі швидкістю потоку рухомої фази 1,0 мл / хв., 0,9 мл / хв. та 1,1 мл / хв.

Таблиця 3.10

Вплив швидкості потоку

Швидкість потоку	Відхилення площі піку домішки С, $S(TS)/S(RS)$, %	
	Отримане значення	Критерій прийнятності
1,0 ml/min	—	—
0,9 ml/min	0,39 %	$\leq 5\%$
1,1 ml/min	1,48 %	

Примітка. $S(TS)/S(RS)$, % - співвідношення площ піків випробуваного та стандартного розчину у %.

Б) рН рухомої фази – стандартний та випробуваний розчини вводили тричі зі зміною рН рухомої фази.

Таблиця 3.11

Вплив рН рухомої фази

<i>рН рухомої фази</i>	<i>Відхилення площі піку домішки С (S(TS)/S(RS)) відносно контрольного значення рН, %</i>	
	<i>Отримане значення</i>	<i>Критерій прийнятності</i>
рН 3,0	—	—
рН 2,0	1,44 %	≤5%
рН 4,0	1,79 %	

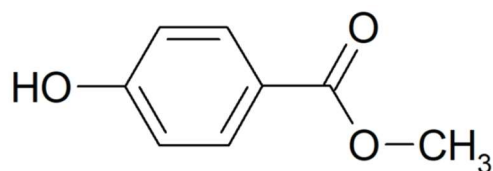
Примітка. S(TS)/S(RS), % - співвідношення площ піків випробуваного та стандартного розчину у %.

Встановлено, що коливання швидкості потоку да рН не мають суттєвого впливу на результати аналізу.

Таким чином, показано, що метод відповідає валідаційним вимогам і може бути застосований для визначення та кількісної оцінки потенційних продуктів деградації у складних препаратах бензидаміну гідрохлориду.

3.2 Розробка та валідація методики кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом ВЕРХ

Для оромукозних спреїв, як і для лікарських форм багаторазового використання, необхідно використовувати антимікробні консерванти, що гальмують ріст мікроорганізмів у продукті. Метилпарабен (V) є одним з найпоширеніших консервантів для пероральних лікарських форм, що являє собою метиловий естер парагідроксибензойної кислоти [145]. Метилпарабен проявляє активність проти дріжджових та пліснявих грибів, проти грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів [146].



V

У рутинному аналізі лікарських засобів вимоги до якості до аналітичних методик передбачають оптимізацію та універсалізацію методів, що дозволяють одночасно визначити кілька сполук. Тому було проаналізовано можливість одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену в одному зразку відповідно до дизайну дослідження (розділ 2) методами ВЕРХ та ГХ.

Існує ряд статей, що описують кількісне визначення бензидаміну гідрохлориду [110, 147, 148] та метилпарабену [122, 149, 150] у готових лікарських формах за допомогою ВЕРХ. Однак одночасне визначення цих сполук у лікарських формах на сьогодні в літературі не описано.

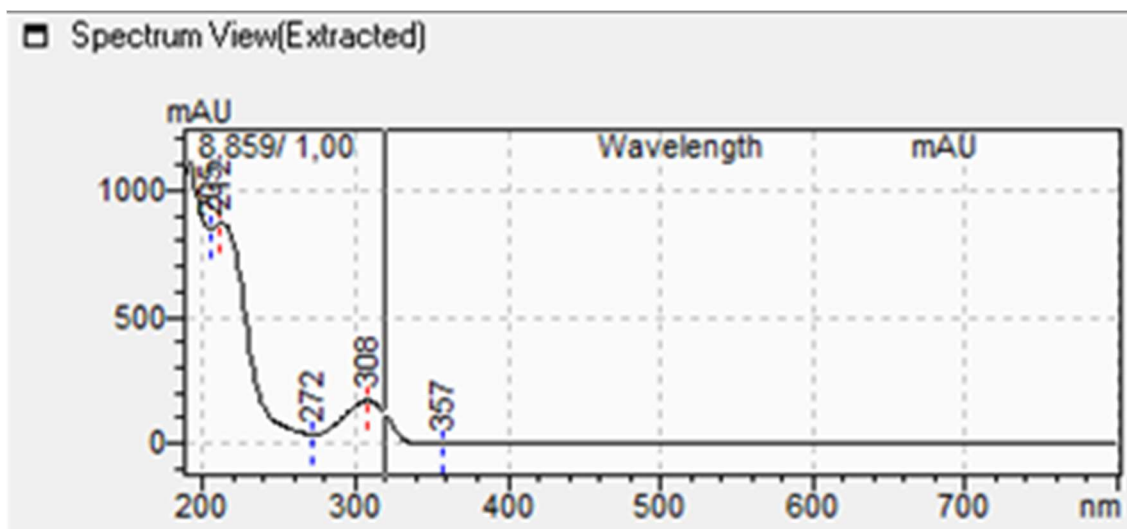
Розробка аналітичної методики одночасного кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену у лікарській формі як вже зазначалось раніше, є актуальною з точки зору мінімізації витрат, ресурсів, часу та реагентів. Нашим завданням було розробити відповідну методику та повести її валідацію відповідно до вимог ДФУ та Європейських нормативних вимог ІСН Q2.

Хроматографію проводили за допомогою рідинного хроматографа Shimadzu LC-20 з діодно-матричним детектором, автоматичним дозатором, дегазатором та насосом для чотирьохкомпонентних сумішей. Для обробки даних використовували програмне забезпечення LC Solution software.

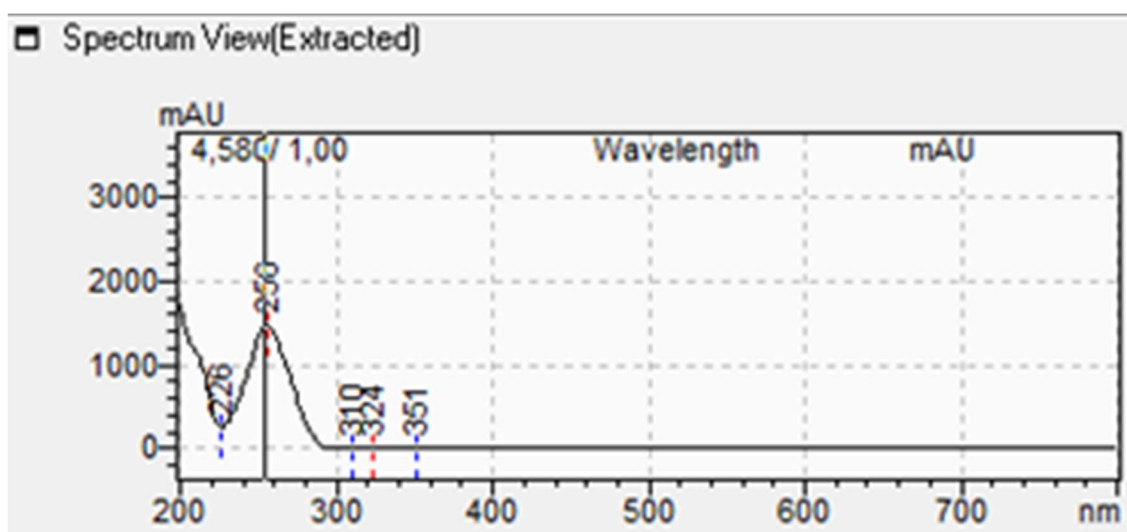
При розробці методики використовували розчини буферу перхлорату натрію з рН 3,0, 4,0 і 5,0. Для вибору найкращих показників випробовували нерухомі фази C8 і C18. Найкращі результати були отримані на сорбенті C18 при рН 3,0. За вказаних умов ефективність хроматографічної системи становила 8700 теоретичних тарілок для піку бензидаміну.

Довжина хвилі детектування визначалася за результатами аналізу спектрів поглинання бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену. Відповідно до

максимумів поглинання для бензидаміну гідрохлориду було обрано довжину хвилі 320 нм (Рис. 3.10а), а для метилпарабену – 254 нм (Рис. 3.10б).



а



б

Рис. 3.10 Спектри поглинання бензидаміну (а) та метилпарабену (б)

Для оптимізації розділення випробували різні співвідношення ацетонітрилу у рухомій фазі. Найкращого поділу було досягнуто у співвідношенні 1: 1.

Симетрію піків регулювали за допомогою триетиламіну.

Таким чином, хроматографію проводили за наступних умов:

- хроматографічна колонка GraceAlltima C18 (250 мм * 4,6 мм, розмір частинок 5 мкм);
- рухому фазу готували наступним чином: 3,0 перхлорату натрію розчиняли у 500 мл води, потім додавали 1,0 мл триетиламіну, доводили рН до 3,0 хлоридною кислотою і додавали 500 мл ацетонітрилу;
- швидкість потоку 1 мл / хв.;
- детектування проводили за довжини хвилі 320 і 254 нм;
- температура колонки кімнатна;
- об'єм введення стандартного та випробуваного розчинів 20 мкл.

Приготування розчинів:

Випробовуваний розчин. 5 мл препарату доводять розчинником до 50 мл та перемішують.

Розчин порівняння. 75 мг стандартного зразка Бензидаміну гідрохлориду та 50 мг стандартного зразка метилпарабену розчиняють у 30 мл розчинника та доводять до об'єму 50 мл та перемішують. 5 мл отриманого розчину доводять до об'єму 50 мл розчинником та перемішують.

Придатність хроматографічної системи оцінюють за наступними критеріями:

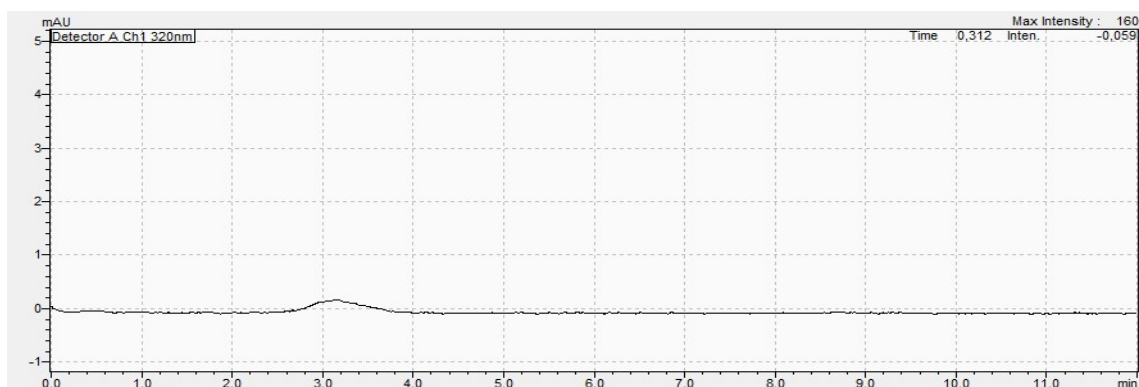
- Відносне стандартне відхилення для площі піку бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену із хроматограм стандартного розчину, не має перевищувати 0,5 % для трьох паралельних інжекцій.
- Коефіцієнт симетрії для піків бензидаміну та метилпарабену має становити не більше 2.0.

Валідація методики кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом ВЕРХ. Розроблена ВЕРХ методика була валідвана відповідно до вимог ДФУ [144] та ІСН Q2 [141] за наступними показниками: лінійність, прецизійність, правильність, робастність та специфічність.

Специфічність. Рухому фазу, розчинник, розчин плацебо, модельний розчин плацебо 1 та модельний розчин плацебо 2, стандартний та випробуваний

розчини вводили в умовах методики. Специфічність методу була продемонстрована відсутністю інтерференції між піками аналітів та піками плацебо на хроматограмах випробовуваного розчину. Приклади хроматограм рухомої фази та випробовуваного розчину при довжинах хвиль 320 нм та 254 нм наведено на рис. 3.11, 3.12. Таким чином, методика є специфічною для визначених аналітів

Лінійність методики кількісного визначення для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену вивчалася у діапазоні концентрацій 80–120% відносно концентрації відповідних аналітів у випробовуваному розчині. Для кожного з аналітів готували і хроматографували в умовах методу дев'ять модельних розчинів. Розрахунок параметрів лінійної залежності проводили методом найменших квадратів [151]. Графіки лінійної залежності кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду в умовах описаної методики в нормалізованих координатах наведено на рис. 3.13а, метилпарабену – 3.13б .

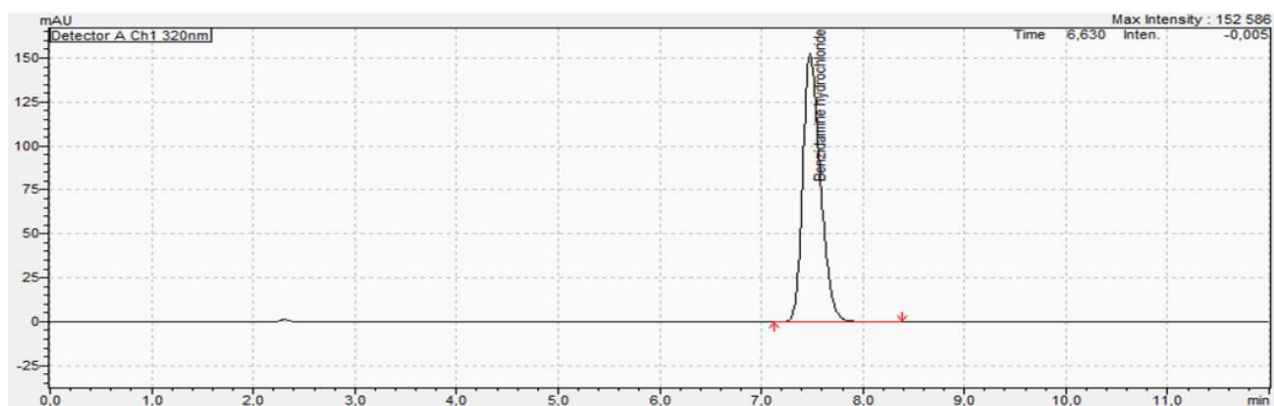


а

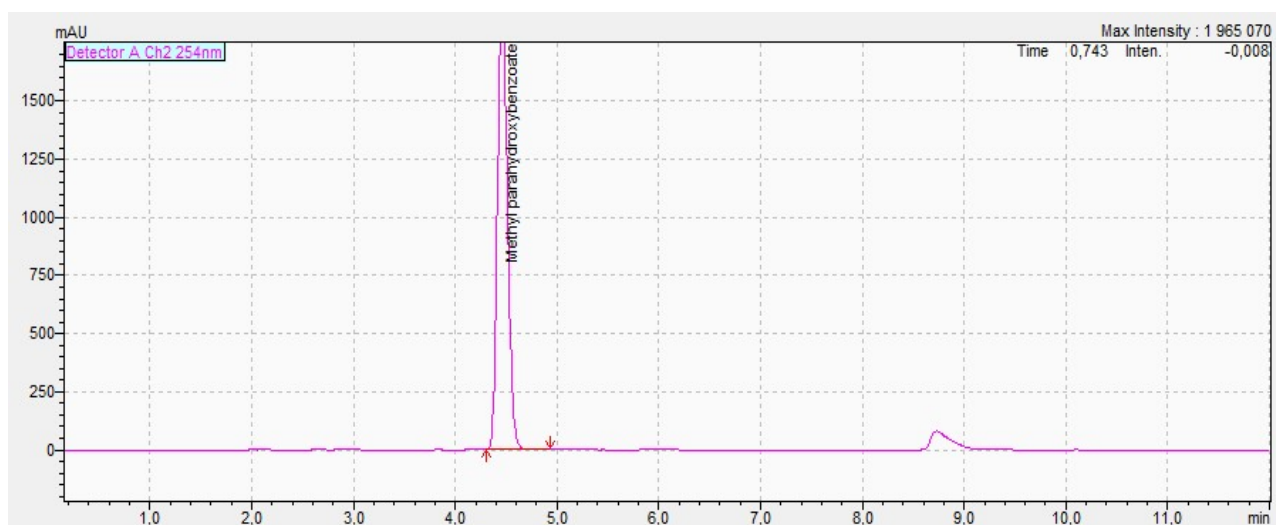


б

Рис. 3.11 Хроматограми плацебо при 320 нм (а) та 254 нм (б)



а



б

Рис. 3.12 Хроматограми випробуваного розчину при 320 нм (а) та 254 нм (б)

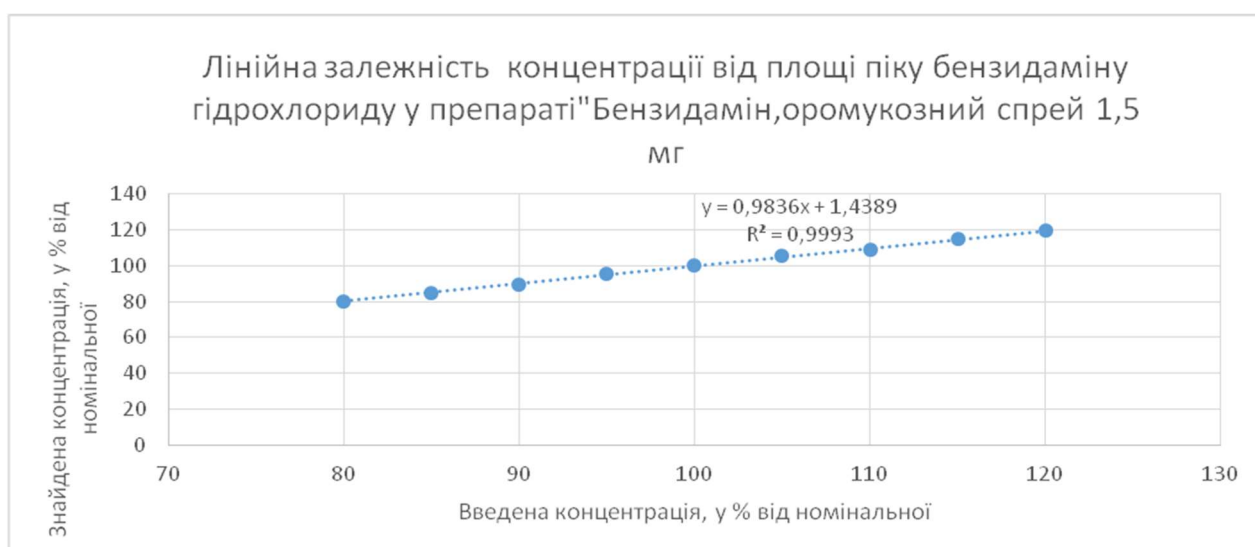
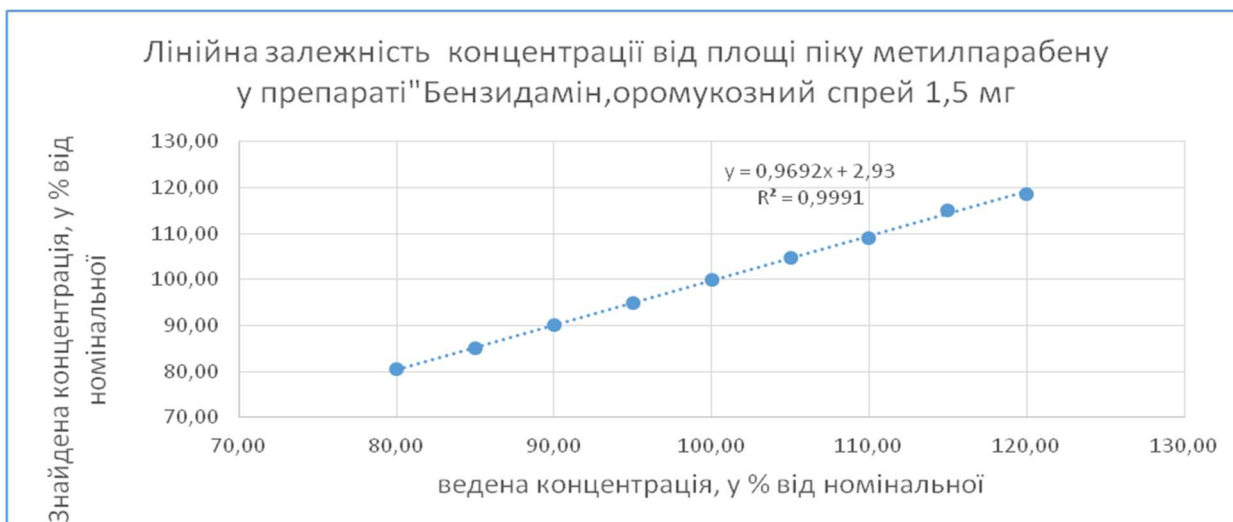


Рис. 3.13 а Графік лінійної залежності (введено/знайдено) для бензидаміну гідрохлориду



б

Рис. 3.13 Графік лінійної залежності (введено/знайдено) для бензидаміну гідрохлориду (а) та метилпарабену (б)

Отримані результати для лінійності методики визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену наведені в таблиці 3.12.

Отримані результати показують, що метод є лінійним для визначених речовин. Коефіцієнт кореляції становить більше 0,999 для обох речовин. Відносне стандартне відхилення знаходиться в межах 1,0% для обох аналітів.

Виконується критерій незначущості систематичної похибки методики – систематична похибка методики (0,18 для бензидаміну та 0,10 для метилпарабену) є практично незначущою, тобто методика аналізу характеризується достатньою правильністю в усьому діапазоні концентрацій від 80 до 120 % (табл. 3.12).

Методика аналізу також відповідає вимогам прецизійності (збіжності), оскільки знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Z (0,73 для бензидаміну та 0,99 для метилпарабену) менше критичного значення для збіжності результатів (1,6 % та 3,2% відповідно) (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Результати визначення лінійності для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену

Введено в % до концентрації і розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{sb}$, %)	Бензидаміну гідрохлорид		Метилпарабен		
	Знайдено в % до концентрації і розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	Знайдено в % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i / X_i)$ %	Введено в % до концентрації і розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{sb}$, %)	Знайдено в % до концентрації і розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	Знайдено в % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i / X_i)$ %
80	80,13	100,16	80,00	80,47	100,59
85	84,81	99,78	85,00	85,17	100,20
90	89,69	99,66	90,00	90,09	100,10
95	95,31	100,33	95,00	95,03	100,03
100	100	100,00	100,00	100,00	100,00
105	105,16	100,15	105,00	104,88	99,89
110	109,01	99,10	110,00	109,17	99,25
115	114,78	99,81	115,00	115,22	100,19
120	119,3	99,42	120,00	118,62	98,85
<i>Середнє значення</i>		99,82			99,90
<i>RSD_Z, %</i>		0,39			0,53
Відносний довірчий інтервал $\Delta_Z(\%) = t(95, n - 1) \times RSD_Z = 1,860 \times RSD_Z, \%$		0,73			0,99
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{As}, \%$ (гранична невизначеність)		1,6			3,2
Систематична похибка $\delta = \bar{Z} - 100 $		0,18			0,10

Продовж. табл.3.12

<p>Критерій незначущості систематичної похибки</p> $\delta\% = \frac{\Delta z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta z}{3} = \frac{0,73}{3} = 0,24 (0,18 \leq 0,24)$ <p>якщо не виконується 1), то $\delta \leq 0,32 \times 5.0 = 1.6\%$ $(0,24 \leq 1.6)$</p>	<p>Не виконується</p> <p>Виконується</p>	<p>Критерій незначущості систематичної похибки</p> $\delta\% = \frac{\Delta z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta z}{3} = \frac{0,99}{3} = 0,33 (0,33 \geq 0,10)$ <p>якщо не виконується 1), то $\delta \leq 0,32 \times 10 = 3,2\%$ $(0,33 \leq 3,2)$</p>	<p>Не виконується</p> <p>Виконується</p>
Загальний висновок про методику	Коректна		Коректна

Таблиця 3.13

Метрологічні характеристики лінійної залежності для бензидаміну та метилпарабену

Параметр	Умовне позначення	Критерій прийнятності для допуску 95%-105%	Отримане значення для бензидаміну гідрохлориду	Критерій прийнятності для допуску 90%-110%	Отримане значення метилпарабену
Коефіцієнт кореляції	r	$\geq 0,9981$	0,9993	$\geq 0,9924$	0,9991
Вільний член рівняння	a	$\leq 2,6$	1,438	$\leq 5,1$	0,293
Нахил лінії регресії	b	—	0,0098		0.9692
Стандартне відхилення	S _A	—	0,99		1,12
Тангенс кута нахилу для розрахованої	S _b	—	0,0102		0,0110

регресійної прямої;					
Залишкове стандартне відхилення	S_r	$\leq 0,84$	0,38	$\leq 1,69$	0,43

Внутрішньолабораторна прецизійність.

Дослідження внутрішньо лабораторної прецизійності проводили на 5 пробах однієї серії препарату, двома аналітиками, в різні дні, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta \bar{Z} \leq 1,6$ (при $V = 5\%$) та $\leq 3,2$ (при $V = 10\%$).

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату ($\Delta \bar{Z} = 0,24\%$ для бензидаміну та $0,16\%$ для метилпарабену) задовольняє критерію прийнятності ($\leq 1,6\%$ для бензидаміну та $3,2\%$ для метилпарабену) Результати вивчення внутрішньолабораторної прецизійності наведені в таблиці 3.14.

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату ($\Delta = 0,24\%$ для бензидаміну та $0,16\%$ для метилпарабену) задовольняє критерію прийнятності ($\leq 1,6\%$ для бензидаміну та $3,2\%$ для метилпарабену).

Невизначеність кінцевої аналітичної операції розраховували за співвідношенням

$$\Delta_{FAO}, \% = \sqrt{2} \times \frac{RSD_{max} \times t_{95\%,n-1}}{\sqrt{n}};$$

Де:

- RSD_{max} – відносне стандартне відхилення (%), що описане у вимогах до придатності хроматографічної системи;

- $t_{95\%,n-1}$ – односторонній коефіцієнт Стьюдента для імовірності 95 %;
- n – число паралельних хроматограм

Таблиця 3.14

**Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності для
бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену**

№ розчину	бензидаміну гідрохлорид		метилпарабен	
	Величина Z_i , %		Величина Z_i , %	
	1 аналітик	2 аналітик	1 аналітик	2 аналітик
1	99,81	100,63	100,31	100,16
2	99,79	100,34	100,24	99,66
3	100,02	100,28	99,76	99,78
4	100,18	100,57	99,91	100,38
5	99,93	100,11	100,42	99,79
Середнє \bar{Z} (%), $\bar{Z}(\%) = \frac{1}{5} \sum Z_i$	99,94	100,38	100,128	99,954
Об'єднане середнє	100,17		100,041	
Відносне стандартне відхилення, RSD _Z (%), $RSD_Z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \bar{Z})^2}{15}} \times \frac{100}{\bar{Z}}$	0,31		0,20	
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_{\bar{Z}} =$ $t(95\%, 14) \times \frac{RSD_Z}{\sqrt{5}}$	1,76 × 0,31 / $\sqrt{5} = 0,24 \leq 1,6$		1,76 × 0,31 / $\sqrt{5} = 0,16 \leq 3,2$	
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1,6		3,2	

Таблиця 3.15

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину бензидаміну гідрохлориду

<i>№ n/n</i>	<i>Операції пробопідготовки</i>	<i>Невизначеність</i>
Розчин порівняння		
1.	Взяття наважки стандарту	$(0,2 \text{ мг} / 150 \text{ мг}) \cdot 100 \% = 0,13 \%$
2.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
3.	Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	0,25 %
4.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Випробовуваний розчин		
5.	Взяття аліквоти препарату 10 мл	0,25 %
6.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0,13^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2} = 0,42$		

Таким чином невизначеність кінцевої аналітичної операції склала:

$$\Delta_{FAO}, \% = \sqrt{2} \times \frac{0,5 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 1,18\%;$$

Прогнозуєма повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально припустиму невизначеність результатів аналізу для допусків вмісту $\pm 5,0 \%$ складає $\max \Delta_{As} \leq 1,6 \%$.

Розрахунок $\Delta_{As}, \%$ проводили з урахуванням невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції:

$$\Delta_{AS}, \% = \sqrt{0,42^2 + 1,18^2} = 1,25\% \text{ в } \Delta_{A\text{ст}еор} = 1,6\%$$

Таким чином, повна прогнозуєма невизначеність результатів для тесту кількісне визначення бензидаміну гідрохлориду методом ВЕРХ не більше критичного значення $\Delta_{A\text{ст}еор} = 1,6\%$, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Аналогічно розраховували невизначеність для визначення метилпарабену.

Таблиця 3.16

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину метилпарабену

<i>№ n/n</i>	<i>Операції пробопідготовки</i>	<i>Невизначеність</i>
Розчин порівняння		
1.	Взяття наважки стандарту	$(0,2 \text{ мг} / 100\text{мг}) \cdot 100 \% = 0,2 \%$
2.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
3.	Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	0,25 %
4.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Випробовуваний розчин		
5.	Взяття аліквоти препарату 10 мл	0,25 %
6.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0,2^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2} = 0,46\%$		

Невизначеність кінцевої аналітичної операції складала:

$$\Delta_{FAO}, \% = \sqrt{2} \times \frac{0,5 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 1,18\%;$$

Сумарна невизначеність:

$$\Delta_{AS}, \% = \sqrt{0,46^2 + 1,18^2} = 1,27\% \text{ а } \Delta_{A_{\text{стєор}}} = 3,2\%$$

Повна прогнозуєма невизначеність результатів для тесту кількісне визначення метилпарабену методом ВЕРХ не більше критичного значення $\Delta_{A_{\text{стєор}}} = 3,2\%$, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Придатність хроматографічної системи. Стандартний розчин вводили п'ять разів. Результати наведені в таблицях 3.17–3.19.

Робасність методики була підтверджена шляхом вивчення надійності хроматографічної процедури та стабільності випробуваних розчинів.

Стабільність розчинів досліджували шляхом введення одних і тих же розчинів з різницею у 24 та 48 годин. Результати дослідження стабільності розчину наведені в таблиці 3.20.

Робасність методики була показана шляхом варіації таких хроматографічних параметрів як: зміна рН у діапазоні $\pm 1,0$; зміна швидкості потоку в межах $\pm 10\%$; затримка часу проведення аналізу на 24 та 48 годин. Отримані дані свідчать, що результати аналізу є надійними і не залежать від незначних змін параметрів методики.

Результати дослідження робасності наведені у таблицях 3.21 та 3.22.

Таким чином, розроблена аналітична методика є швидкою, специфічною, робасною, точною та лінійною. Результати валідації вказують на те, що методика відповідає своєму призначенню і може бути використана для одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену. Запропонована оригінальна методика одночасного визначення бензидаміну та метилпарабену в спреї оромукозному, що відповідає принципу «зеленої аналітичної хімії» щодо одночасного визначення декількох компонентів.

Таблиця 3.17

Розраховані дані для піку бензидаміну гідрохлориду

<i>Площа піку</i>	<i>RSD, %</i>	<i>Коефіцієнт симетрії</i>
1906339	0,02	1,15
1906741		
1906668		
1905940		
1905940		

Примітка. RSD,% – відносне стандартне відхилення у %.

Таблиця 3.18

Розраховані дані для піку метилпарабену

<i>Площа піку</i>	<i>RSD, %</i>	<i>Коефіцієнт симетрії</i>
13944562	0,07	1,101
13956871		
13962528		
13953774		
13958145		

Примітка. RSD,% – відносне стандартне відхилення у %.

Таблиця 3.19

Критерії придатності хроматографічної системи

<i>Аналіт</i>	<i>Параметр</i>	<i>Отримане значення</i>	<i>Критерій прийнятності</i>
Бензидаміну гідрохлорид	Коефіцієнт симетрії піку	1,15	0,8-1,2
	Відносне стандартне відхилення для площі піку бензидаміну гідрохлориду із хроматограм розчину порівняння, %	0,02	≤ 0,5 %
Метилпарабен	Коефіцієнт симетрії піку	1,107	0,8-1,2
	Відносне стандартне відхилення для площі піку метилпарабену порівняно із хроматограм розчину порівняння, %	0,07	≤ 0,5 %

Таблиця 3.20

Результати вивчення стабільності розчину

<i>Термін зберігання</i>	<i>0 годин</i>	<i>24 годин</i>	<i>48 годин</i>
	<i>Бензидаміну гідрохлорид</i>		
Різниця між площами піків стандартного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	1,68	3,70
Різниця між площами піків випробуваного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	0,22	0,63
	<i>Метилпарабен</i>		
Різниця між площами піків стандартного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	1,67	3,63
Різниця між площами піків випробуваного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	0,24	0,69

Таблиця 3.21

Результати вивчення впливу швидкості потоку

<i>Швидкість потоку, мл / хв</i>	<i>Різниця між площами піків бензидаміну гідрохлориду S(TS)/S(RS) відносно встановлених умов, %</i>	<i>Різниця між площами піків метилпарабену S(TS)/S(RS) відносно встановлених умов, %</i>
1,0	—	—
0,9	0,19	0,15
1,1	0,28	0,20

Таблиця 3.22

Результати вивчення впливу рН

<i>рН рухомої фази</i>	<i>Різниця між площами піків бензидаміну гідрохлориду S(TS)/S(RS) відносно встановлених умов, %</i>	<i>Різниця між площами піків метилпарабену S(TS)/S(RS) відносно встановлених умов, %</i>
рН 3,0	—	—
рН 2,0	0,46	0,37
рН 4,0	0,72	1,10

3.2 Розробка та валідація методики кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом газової хроматографії

Враховуючи тенденції сучасних досліджень, подальше занурення у підхід «зеленої хімії» може бути здійснено шляхом розробки альтернативного аналітичного методу за допомогою недефективної рідинної хроматографії або ГХ.

Порівняно з методом ВЕРХ, ГХ має ряд беззаперечних переваг, а саме: швидкість методу, відносно низька вартість, а також менший вплив на навколишнє середовище. Наприклад, використання інертних газів-носіїв замість токсичних розчинників, модифікованих солями органічних кислот та основ, меншим об'ємом

введеного зразку, швидкістю аналізу та використанням вискоєфективних капілярних колонок корелює з принципами «зеленої хімії».

Метою цього розділу була розробка та валідація методики одночасного визначення бензидамін гідрохлориду та метилпарабену в готовій лікарській формі із застосуванням методу ГХ.

Британська фармакопея описує кількісне визначення бензидаміну гідрохлориду за допомогою ГХ [111] з екстракцією хлороформом з використанням неполярної фази (OV-17). У цьому випадку одночасне кількісне визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену є досить проблематичним через тривалу та складну пробопідготовку та пов'язану з цим невизначенність кінцевої процедури.

Розробка аналітичної методики. За основу методики було взято монографію Британської фармакопеї для визначення бензидаміну у готовій лікарській формі. Хроматографію проводили за допомогою газового хроматографа Agilent 7890 з полуменево-іонізаційним детектором, автоматичним дозатором та інжектором з інжектором для введення проб із діленням потоку. Для збору даних було використано програмне забезпечення Chemstation.

Вибір умов екстракції та внутрішнього стандарту. Розробка методики розпочалася з підбору умов пробопідготовки. У монографії Фармакопеї описано екстракцію хлороформом після обробки випробуваного розчину лугом. Однак така процедура пробопідготовки не підходить для визначення метилпарабену, оскільки значення рН розчину більше 8,0 призводить до деградації молекули та неможливості подальшого кількісного визначення аналіту. При виборі умов екстракції було встановлено, що оптимальний рН середовища – 6,0–7,0. За цих умов деградація визначених речовин не відбувається і вони повністю мігрують до органічного розчинника. В якості органічного розчинника обрали хлороформ. В якості внутрішнього стандарту було обрано побічний продукт синтезу бензидаміну гідрохлориду – домішку А, водний розчин якого готували в концентрації, що дорівнює концентрації бензидаміну в готовій лікарській формі (1,5 мг / мл).

Таким чином, для аналізу брали 5 мл випробуваного препарату, додавали 5 мл розчину внутрішнього стандарту та 10 мл хлороформу. Після інтенсивного перемішування розчин зливали та відокремлювали органічний шар за допомогою роздільної воронки. Хлороформний екстракт використовували в якості випробуваного розчину.

Вибір концентрацій випробуваних розчинів. Початкові концентрації бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену в препараті становлять 1,5 та 1,0 мг / мл відповідно. Після приготування випробуваного зразка у кінцевому розчині концентрації аналітів становлять 0,15 та 0,1 мг / мл, що відповідає концентраціям 0,15 та 0,1 мкг / мкл під час хроматографії. За цих концентрацій перевантаження колони не спостерігалось, піки мали прийнятну симетрію. Тому для проведення аналізу були обрані такі концентрації аналітів у випробуваному розчині.

Приготування вихідного розчину. Стандартні зразки бензидаміну гідрохлориду (150 мг) та метилпарабену (100 мг) зважують та розчиняють окремо у 100 мл води при невеликому нагріванні для отримання розчину з кінцевою концентрацією 1,5 мг / мл бензидаміну гідрохлориду та 1,0 мг / мл для метилпарабену.

Приготування розчину внутрішнього стандарту. 150 мг домішки бензидаміну А (внутрішній стандарт) зважують і розчиняють у 100 мл води для отримання розчину з кінцевою концентрацією 1,5 мг / мл.

Приготування стандартного розчину. По 5 мл вихідного розчину і розчину внутрішнього стандарту переносять у колбу об'ємом 50 мл, розчиняють у 10 мл хлороформу і доводять об'єм розчину водою до 50 мл. Після інтенсивного струшування приготованого розчину хлороформний шар відокремлюють і використовують для аналізу.

Приготування випробуваного розчину. Препарат, що містить бензидаміну гідрохлориду та метилпарабен, беруть у кількості 5 мл і переносять у мірну колбу об'ємом 50 мл. Додають 5 мл розчину внутрішнього стандарту і 10 мл хлороформу. Об'єм отриманого розчину доводять водою до 50 мл. Після

інтенсивного струшування приготованого розчину хлороформний шар відокремлюють і використовують для аналізу.

Скринінг нерухомої фази. Полярність нерухомої фази є ключовим фактором для успішного розділення компонентів у ГХ. Використання колонок з полярною фазовою, відмінною від полярності аналітів, може призвести до розмивання піків, поганого утримування та незадовільної селективності методики, що, нарешті, призводить до неправильних результатів кількісного визначення аналітів. Тому вибір нерухомої фази є ключовим фактором аналізу. Оскільки бензидамін та метилпарабен є висококиплячими речовинами, при виборі колонки ми відштовхувались від термічно стабільної фази. Використовували фази різної полярності: HP-INNOWAX (ПЕГ), HP-FFAP (ПЕГ, модифікований нітротерефталевою кислотою), DB-624 (6% ціанопропілфеніл / 94% диметил (полі) силоксан) та HP-5 (5% дифеніл / 95% диметил (полі) силоксан).

Для аналізованих речовин найкраща селективність та симетрія піків спостерігалися при використанні неполярної фази HP-5 з геометрією колонки 30 м x 0,32 мм x 0,25 мкм (Рис. 3.20).

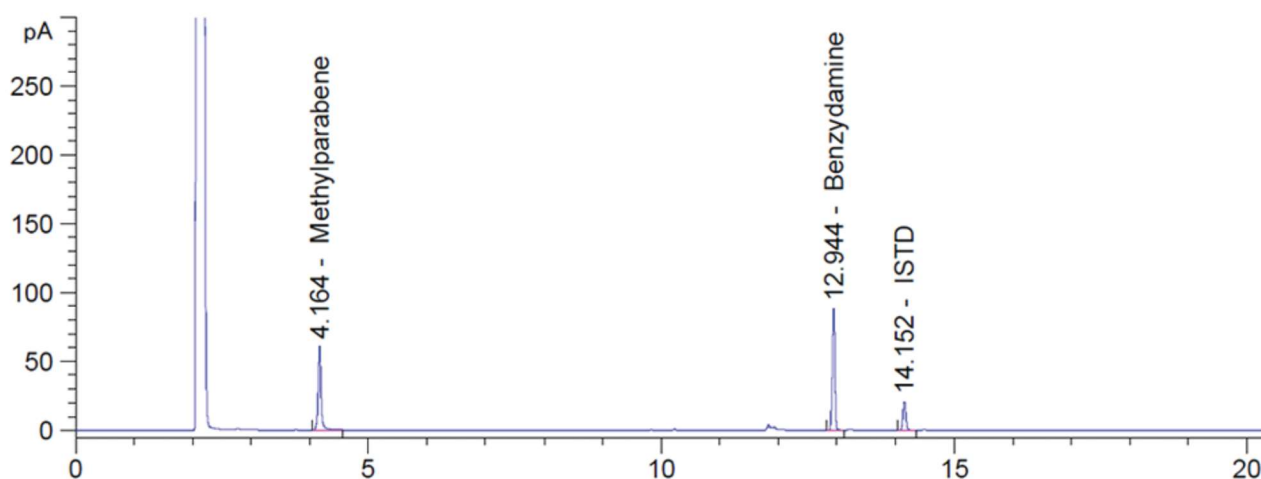


Рис. 3.14 Хроматограма бензидаміну та метилпарабену на колонці HP-5

Вибір параметрів інжектора. Щоб уникнути перевантаження колонки, в хроматограф вводили 1 мкл випробуваного розчину. Враховуючи концентрацію аналітів у випробуваному розчині, було обрано розведення 1:20. Враховуючи

високі температури кипіння бензидаміну та метилпарабену (474 °C та 265 °C відповідно), а також суттєву різницю у температурі кипіння, необхідно було обрати таку температуру інжектора, яка забезпечить рівномірне випаровування аналітів та водночас не призводила до дискримінації компонентів зразку. Випробовували три температури: 230, 270 та 300 °C. Перші два варіанти не забезпечували достатню енергію для випаровування бензидаміну, тоді як при температурі 300 °C спостерігалася достатня відтворюваність площ піків без деградації аналітів.

В якості вставки у лайнер використовували деактивоване скловолокно.

Вибір температурної програми хроматографії. У разі різниці температур кипіння аналізованих речовин, а також різниці хімічних властивостей ізотермічний режим поділу дав істотну різницю у часі утримування бензидаміну та метилпарабену. Під час попередніх досліджень було встановлено, що метилпарабен елююється при температурі 220 °C. При цій температурі час утримування бензидаміну становить близько 30 хвилин. Оптимальна температура для елюювання бензидаміну становила 270 °C. Тому під час вибору градієнта температур була встановлена програма терморегулятора з початковою температурою 220 °C протягом 5 хвилин з подальшим підвищенням до температури 270 °C зі швидкістю 20 °C / хв. та часом витримування 10 хв.

Для запобігання конденсації зразку в детекторі його температуру встановлювали на 30 °C вище, ніж кінцеву температуру термостату.

Таким чином, хроматографію проводили за наступних умов:

- інжектор: температура 300 °C; розведення зразку 1:20;
- колонка: HP-5 (30 м x 0,32 мм) з розміром частинок 0,25 мкм;
- газ-носії: гелій;
- детектор: полуменево-іонізаційний; температура 300 °C;
- температурна програма: початкова температура 220 °C протягом 5 хвилин з подальшим підвищенням до температури 270 °C зі швидкістю 20 °C / хв. та часом витримування 10 хв.;
- швидкість потоку: 3 мл / хв.;

- об'єм введення: 1 мкл.

Придатність системи оцінювали за наступними параметрами:

- Відносне стандартне відхилення для площі піку бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену із хроматограм стандартного розчину, не має перевищувати 0,5 % для трьох паралельних інжекцій.
- Коефіцієнт симетрії для піків бензидаміну та метилпарабену має становити не більше 2.0

Валідація методики кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену методом газової хроматографії. Валідація методики проводилася за наступними параметрами: специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, робасність.

Лінійність для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену. Співвідношення знайденої кількості бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену (Y) до заданої кількості (X), тобто залежність виду $Y = B \cdot X + A$, визначали за допомогою методу найменших квадратів для дев'яти модельних розчинів бензидаміну гідрохлориду. Результати наведено на рис. 3.15, 3.16

Метрологічні характеристики лінійної залежності для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену розраховані дані лінійності наведені в таблицях 3.23 та 3.24.

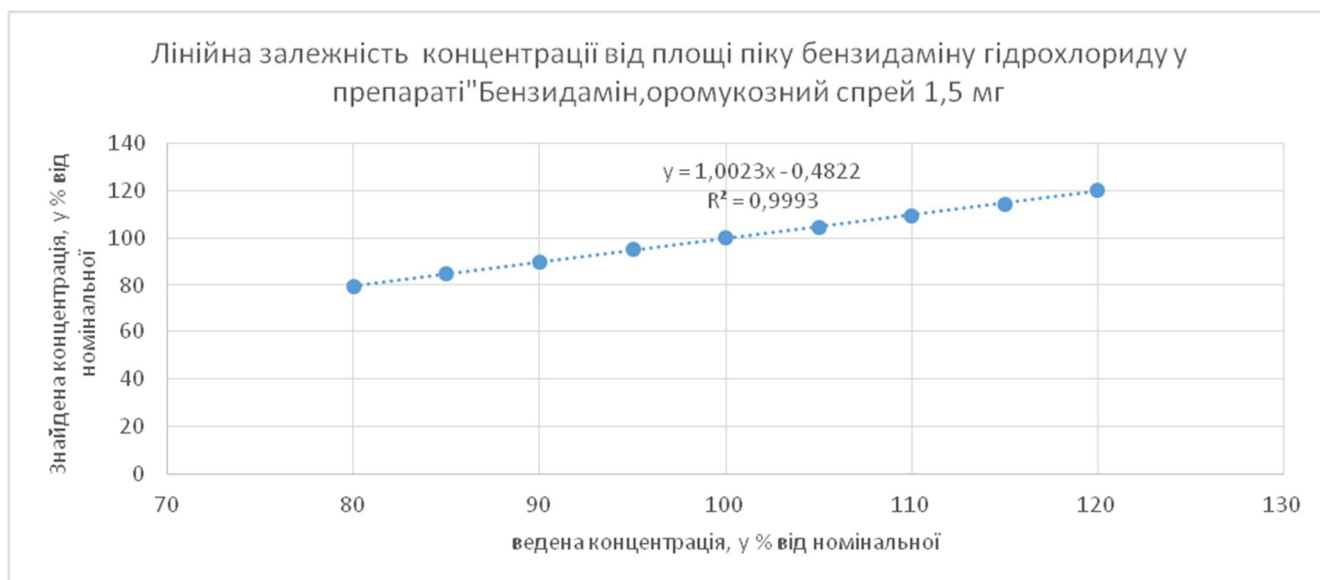


Рис. 3.15 Результати дослідження лінійності (введено/найдено) бензидаміну гідрохлориду

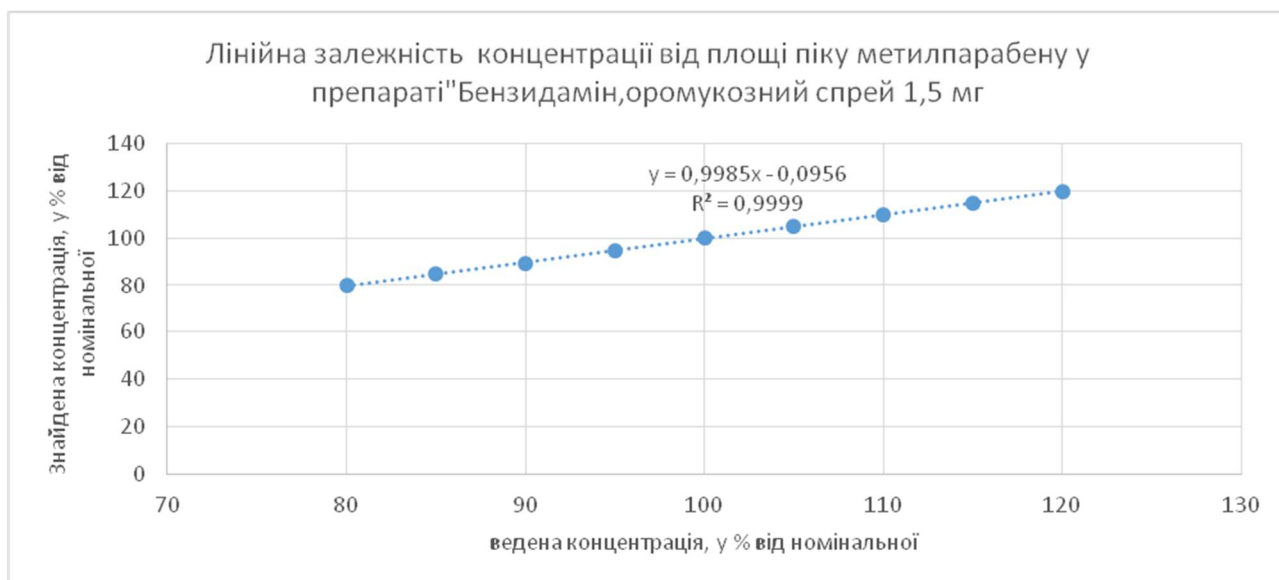


Рис. 3.16 Лінійна залежність метилпарабену

Таким чином, отримані результати показують задовільну лінійність, правильність та повторюваність методики для визначення бензидаміну гідрохлориду. Коефіцієнт кореляції лінійної регресії становить більше 0,999 в діапазоні визначення 80%-120% що відповідає вимогам критерію прийнятності(0,998) і підтверджує лінійність залежності між «введеною» і «знайденою» кількістю досліджуваної речовини.

Таблиця 3.23

Метрологічні характеристики лінійної залежності для бензидаміну та метилпарабену

<i>Параметр</i>	<i>Умовне позначення</i>	<i>Критерій прийнятності для допуску 95%-105%</i>	<i>Отримане значення для бензидаміну у гідрохлориді у</i>	<i>Критерій прийнятності для допуску 90%-110%</i>	<i>Отримане значення метилпарабену</i>
Коефіцієнт кореляції	r	$\geq 0,9981$	0,9993	$\geq 0,9924$	0,9999
Вільний член рівняння	a	$\leq 2,6$	0,4822	$\leq 5,1$	0,0956
Нахил лінії регресії	b	—	1,0023		0,9985
Стандартне відхилення	S_A	—	1,02		1,02
Тангенс кута нахилу для розрахованої регресійної прямої;	S_b	—	0,0101		0,0101
Залишкове стандартне відхилення	S_r	$\leq 0,84$	0,3926	$\leq 1,69$	0,39

Таблиця 3.24

Розраховані дані лінійності для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену

Введено в % до концентрації ї розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Бензидаміну гідрохлорид		Метилпарабен		
	Знайдено в % до концентрації ї розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	Знайдено в % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$ %	Введено в % до концентрації ї розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Знайдено в % до концентрації ї розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	Знайдено в % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$ %
80	79,57	99,46	80,00	79,87	99,84
85	84,75	99,71	85,00	84,73	99,68
90	89,66	99,63	90,00	89,49	99,43
95	95,15	100,16	95,00	94,86	99,85
100	99,96	99,96	100,00	99,96	99,96
105	104,62	99,63	105,00	104,76	99,77
110	109,47	99,52	110,00	109,74	99,77
115	114,18	99,29	115,00	114,70	99,74
120	120,40	100,33	120,00	119,68	99,73
Середнє значення		99,79		99,75	99,90
RSD_Z , %		0,34		0,15	0,53
Відносний довірчий інтервал $\Delta_Z(\%) = t(95, n - 1) \times RSD_Z = 1,860 \times RSD_Z$, %		0,63		0,28	0,99
Критичне значення для збіжності результатів Δ_{As} , % (гранична невизначеність)		відповідає ε (0,63 < 1,6)		відповідає (0.28 < 3.2)	3,2
Систематична похибка $\delta = \bar{Z} - 100 $		0,21		0,25	0,10

Продовж. табл.3.24

<p>Критерій незначущості систематичної похибки</p> $\delta\% = \frac{\Delta z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta z}{3} = \frac{0,73}{3} = 0,24(0,18 \leq 0,24)$ <p>якщо не виконується 1), то</p> $\delta \leq 0,32 \times 5.0 = 1.6\%$ $(0,24 \leq 1.6)$	<p>відповідає</p> $(0,21 < 0,51)$	<p>Критерій незначущості систематичної похибки</p> $\delta\% = \frac{\Delta z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta z}{3} = \frac{0,99}{3} = 0,33(0,33 \geq 0,10)$ <p>якщо не виконується 1), то</p> $\delta \leq 0,32 \times 10 = 3,2\%$ $(0,33 \leq 3,2)$	<p>відповідає</p> $(0,25 < 1,02)$
<p>Загальний висновок про методикау</p>	<p>Коректна</p>		<p>Коректна</p>

Методика аналізу також характеризується достатньою прецизійністю, так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Z (0,63) менше критичного значення для збіжності результатів (1,6 %).

Отримані результати показують, що методика є лінійною для визначення метилпарабену в діапазоні концентрацій 80%-120%, відносно номінального значення (1 мг/мл). Коефіцієнт кореляції лінійної регресії становить 0,9999, що задовольняє вимогам критерію прийнятності 0,9923.

Методика аналізу також характеризується достатньою прецизійністю, та правильністю. Знайдене значення відносного довірчого інтервалу величини Z (0,28) менше критичного значення для збіжності результатів (3,2 %).

Внутрішньо лабораторна прецизійність.

Дослідження внутрішньо лабораторної прецизійності проводили на 5 пробах однієї серії препарату, двома аналітиками, в різні дні, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta \bar{Z} \leq 1,6$ (при $V = 5\%$) та $\leq 3,2$ (при $V = 10\%$).

Внутрішньолабораторна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних

визначень однієї серії препарату ($\Delta\bar{Z} = 0,24\%$ для бензидаміну та $0,097\%$ для метилпарабену) задовольняє критерію прийнятності ($\leq 1,6\%$ для бензидаміну та $3,2\%$ для метилпарабену) (табл. 3.25).

Таблиця 3.25

Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену

№ розчину	бензидаміну гідрохлорид		метилпарабен	
	Величина Z_i , %		Величина Z_i , %	
	1 аналітик	2 аналітик	1 аналітик	2 аналітик
1	99,93	99,54	99,04	99,22
2	99,76	99,87	98,75	99,13
3	99,84	99,49	98,99	99,19
4	99,65	99,37	99,33	99,27
5	99,71	99,61	98,69	99,41
Середнє \bar{Z} (%), $\bar{Z}(\%) = \frac{1}{5} \sum Z_i$	99,77	99,57	98,96	99,244
Об'єднане середнє	99,67		99,102	
Відносне стандартне відхилення, RSD _Z (%), $RSD_Z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \bar{Z})^2}{15}} \times \frac{100}{\bar{Z}}$	0,14		0,20	
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_{\bar{Z}} = t(95\%, 14) \times \frac{RSD_Z}{\sqrt{5}}$	$1,76 \times 0,14 / \sqrt{5} = 0,11 \leq 1,6$		$1,76 \times 0,31 / \sqrt{5} = 0,16 \leq 3,2$	
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1,6		3,2	

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину бензидаміну гідрохлориду

<i>№ n/n</i>	<i>Операції пробопідготовки</i>	<i>Невизначеність</i>
Розчин порівняння		
1.	Взяття наважки стандарту, та внутрішнього стандарту	$(0,2 \text{ мг} / 150 \text{ мг}) \cdot 100 \% = 0,13 \%$; $(0,2 \text{ мг} / 150 \text{ мг}) \cdot 100 \% = 0,13 \%$;
2.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
3	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
4	Взяття аліквоти піпеткою 5 мл	0,37 %
5	Взяття аліквоти піпеткою 5 мл	0,37 %
6	Доведення до об'єму в мірній колбі на 50 мл	0,17 %
Випробовуваний розчин		
5.	Взяття аліквоти препарату 5 мл	0,37 %
6.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 50 мл	0,17 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0,13^2 + 0,13^2 + 0,12^2 + 0,12^2 + 0,37^2 + 0,37^2 + 0,17^2 + 0,37^2 + 0,17^2} = 0,53$		

Невизначеність кінцевої аналітичної операції розраховували за співвідношенням

$$\Delta_{FAO}, \% = \sqrt{2} \times \frac{RSD_{max} \times t_{95\%,n-1}}{\sqrt{n}};$$

Де:

- RSD_{max} – відносне стандартне відхилення (%), що описане у вимогах до придатності хроматографічної системи;
- $t_{95\%,n-1}$ – односторонній коефіцієнт Стюдента для імовірності 95 %;
- n – число паралельних хроматограм

Таким чином невизначеність кінцевої аналітичної операції складала:

$$\Delta_{FAO}, \% = \sqrt{2} \times \frac{0,5 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 1,18\%;$$

Прогнозуєма повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально припустиму невизначеність результатів аналізу для допусків вмісту $\pm 5,0$ % складає $\max \Delta_{As} \leq 1,6$ %.

Розрахунок $\Delta_{As}, \%$ проводили з урахуванням невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції:

$$\Delta_{As}, \% = \sqrt{0,53^2 + 1,18^2} = 1,39\% \quad \Delta_{Asteop} = 1,6\%$$

Таким чином, повна прогнозуєма невизначеність результатів для тесту кількісне визначення бензидаміну гідрохлориду методом ГХ не більше критичного значення $\Delta_{Asteop} = 1,6$ %, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Аналогічно розраховували невизначеність для визначення метилпарабену.
Табл.3.27.

Повна прогнозуєма невизначеність результатів для тесту кількісне визначення метилпарабену методом ГХ не більше критичного значення $\Delta_{Asteop} = 3,2$ %, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Невизначеність кінцевої аналітичної операції складала:

$$\Delta_{FAO}, \% = \sqrt{2} \times \frac{0,5 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 1,18\%;$$

Сумарна невизначеність:

$$\Delta_{AS}, \% = \sqrt{0,46^2 + 1,18^2} = 1,40\% \leq \Delta_{A_{\text{теор}}} = 3,2\%$$

Таблиця 3.27

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину метилпарабену

<i>№ n/n</i>	<i>Операції пробопідготовки</i>	<i>Невизначеність</i>
Розчин порівняння		
1.	Взяття наважки стандарту, та внутрішнього стандарту	(0,2 мг / 100 мг) · 100 % = 0,2 %; (0,2 мг / 150 мг) · 100 % = 0,13 %;
2.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
3	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
4	Взяття аліквоти піпеткою 5 мл	0,37 %
5	Взяття аліквоти піпеткою 5 мл	0,37 %
6	Доведення до об'єму в мірній колбі на 50 мл	0,17 %
Випробовуваний розчин		
5.	Взяття аліквоти препарату 5 мл	0,37 %
6.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 50 мл	0,17 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0,2^2 + 0,13^2 + 0,12^2 + 0,12^2 + 0,37^2 + 0,37^2 + 0,17^2 + 0,37^2 + 0,17^2} = 0,55$		

Специфічність. Щоб підтвердити специфічність методики, вводили розчинник та розчин плацебо препарату. Інтерференції між піками метилпарабену, внутрішнього стандарту та бензидаміну з піками плацебо не спостерігалось. Час утримування аналітів порівнювали із часом утримування стандартних зразків бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та домішки А бензидаміну. На хроматограмах досліджуваного розчину не було інтерференції між піками аналітів. Отже, методика є специфічною для визначених речовин.

Робасність методики була підтверджена шляхом стабільності випробуваних розчинів.

Стабільність розчинів досліджували шляхом введення одних і тих же розчинів з різницею у 24 та 48 годин. Результати дослідження стабільності розчину наведені в таблиці 3.28.

Таблиця 3.28

Результати вивчення стабільності розчину

<i>Термін зберігання</i>	<i>0 годин</i>	<i>24 годин</i>	<i>48 годин</i>
<i>Бензидаміну гідрохлорид</i>			
Різниця між відношенням площ піків стандартного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	0,11	0,14
Різниця між відношенням площ піків випробовуваного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	0,12	0,17
<i>Метилпарабен</i>			
Різниця між відношенням площ піків стандартного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	0,13	0,18
Різниця між відношенням площ піків випробовуваного розчину відносно контролю (0 годин), %	—	0,10	0,15

Таким чином, розроблено методику одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену в лікарській формі спрею методом ГХ. Під час процесу розробки методу було обрано оптимальні умови екстракції, температуру

інжектора, детектор, швидкість потоку рухомої фази, нерухому фазу, тип введення зразку та градієнт температури. Хроматографію проводили на капілярній колонці HP-5 (5% дифеніл / 95% диметилсилоксану) з використанням хлороформної екстракції. Загальний час однієї аналітичної процедури становив 17,5 хв.

Валідацію методики проводили згідно вимог ДФУ 5.3.N.2 та ІСН Q2. Процедура є специфічною для аналізованих речовин. Лінійність, повторюваність та правильність методики підтвержено валідаційними тестами. Усі досліджувані параметри були в межах критеріїв прийнятності. Методика може використовуватися в рутинному аналізі для одночасного визначення бензидаміну та метилпарабену в препаратах, що містять ці компоненти.

3.4 Розробка методики визначення залишкових кількостей бензидаміну на поверхні технологічного обладнання

При рутинному виробництві фармацевтичної продукції ключову роль відіграє ступінь чистоти лікарської форми. Одним з потенційних джерел виникнення домішок може бути технологічне обладнання та залишкові кількості лікарських засобів на ньому. Тому очистка обладнання та контроль залишкових кількостей лікарських засобів є важливим етапом фармацевтичного виробництва.

Процедура очистки обладнання включає в себе:

- підбір і використання миючих засобів, якими безпосередньо миють реактора.
- відбір зразків, на яких контролюють вміст залишкових кількостей лікарських засобів валідованою методикою, яка придатна для визначення відповідних залишкових речовин [152–154].

Критерії вмісту допустимих кількостей залишкових лікарських засобів на поверхні обладнання розраховують виходячи з оцінки ризиків, пов'язаних із залишками даних АФІ [155–157]. Відповідно до рекомендацій Pharmaceutical inspection cooperation scheme (система співробітництва фармацевтичних інспекцій) гранично допустима кількість залишків препарату не повинна

перевищувати 0,1% середньої терапевтичної дози будь-якого попередньо виробленого препарату; препарат не повинен містити більше 10 ppm будь-якого іншого препарату [152].

У літературі описані аналітичні процедури визначення бензидаміну гідрохлориду, переважно хроматографічними методами [157, 158]. Однак метод ВЕРХ не може вважатися домінуючим, оскільки він є ресурсо- і часозатратним для даної операції. Тому нами був запропонований метод визначення залишкових кількостей бензидаміну методом УФ-спектрофотометрії. Дослідження проводили на спектрофотометрі Shimadzu 1800 (Японія) з програмним забезпеченням UV-Probe.

Проведено дослідження з встановлення максимуму поглинання бензидаміну гідрохлориду в діапазоні 200-400 нм. Встановлено, що спектр поглинання бензидаміну у водному розчині має максимум при довжині хвилі близько 310 нм. (Рис. 3.17).

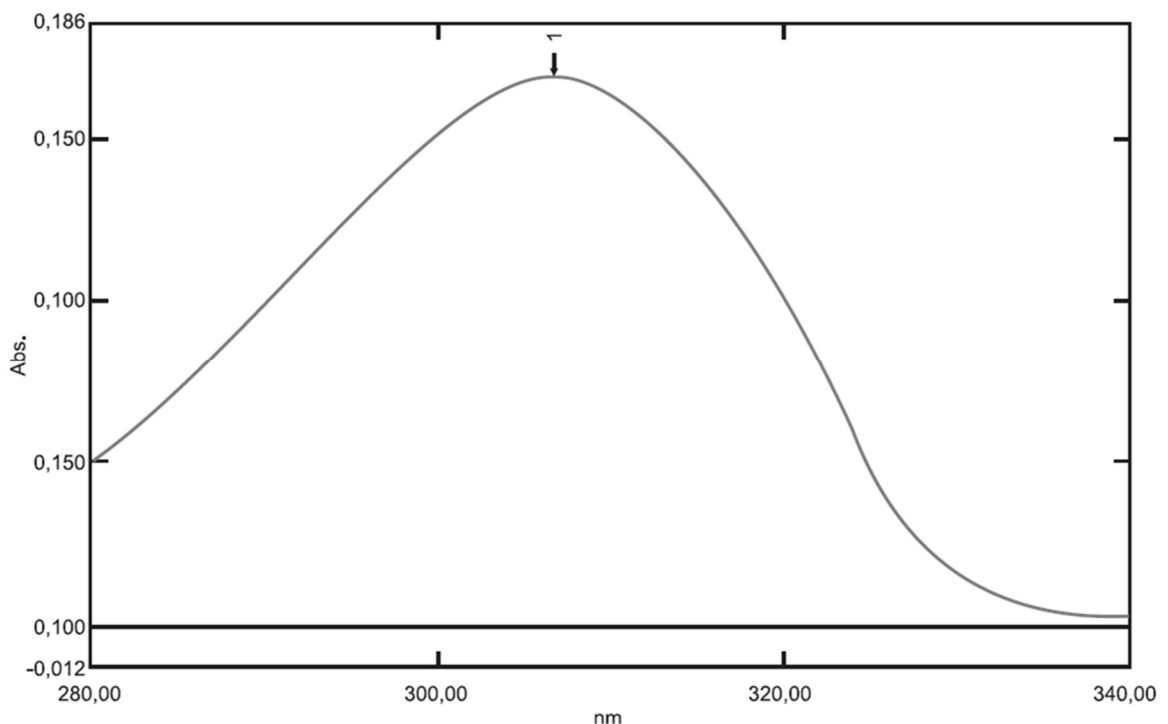


Рис 3.17 Спектр поглинання бензидаміну

В якості фонового розчину використовували змив з поверхні обладнання, не контамінованого бензидаміном.

Випробуваний розчин. Після мийки обладнання протирають ватним тампоном площу 10x10 см, поміщають тампон у центрифужну пробірку, додають 5 мл води Р. Центрифугують і переносять розчин у мірну колбу об'ємом 20 мл. Додають 15 мл води і повторюють процедуру. Розчин в мірній колбі доводять водою до мітки і перемішують.

Розчин порівняння. 0,1 г стандартного зразку бензидаміну гідрохлориду поміщають у мірну колбу об'ємом 100 мл і розчиняють у воді Р, доводять тим же розчинником до мітки і перемішують. 1 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу об'ємом 100 мл і доводять об'єм водою Р до мітки. 1 мл отриманого розчину переносять у колбу об'ємом 20 мл, доводять водою Р до мітки і перемішують.

Оптичне поглинання випробуваного розчину і розчину порівняння вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 310 нм. Вміст бензидаміну (у міліграмах) розраховують за формулою:

$$X = \frac{m_0 \cdot A \cdot 1000}{A_0}; \quad (3.3)$$

де A – оптична густина досліджуваного розчину; A_0 – оптична густина розчину порівняння; m_0 – маса наважки стандартного зразку бензидаміну в г.

Вміст залишкових кількостей не повинен перевищувати 10 ррм.

Підтвердження працездатності методики визначення залишкових кількостей бензидаміна на поверхні обладнання проводили згідно рекомендацій ДФУ[144], а саме вивчали наступні валідаційні характеристики:

- Специфічність;
- Лінійність;
- Правильність;
- Прецезійність.

Метрологічні характеристики лінійної залежності для бензидаміну гідрохлориду та розраховані дані лінійності наведені в таблицях 3.29 та 3.30.

Таблиця 3.29

Результати аналізу модельних сумішей залишкових кількостей бензидаміну на поверхні технологічного обладнання і результати статистичної обробки

Номер модельного розчину	Введено в % до концентрації розчину порівняння $X_i = (C_i/C_{RS}) * 100\%$	Середні значення оптичної густини (A_i)	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння, $Y_i = (S_i/S_{RS}) * 100\%$	Знайдено, у % до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) * 100\%$
M1	10,00	0,0005	9,94	100,60
M2	10,00	0,0005	9,94	100,60
M3	50,00	0,00252	50,10	99,80
M4	52,00	0,00256	50,89	102,17
M5	101,00	0,0051	101,39	99,61
M6	150,00	0,0075	149,11	100,60
M7	148,00	0,0074	147,12	100,60
M8	200,00	0,0101	200,80	99,60
M9	198,00	0,0099	196,82	100,60
Середнє, Z, %				100,47
Відносне стандартне відхилення RSD _Z , %				0,78
Довірчий інтервал $\Delta = t(95\%,8) \cdot SD_Z = 1,8595 \cdot SD_Z$, %				1,45
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %				0,47
Критерій незначущості системної похибки $\delta \leq \max \delta\%$				відповідає (0,47 < 1,02)

Таблиця 3.30

Метрологічні характеристики для лінійності методики визначення залишкової кількості бензидаміну

<i>Параметр</i>	<i>Символ</i>	<i>Отримане значення</i>	<i>Критерій прийнятності</i>
Коефіцієнт кореляції	r	0,9999	$\geq 0,9981$
Вільний член рівняння	a	0,0055	$\leq 1,6$
Стандартне відхилення	S _A	0,7835	—
Нахил лінії регресії	b	1,0023	—

Результати валідації аналітичної методики визначення залишкових кількостей бензидаміну гідрохлориду на поверхні технологічного обладнання характеризуються достатньою лінійністю. Значення коефіцієнту кореляції r складає більше 0,999 що відповідає вимогам критерію прийнятності.

Значення вільного члену рівняння a становить 0,0055 та відповідає вимогам що до прийнятності ($\leq 1,6$).

Відносне стандартне відхилення для розробленої методики становить RSD_z, % 0,78. Методика характеризується прийнятною правильністю. Систематична похибка δ для методики складає 0,47%

Достатня селективність визначення доведена відсутністю інтерференції сигналу плацебо на визначення аналіту.

Таким чином, розроблена методика відповідає валідаційним вимогам за показниками специфічності, лінійності, правильності, прецезійності та може використовуватися в рутинному контролі визначення залишкових кількостей бензидаміну на поверхнях технологічного обладнання.

3.5. Ідентифікація Бензидаміну та його метаболіту.

Відомим є спосіб визначення деяких азотвмістних нестероїдних протизапальних препаратів в біологічних рідинах людини, в основу якого покладено метод тонкошарової хроматографії та визначення їх з використанням декількох реактивів проявників (див. табл. 3.32), що дозволяє візуалізувати ці лікарські засоби.

Недоліком цього способу є те, що в разі присутності в одній пробі суміші речовини (бензидаміну), що досліджується, та лікарських засобів (наприклад, індометацину) неможливо вірогідно встановити присутність в екстрактах, здобутих з сечі людини останнього, так як його забарвлення з реактивом проявником та хроматографічна рухливість співпадає з вищенаведеними препаратами (табл. 3.31).

Недоліком цього способу є те, що в рекомендованих системах розчинників 1, 2, 3 неможливо підвищити ефективність розподілу для речовин, які підлягають аналізу.

Іншим відомим способом є метод хроматографії в тонких шарах сорбенту, де ці препарати проявляються реактивами IV та V.

Таблиця 3.31

Результати хроматографічного розподілу нестероїдних протизапальних лікарських засобів

Речовина	Забарвлення з реактивами			hR_f в системах*		
	I.	II.	III.	1	2	3
Бензидамід	коричневе	помаранчеве	коричнево-зелене	41	57	45
Диклофенак	сіро-коричневе	коричневе	буро-чорне	10	12	81

Індометацин	світло-коричневе	жовте	коричневе	43	8	71
Мелоксикам	жовте	-	жовте	16	11	45
Мефенамінова кислота	сіре	-	синє-блакитне	78	20	77
Німесулід	жовте	помаранчеве	помаранчеве	77	33	82
Піроксикам	-	помаранчеве	-	71	10	83
Пропіфеназон	жовте	жовте	світло-сіре	73	80	78

*Системи розчинників:

1. хлороформ –ацетон (9:1);
2. толуол-ацетон етанол амміак (4,5:4,5:0,75:0,25);
3. метанол- 25% амміак (100:1,5).

Реактиви – проявники:

- I. Розчин йодплатинату кислий
- II. Р-в Драгендорфа по Мун'є
- III. Р-в Манделіна

Таблиця 3.32

Результати візуалізації хроматографічного розподілу

Речовина	IV*	V*	VI*	VII*	VIII*
Диклофенак	---	коричневе	фіолетове	жовте	---
Німесулід	жовте	жовте	жовте	зелене	---
Мефенамінова к-та	---	коричневе	фіолетове	жовте	---

Пропіфеназон	---	блакитне	червоне	---	---
Бензидамін стандарт	---	біле	---	---	синє
Витяг бензидаміну з кислого екстракту	---	синє	---	---	синє
Витяг бензидаміну з лужного екстракту	---	синє			синє
Індометацин	---	жовте	фіолетове	жовте	---

*Реактиви – проявники:

IV. Суміш 10% розчину міді сульфату та 2% аміаку (5:1)

V. 1% розчин о-толуїдину в ацетоні після 0,3 М розчину міді сульфату

VI. 0,1 % розчин метилового червоного в етанолі. Хроматограму до та після обробки реактивом витримують при 100 °С.

VII. Бромкрезоловий зелений. 0,03 % розчин бромкрезолового зеленого в 80% водному розчині метанолу, до якого додають 8 крапель 3-% водного розчину NaOH на кожні 100 мл реагенту.

VIII. Бромкрезоловий зелений, підкислений оцтовою кислотою. До 0,1 % спиртового розчину бромкрезолового зеленого додають по краплях до жовтого забарвлення 1 % оцтову кислоту.

VIII. Бромкрезоловий зелений, підкислений оцтовою кислотою. До 0,1 % спиртового розчину бромкрезолового зеленого додають по краплях до жовтого забарвлення 1 % оцтову кислоту.

З таблиці 3.33 видно, що в витягах бензидаміну з кислого та лужного екстрактів є дві плями, які свідчать про знаходження в них як бензидаміну, так і його метаболіту N-оксиду бензидаміну.

Найбільш близьким до рішення, яке заявляється, і вибраним за найближчий аналог є спосіб виявлення нестероїдних протизапальних речовин та деяких інших речовин та кислот методом хроматографії в тонких шарах сорбенту, наведений в дисертаційній роботі «Розробка методів аналітичної діагностики отруєнь вальпроєвою кислотою», який дозволяє збільшити вірогідність ідентифікації цих речовин у сечі людини, після їх екстракції з кислого та лужного середовища за рахунок застосування реактивів – проявників VI, VII, VIII (Див. табл. 3.32).

Недоліком джерела, вибраного за найближчий аналог, є те, що в ньому не має відомостей про бензидамін та його метаболіт, а також реактивом проявником для вирішення питання про виявлення нестероїдних протизапальних речовин вибрано 0,1 % розчин метилового червоного в етанолі, з яким ні бензидамін, ні його метаболіт не утворюють забарвлення.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу ідентифікації бензидаміну та його метаболіту в присутності деяких протизапальних нестероїдних препаратів в сечі людини, в якому за рахунок дослідження двох екстрактів – кислого та лужного та проявлення останніх бромкрезоловим зеленим в оцтовій кислоті досягають характерного забарвлення для бензидаміну разом з його метаболітом N-оксидом бензидаміну.

Поставлена задача вирішується в способі ідентифікації бензидаміну та його метаболіту в присутності деяких протизапальних нестероїдних препаратів в сечі людини шляхом його екстракції та N - оксиду бензидаміну з кислого та лужного екстрактів методом тонкошарової хроматографії, згідно з корисною моделлю, використовують реактив VIII табл. 3.32 (бромкрезоловий зелений в оцтовій кислоті), яким паралельно оброблюють хроматограми з кислим та лужним екстрактами, які хроматографують паралельно з речовинами-стандартами, та після появи плям з синім забарвленням та співпадіння хроматографічної рухливості плям екстрактів з сечі та речовин стандартів здійснюють ідентифікацію. У зв'язку з тим, що N - оксид є основним метаболітом бензидаміну, було важливим вивчити можливість виявлення бензидаміну та його метаболіту в реальних зразках сечі хворих, які його приймали. Для цього 50 мл досліджуваної

сечі підкислювали 10% хлороводновою кислотою до рН=2-3 та проводили одноразову екстракцію 50 мл хлороформу. Отриманий кислий хлороформний екстракт відділяли, а водну фазу підлужували 25% розчином аміаку до рН=9 і двічі екстрагували 25 мл хлороформу. Об'єднані лужні екстракти та раніше отриманий кислий екстракт окремо фільтрували через фільтри з безводним натрію сульфатом, упарювали в струмені холодного повітря до об'ємів 1 мл та використовували для подальших досліджень. Для ідентифікації речовин, які досліджуються, використовували фізико-хімічні методи аналізу: хроматографію в тонкому шарі сорбенту та високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ).

Для вирішення цього питання, відповідні зони на платівці піддавались хроматографічному очищенню методом ТШХ. Після елюювання речовин з сорбенту платівок, їх відповідні розчини та фармакопейні стандарти (Бензидаміну гідрохлориду (ВР) – кат № 610, серія – 3984; Бензидаміну N - оксид (LGC) – кат № ММ0142.08, серія – 142.08.09.02) досліджувались методом ВЕРХ.

Хроматографічне дослідження проводили з використанням рідинного хроматографа Shimadzu LC-20 з діодно-матричним детектором, автосамплером, дегазатором і чотирьох каналним насосом. Програмне забезпечення LC Solution було використано для збору даних. Дослідження основи бензидаміну проводили по раніше розробленій методиці ідентифікації бензидаміну гідрохлориду. Хроматографування проводили за наступних умов:

- колонка GraceAlltima C18 розміром 250мм*4,6мм, з розміром частиць 5 мкм;
- рухома фаза: 3,0 г натрію перхлорату Р розчиняли в 500 мл води Р, додавали 1,0 мл триетиламіну Р, доводили рН кислотою хлорною Р до 3,0, додавали 500 мл ацетонітрилу Р.
- швидкість потоку – 1 мл/хв;
- детектування при довжині хвилі 320 нм для Бензидаміну;
- температура термостату колонки 25 °С;
- в якості розчинника використовували суміш вода Р : ацетонітрил Р в співвідношенні 1: 1.

Для визначення хроматографічної поведінки бензидаміну, а також можливого впливу на його виявлення компонентів біологічних матриць було досліджено хлороформний розчин бензидаміну, а як бланкі - 10 екстрактів сечі добровольців. Результати наведені в таблиці 3.33.

Отримані результати виявлення бензидаміну та його метаболіту порівнювались з хроматографічними параметрами виявлення нестероїдних протизапальних засобів до яких належать диклофенак, мефенамінова кислота, пропифеназон, індометацин, німесулід, піроксикам, мелоксикам.

Таблиця 3.33.

Порівняльні результати хроматографічного розподілу кислого та лужного витягів з сечі та фармакопейних стандартів бензидаміну гідрохлориду та його метаболіту

<i>Речовина</i>	<i>Хроматографічні параметри утримання</i>	
	<i>Метод ВЕРХ</i> <i>Час утримання, хв</i>	<i>ТШХ hRf*</i>
Сухий залишок Бензидаміну кисле	8,45; 9,16	5; 57
Сухий залишок Бензидаміну лужне	8,45; 9,17	5; 57
N - оксид бензидаміну	9,16	5
Бензидаміна гідрохлорид	8,44	57

R_f^* в системі толуол- ацетон-етанол-25% розчин аміаку(45:45:7,5:2,5);

Спосіб ідентифікації бензидаміну та його метаболіту в присутності деяких протизапальних нестероїдних препаратів, який визначають в сечі людини шляхом його екстракції та N - оксиду бензидаміну з кислого та лужного екстрактів методом тонкошарової хроматографії, який відрізняється тим, що використовують реактив бромкрезоловий зелений в оцтовій кислоті, яким паралельно оброблюють, хроматограми з кислим та лужним екстрактами, які хроматографують паралельно з речовинами-стандартами та після появи плям з синім забарвленням та співпадіння хроматографічної рухливості плям екстрактів з сечі та речовин стандартів здійснюють ідентифікацію.

Таким чином, запропонований спосіб виявлення бензидаміну та його метаболіту дозволяє надійно ідентифікувати його в присутності інших нестероїдних протизапальних засобів.

Висновки до розділу 3

1. Розроблено методику визначення супровідних домішок бензидаміну гідрохлориду в готовій лікарській формі методом ВЕРХ. Визначено продукти деградації бензидаміну гідрохлориду під дією стресс-тестів. Проведено процедуру валідації розробленої методики та підтверджено її специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, робасність. Усі валідовані параметри були в межах критеріїв прийнятності. Показання детектора були лінійними у діапазоні концентрацій аналіту 0,05–1,2% відносно номінальної концентрації бензидаміну гідрохлориду у препараті.
2. Розроблено методику одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену в готовій лікарській формі методом ВЕРХ. Час однієї хроматографічної процедури склав менше 10 хв. Проведено процедуру валідації розробленої методики відповідно до

вимог ДФУ 5.3.N.2 ICH Q2 та підтверджено її надійність, специфічність, лінійність у діапазоні концентрацій 80–120 % для номінальної концентрації аналізованої речовини у препараті. Всі параметри валідації відповідають критеріям прийнятності. Максимальне RSD для кожного аналіту становило менше 1,3 %. Точність методу була в межах критеріїв прийнятності. Розроблена методика може бути застосована у рутинному контролі в лабораторіях контролю якості для одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену в лікарських формах бензидаміну.

3. Розроблено методику визначення залишкових кількостей бензидаміну на поверхні технологічного обладнання методом УФ-спектрофотометрії. Проведено процедуру валідації розробленої методики за показниками специфічності, лінійності та точності. Усі валідовані параметри були в межах критеріїв прийнятності.
4. Розроблено методику кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену у готовій лікарській формі методом газової хроматографії. Час однієї хроматографічної процедури склав 17,5 хв. Проведено процедуру валідації розробленої методики відповідно до вимог ДФУ 5.3.N.2 ICH Q2 та підтверджено її специфічність, лінійність, відтворюваність, правильність. Усі валідовані параметри були в межах критеріїв прийнятності. Методика є лінійною для всіх сполук з коефіцієнтом кореляції більше 0,999.
5. Розроблен спосіб ідентифікації бензидаміну та його метаболіту в присутності деяких протизапальних нестероїдних препаратів, який визначають в сечі людини шляхом його екстракції та N - оксиду бензидаміну з кислого та лужного екстрактів методом тонкошарової хроматографії, який відрізняється тим, що використовують реактив бромкрезоловий зелений в оцтовій кислоті, яким паралельно оброблюють, хроматограми з кислим та лужним екстрактами, які хроматографують паралельно з речовинами-стандартами та після появи

плям з синім забарвленням та співпадіння хроматографічної рухливості плям екстрактів з сечі та речовин стандартів здійснюють ідентифікацію.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

1. Cherniy V.A., Gureeva S.N., Georgiyants V.A. Development and validation of alternative analytical method for determination of related substances of benzydamine hydrochloride in oral spray by HPLC. *Pharmaceutical Sciences and Technology*. 2016. Vol. 1, № 5. P. 25–33.
2. Черный В.А., Георгиянц В.А., Черная О.В., Журавель И.А., Ибадуллаева Г.С. Валидация методики определения остаточного количества бензидамина на поверхности технологического оборудования. *Фармация Казахстана*. 2019. №4(25). С. 25–28.
3. Chorny V., Georgiyants V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben in benzydamine dosage form by GC. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2019. Vol.6, № 1. P. 28–35.
4. Chorny V., O Chorna., Georgiyants V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben in dosage form by HPLC. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2020. №3(25). P. 12–18.
5. Черный В. А., Гуреева С. Н., Георгиянц В. А. Разработка и валидация методики определения сопутствующих примесей бензидамина гидрохлорида методом ВЭЖХ с использованием диодно-матричного детектирования. *Аналітична хімія у фармації* : матеріали II міжнар. наук.-практ. Інтернет-конф., м. Харків, 17 берез. 2016 р. – Х. : Вид-во НФаУ, 2016. – С. 85–86.
6. Черный В. А., Пономарева Ю. Н., Черная О. В., Георгиянц В. А. Разработка методики одновременного количественного определения бензидамина гидрохлорида и метилпарабена в готовой лекарственной

- форме методом ВЭЖХ с применением принципов зеленой химии. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи* : матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України, м. Харків, 13-16 верес. 2016 р. – Х., 2016. – Т. 1. – С. 213.
7. Черный В. А., Гончарова Ю. Н., Черная О. В., Георгиянц В. А. Разработка методики одновременного количественного определения бензидамина гидрохлорида и метилпарабена в готовой лекарственной форме методом газовой хроматографии. *Управління якістю в фармації* : матеріали XI наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 19 трав. 2017 р. – Х., 2017. – С. 177.
 8. Черный В. А., Георгиянц В. А., Черная О. В. Методология определения вымываемых веществ из элементов первичной упаковки в готовых лекарственных средствах. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології* : зб. наук. пр. – Х. : Вид-во НФаУ, 2017. – Вип. 3. – С. 325–326.
 9. Пат. України на корисну модель № 14283. «Спосіб ідентифікації бензидаміну та його метаболіту в присутності деяких протизапальних нестероїдних препаратів» № и 2020 00615; заявл. 03.02.2020 р.; опубл. 25.06.2020 р., Бюл. № 12.

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ З РОЗРОБКИ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЇ КОМБІНОВАНОГО СПРЕЮ ОРОМУКОЗНОГО З БЕНЗИДАМІНУ ГІДРОХЛОРИДОМ

Відомо, що бензидаміну гідрохлорид в спектрі своєї активності має і антибактеріальні властивості, що є безумовно позитивним при застосуванні. Однією з допоміжних речовин є олія м'яти перцевої. При фармакологічних дослідженнях було встановлено, що антибактеріальні властивості при додаванні цього одоранту підвищились. Тому АТ «Фармак» було прийнято рішення щодо розробки комбінованого спрею ормукозного з додаванням ефірної олії як АФІ для лікування захворювань порожнини рота, що супроводжуються бактеріальним компонентом.

4.1. Вибір ефірної олії та постачальника

4.1.1 Мікробіологічні дослідження модельних сумішей спрею бензидаміну з різними ефірними оліями.

Технологію введення ефірних олій (у кількості 1,5%) до розчину бензидаміну гідрохлориду для мікробіологічних досліджень розроблено за консультативної підтримки д-ра фарм. наук, проф., завідувачки кафедри заводської технології ліків НФаУ О. А. Рубан. Мікробіологічні дослідження проведено спільно з доктором фарм. наук, професором кафедри біотехнологій НФаУ О. П. Стрілець.

4.1.2 Дослідження ефірних олій різних постачальників

Для вивчення антимікробної активності отримано зразки розчинів (кафедра Фарм. хімії НФаУ):

Протимікробну активність дослідних зразків розчинів вивчали *in vitro* методом дифузії в агар (метод «колодязів»). Цей метод ґрунтується на здатності активної речовини дифундувати в агарове середовище, яке попередньо інокульовано культурами мікроорганізмів. Результати досліджень дозволяють характеризувати як антимікробну активність препарату, так і вивільнення антимікробних речовин з основи, оскільки зони затримки росту мікроорганізмів утворюються внаслідок дифузії цих речовин в щільне живильне середовище.

Протимікробну активність визначали відразу після приготування засобів. Усі дослідження виконували у асептичних умовах, з використанням ламінарного боксу (кабінет біологічної безпеки AC2-4E1 «Esco», Індонезія).

В якості тест-культур використовували чисті культури: грампозитивні мікроорганізми *Staphylococcus aureus* ATCC 25293, спорову культуру *Bacillus subtilis* ATCC 6633, грамнегативну культуру *Escherichia coli* ATCC 25922. Антифунгальну дію з'ясовували відносно дріжджеподібного грибу роду *Candida* - *Candida albicans* ATCC 885-653. При проведенні дослідів використовували однодобові суспензії бактеріальних мікроорганізмів у фізіологічному розчині, та дводобову культуру дріжджеподібного гриба. Мікробна загрузка складала 10^7 колонієутворюючих одиниць мікроорганізмів в 1 мл поживного середовища (КУО/мл).

До чашок Петрі, які встановлені на горизонтальній поверхні, вносили по 10 мл розтопленого «голодного» агару. Після застигання даного нижнього шару агару на його поверхні на рівній відстані один від одного та від краю чашки розміщали 3 стерильних сталевих тонкостінних циліндрів (внутрішній діаметр – $6,0 \pm 0,1$ мм, висота – $10,0 \pm 0,1$ мм). Навколо циліндрів заливали верхній шар, що складався з 14 мл розтопленого та охолодженого до 45–48 °С агару, змішаного з посівною дозою тест-мікроорганізму. При роботі з бактеріальними культурами для другого шару використовували м'ясо-пептонний агар (МПА), при роботі з дріжджеподібним грибом – агар Сабуро). Після охолодження верхнього шару циліндри виймали стерильним пінцетом і в отримані лунки вносили досліджувані зразки до повного їх заповнення. Чашки Петрі витримували 30-40 хвилин при

кімнатній температурі та поміщали в термостат – бактеріальні культури при температурі $32,5 \pm 2,5$ °C на 18-24 години, культуру дріжджеподібного гриба при $22,5 \pm 2,5$ °C на 48 годин.

Облік результатів проводили шляхом вимірювання зони пригнічення росту мікроорганізмів, включаючи діаметр лунок. Вимірювання проводили з точністю до 1 мм, при цьому орієнтувались на повну відсутність видимого росту.

Діаметр зони затримки росту мікроорганізмів характеризував антимікробну активність експериментальних зразків:

- відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, а також зону затримки діаметром до 10 мм, оцінювали як нечутливість мікроорганізмів до внесеного в лунку зразка;

- зони затримки росту діаметром 11-15 мм оцінювали як слабку чутливість культури до концентрації діючої протимікробної речовини, що досліджувалась;

- зони затримки росту діаметром 16-25 мм – як показник помірної чутливості штаму мікроорганізму до досліджуваного зразка;

- зони затримки росту, діаметр яких перевищував 25 мм, свідчить про високу чутливість мікроорганізмів до досліджуваного зразка.

Модельні суміші, що досліджувались в експерименті наведено у таблиці 4.1.

В результаті проведених досліджень по вивченню протимікробних властивостей м'якої лікарської форми по відношенню до різних культур мікроорганізмів були отримані результати, які наведені у таблиці 4.2.

Дані які отримані експериментально та представлені в таблиці 4.2, свідчать про те, що досліджувані зразки №1 (контроль), №2 (ефірна олія евкаліпту 0,5%), №3 (ефірна олія лаванди 0,5%), №4 (ефірна олія м'яти 0,5%), не володіють протимікробною активністю по відношенню до використаних тест-штамів, а саме, до бактерійних грампозитивних (*Staphylococcus aureus* ATCC 25293 і спорової культури *Bacillus subtilis* ATCC 6633), грамнегативної (*Escherichia coli* ATCC 25922) культур. А також не володіють фунгіцидною дією по відношенню до дріжджеподібного грибу рода Кандида - *Candida albicans* ATCC 885-653.

Таблиця 4.1

Модельні суміші для вивчення антимікробної активності ефірних олій

Зразок 1 (контроль)	Бензидамін, спрій 1,5 мг/мл (без метилпарабена)
Зразок 2	Ефірна олія евкалипту 0,5 %
Зразок 3	Ефірна олія лаванди 0,5 %
Зразок 4	Ефірна олія м'яти 0,5 %
Зразок 5	Ефірна олія евкалипту 1,5 %
Зразок 6	Ефірна олія лаванди 1,5 %
Зразок 7	Ефірна олія м'яти 1,5 %

Таблиця 4.2

Результати антимікробної активності зразків (n=5)

Зразок	Культури мікроорганізмів			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25293	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> ATCC 885-653
	Діаметри зони затримки росту мікроорганізмів, мм			
Зразок 1 (контроль)	-	-	-	-
Зразок 2 (еф. олія евкалипту 0,5 %)	-	-	-	-
Зразок 3 (еф. олія лаванди 0,5 %)	-	-	-	-
Зразок 4 (еф. олія м'яти 0,5 %)	-	-	-	-
Зразок 5 (еф. олія евкалипту 1,5 %)	14,4±0,5	16,6±0,5	-	16,8±0,4
Зразок 6 (еф. олія лаванди 1,5 %)	14,8±0,4	18,2±0,4	-	17,6±0,5
Зразок 7 (еф. олія м'яти 1,5 %)	17,6±0,5	20,2±0,4	-	22,2±0,4

Примітка: « - » - зона затримки росту мікроорганізму відсутня.

Досліджувані зразки розчинів з ефірними оліями з концентрацією 1,5%, а саме №5 (еф.олія евкаліпту), №6 (еф.олія лаванди) і №7 (еф.олія м'яти) володіють протимікробною активністю по відношенню до використаних грампозитивних культур мікроорганізмів (*Staphylococcus aureus* ATCC 25293 (14,4±0,5, 14,8±0,4, 17,6±0,5 мм відповідно), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 - 16,6±0,5, 18,2±0,4, 20,2±0,4 мм відповідно). По відношенню до грамнегативної культури *Escherichia coli* ATCC 25922 антимікробної дії не було виявлено. Експериментально було встановлено антифунгальну активність зразків №5, №6, №7 по відношенню до дріжджеподібного грибу рода Кандида - *Candida albicans* ATCC 885-653 (діаметри зон затримки росту тест-штама - 16,8±0,4, 17,6±0,5, 22,2±0,4 мм відповідно) .

Слід зазначити, що серед зразків №5, №6, №7 найбільшу протимікробну активність показав зразок №7 (еф.олія м'яти 1,5%). По відношенню до культури *Staphylococcus aureus* ATCC 25293 активність складає 17,6±0,5 мм (діаметр зони затримки росту тест-штама), по відношенню до культури *Bacillus subtilis* ATCC 6633 - 20,2±0,4 мм. Протигрибкова дія по відношенню до культури *Candida albicans* ATCC 885-653 складає 22,2±0,4 мм. Таким чином, отримані результати дослідів показали, що досліджуваний зразок №7 володіє помірною антимікробною дією (діаметр зон затримки росту тест-культур складає 16-25 мм) по відношенню до грампозитивних культур мікроорганізмів (*Staphylococcus aureus* ATCC 25293, *Bacillus subtilis* ATCC 6633), по відношенню до дріжджеподібного грибу *Candida albicans* ATCC 885-653 і є перспективним для подальших робіт.

Олію перцевої м'яти отримують з листя багаторічної трави, *Mentha piperita* L. та *M. arvensis var. piperascens* член родини *Labiatae*. Це безбарвна, блідо-жовта або блідо-зеленувато-жовта рідина, що має характерний запах і смак з подальшим відчуттям холоду, добре розчинна в етанолі (70%) [159]. Олія перцевої м'яти застосовується для лікування порушень травлення та діяльності нервової системи завдяки її протипухлинним та антимікробним властивостям, хіміопротективному потенціалу, дії на нирки, протиалергічній дії, а також для

зменшення спазмів, захворювань шлунково-кишкового тракту, анорексії, нудоти та діареї [160–163].

За даними Міжнародної фармакопеї, олія перцевої м'яти містить: лимонен (1,0–5,0%), цинеол (3,5–14,0%), ментон (14,0–32,0%), ментофуран (1,0–9,0%), ізоментон (1,5–10,0%), ментил ацетат (2,8–10,0%), ізопулегол (максимум 0,2%), ментол (30,0–55,0%), пулегон (не більше 4,0%) та карвон (не більше 1,0%). Відношення вмісту цинеолу до вмісту лімонену повинно бути не менше двох [164]. Таким чином, маркерною речовиною олії перцевої м'яти є ментол (Рис. 4.1).

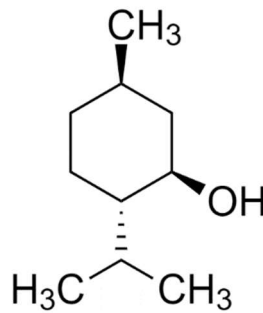


Рис. 4.1 Структурна формула ментолу

Для вибору виробника олії м'яти перцевої проводили контроль наявних зразків олії м'яти, згідно методики Європейської Фармакопеї 10.0 за показником хроматографічний профіль, за наступних умов:

- *Приготування випробовуваного розчину:*

0,2 г субстанції розчиняли у 5 мл гексану та доводили об'єм розчину до 10 мл.

- *Приготування розчину порівняння:*

10 мг лимонену, 20 мг цинеолу, 40 мг ментону, 10 мг ізоментону, 40 мг ментилацетату, 20 мг ізопулеголу, 60 мг ментолу, 20 мг пулегону і 10 мг карвону розчиняли у 10 мл гексану.

Умови хроматографування:

- Колонка капілярна DB FFAP (30м x 0,25 мм з товщиною шару 1 мкм)
- Газ носій – гелій, швидкість потоку 1,5 мл/хв
- Поділ потоку 1:100
- Детектор – ПД (220 С)
- Інжектор (200С)
- Градієнт 0-10 хв – 60 С , 10-70 (приріст температури 2 С/хв), 70-75 – 180С.
- Об'єм інжекції – 1,0мкл

Результати аналізу наведені в таблиці 4.3.

Отримані результати контролю якості ефірних олій м'яти від різних виробників за показником «хроматографічний профіль» свідчать що усі виробники, які підлягали тестуванню відповідають заявленим нормам якості Європейської Фармакопеї. Значення вмісту ментолу в різних зразках знаходилось в діапазоні 36 - 47%. Найбільший вміст ментолу спостерігався у зразку «М'ята, антологія натуральної косметики «ТОВ Фармаком». Найменший вміст ментолу спостерігався у зразку *Mentha arvensis leaf oil* «ПП Репичесто».

4.2. Розробка методики одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та ментолу в комбінованій лікарській формі

У якості досліджуваного засобу використовували дослідну серію бензидаміну у формі спрею наступного складу (табл. 4.4):

**Результати визначення хроматографічного профілю ефірної олії
м'яти різних виробників**

	Лимонен , 5-7%	Цинеол 1,5%	Ментон 17-35%	Ізонтон 5-13%	Ментилацетат 1,5-7%	Ізопугол 1-3%	Метнол 30-50%	Пулегон більше 2,5%	Карвонен більше 2,0%
Flora secret (ТОВ «ПКК «ДНД»)	5,2	1,1	33,0	10,6	3,0	2,0	44,0	0,8	0,3
Квіта (ФОП Скріпченко)	6,0	0,8	32,0	12,0	6,0	2,2	39,1	1,5	0,4
Ароматика «ТОВ Ароматика»	6,3	0,0	28,0	11,5	5,8	2,4	44,3	0,9	0,8
Mentha arvensis leaf oil «ПП Репичесто»	5,5	9,0	34,0	9,7	3,3	1,9	36,0	0,5	0,1
М'ята, антологія натуральної косметики «ТОВ Фармаком»	5,8	1,3	26,4	10,5	6,9	1,7	47,0	0,3	0,1

Таблиця 4.4

Склад препарату на основі бензидаміну гідрохлориду у формі розчину або спрею з додаванням олії м'яти перцевої.

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

- склад компонентів надано в перерахунок на флакон об'ємом 30 мл.

Препарат отримували за класичної схеми технологічного процесу (рис. 4.2), розробленої за консультативної підтримки проф. Рубан О.А.

У попередніх дослідженнях визначення бензидаміну та метилпарабену описувалося окремо та переважно методом високоефективної рідинної хроматографії або УФ-спектрофотометричним методом [109, 114, 115, 139, 165]. Визначення ментолу було описано методом ГХ – мас-спектрометрії [166].

Сучасні вимоги лабораторій контролю якості відповідають принципам зеленої хімії, що передбачає розробку та подальше впровадження методик контролю якості, які забезпечують одночасне визначення всіх аналізованих речовин одним введенням, пріоритетності експресних методик, які в той же час є менш шкідливими для навколишнього середовища [122, 167–171]. Така стратегія є важливою для економії людських ресурсів, органічних розчинників, енергетичних ресурсів, а тому вважається майбутнім не тільки аналітичних лабораторій, але й усієї хімічної промисловості. У даному розділі було розроблено методику одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та ментолу (як маркера олії перцевої м'яти) за допомогою методу ГХ з полуменево-іонізаційним детектором та проведено валідацію методики відповідно до вимог ДФУ [144] та ІСН Q2 [141].





Рис 4.2 Схеми приготування спрею бензидаміну з олією м'яти

Розробка аналітичної методики. Розробка методики одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та ментолу проводилась шляхом підбору оптимальних хроматографічних параметрів та підготовки зразків. За основу взято методику аналізу бензидаміну гідрохлориду описану у Британській фармакопеї та попередньо валідовану нами для одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену (розділ 3.3).

Хроматографію проводили за допомогою газового хроматографа Agilent 7890 з полуменево-іонізаційним детектором, автоматичним дозатором та інжектором з інжектором для введення проб із діленням / без ділення потоку. В якості вставки у лайнер використовували деактивоване скловолокно. Розділення проводили на капілярній колонці HP-5 з геометрією 30 м x 0,32 мм x 0,25 мкм. У якості рухомої фази було обрано гелій. Об'ємна швидкість потоку складала 1 мл/хв. Для збору даних було використано програмне забезпечення Chemstation.

Вибір умов екстракції та внутрішнього стандарту. Згідно монографії Британської фармакопеї екстракцію хлороформом проводять після обробки випробуваного розчину лугом. Однак така обробка не підходить для екстракції метилпарабену, оскільки призводить до повної деградації консерванту. У зв'язку з цим, були отримані різні значення рН досліджуваного розчину. Прийнятна екстракція спостерігалася при нейтральному рН середовища (6,5-7,0). В якості органічного розчинника обрали хлороформ. В якості внутрішнього стандарту для визначення бензидаміну гідрохлориду було обрано домішку А бензидаміну, яка відповідає вимогам до внутрішнього стандарту. Хлороформний шар був використаний для хроматографії для остаточної аналітичної операції.

Вибір концентрацій випробуваних розчинів. Початкові концентрації бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та ментолу у лікарській формі становлять 1,5, 1,0 та 0,22 мг / мл відповідно, що відповідає концентраціям 0,15, 0,1 та 0,022 мкг/мкл під час хроматографії. За цих концентрацій перевантаження піків не спостерігалось.

Приготування вихідного розчину. Стандартні зразки бензидаміну гідрохлориду (150 мг) та метилпарабену (100 мг) зважують та розчиняють окремо

у 100 мл води при невеликому нагріванні для отримання розчину з кінцевою концентрацією 1,5 мг / мл бензидаміну гідрохлориду та 1,0 мг / мл для метилпарабену. Стандартний зразок ментолу (20 мг) зважують і розчиняють у 100 мл ізопропанолу для отримання розчину з кінцевою концентрацією 0,2 мг / мл.

Приготування розчину внутрішнього стандарту. 150 мг домішки бензидаміну А (внутрішній стандарт) зважують і розчиняють у 100 мл води для отримання розчину з кінцевою концентрацією 1,5 мг / мл.

Приготування стандартного розчину. По 5 мл вихідного розчину і розчину внутрішнього стандарту переносять у колбу об'ємом 50 мл, розчиняють у 10 мл хлороформу і доводять об'єм розчину водою до 50 мл. Після інтенсивного струшування приготованого розчину хлороформний шар відокремлюють і використовують для аналізу.

Приготування випробуваного розчину. Лікарську форму бензидаміну гідрохлориду, що містить метилпарабен та олію перцевої м'яти, беруть у кількості 5 мл і переносять у мірну колбу об'ємом 50 мл. Додають 5 мл розчину внутрішнього стандарту і 10 мл хлороформу. Об'єм отриманого розчину доводять водою до 50 мл. Після інтенсивного струшування приготованого розчину хлороформний шар відокремлюють і використовують для аналізу.

Вибір нерухомої фази. Вибір нерухомої фази має вирішальне значення для прийняттого розділення аналітів у ГХ. Полярність нерухомої фази відіграє головну роль в утримуванні речовини у колонці, а отже, і у порядку елюювання аналітів.

Для даного розділення випробовували нерухому фази з різною полярністю:

- дуже полярна фаза DB-FFAP (ПЕГ модифікований нітротерефталевою кислотою);
- фаза середньої полярності DB-624 (6% ціанопріпільфеніл / 94% диметил (полі) силіоксан);
- неполярна фаза HP-5 (5% дифеніл / 95% диметил (полі) силіоксан).

Найкраща роздільна здатність сполук спостерігалася на неполярній нерухомій фазі. (Рис. 4.3, 4.4). Таким чином, для методики було обрано колонку НР-5.

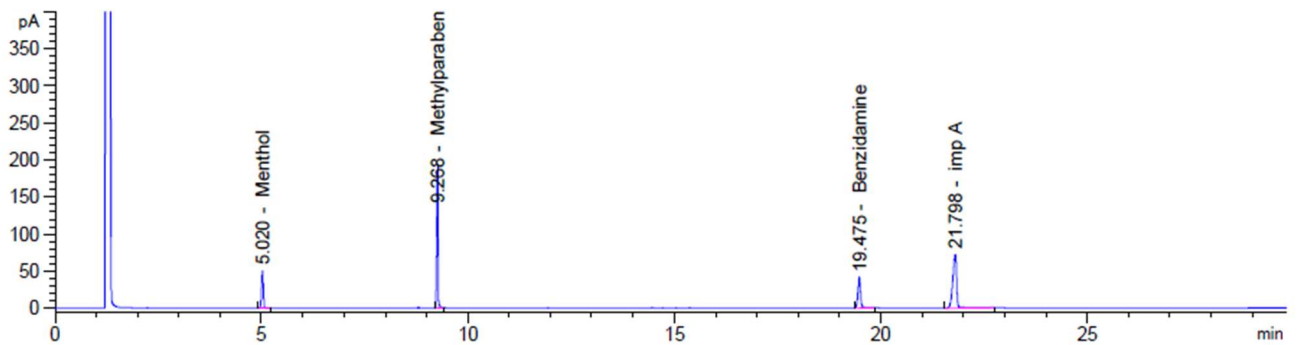


Рис. 4.3 Хроматограма стандартного розчину бензидаміну, ментолу, метилпарабену та внутрішнього стандарту (домішка А бензидаміну гідрохлориду) на колонці НР-5

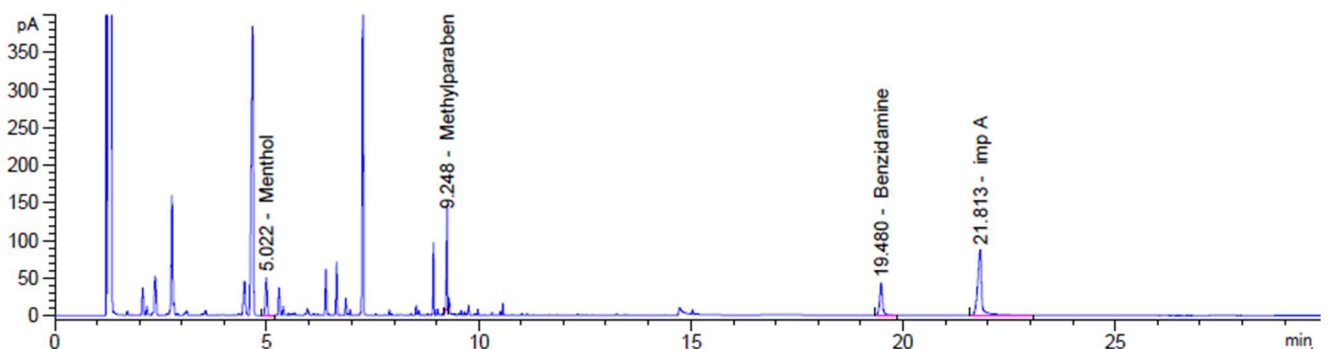


Рис. 4.4 Хроматограма стандартного розчину бензидаміну, ментолу, метилпарабену та внутрішнього стандарту (домішка А бензидаміну гідрохлориду) на колонці НР-5

Вибір параметрів інжектора та детектора. Щоб запобігти перевантаженню колонки було обрано об'єм введення 1 мкл з подальшим розведенням 20:1. З урахуванням високих температур кипіння аналізованих речовин та значних відмінностей їхніх точок кипіння було обрано температуру 300 °С, що дозволило досягти повного випаровування зразка без потенційної

дискримінації та деградації аналізованих речовин. Температура детектора 320 ° C була обрана для запобігання конденсації зразка на детекторі після елюювання. Обрані параметри інжектора та детектора дозволили отримати відповідну чутливість та відтворюваність методики.

Вибір температурної програми хроматографії. Дана методика передбачає одночасне розділення трьох різних речовин з різними хімічними та фізичними властивостями. У цьому випадку ізотермічне розділення не може забезпечити прийнятний час аналізу, що важливо для рутинного контролю якості. У зв'язку з цим були випробувані різні програми градієнта температури для отримання достатнього розділення всіх сполук, а також для досягнення оптимального часу однієї процедури.

В результаті було виявлено, що ментол елюється при температурі 220 ° C протягом 5 хв. у запропонованій хроматографічній системі, а метилпарабен – протягом 10 хв. Після елюювання метилпарабену температуру підвищували до 270 ° C на 20 ° C / хв. Витримування при температурі 270 ° C протягом 18 хвилин дозволяло елюювати як бензидамін, так і внутрішній стандарт.

Валідація аналітичної методики проводилася відповідно до вимог ДФУ 5.3.N.2 [144], та ІСН Q2 [141, 172] за наступними характеристиками: селективність, лінійність, прецизійність, правильність, придатність хроматографічної системи, діапазон використання та робасність.

Селективність. Для підтвердження селективності методики вводили випробуваний та стандартний розчин та оцінювали інтерференцію піків плацебо з аналітами. Селективність методики підтверджується розділенням піків аналітів та внутрішнього стандарту з будь-якими іншими піками плацебо (Рис. 4.3). Роздільна здатність для аналізованих сполук становила не менше 1,5. Коелюювання не спостерігалось, що вказує на те, що методика має достатню селективність для визначення сполук.

Придатність хроматографічної системи. Проводили хроматографування стандартного розчину та визначали число теоретичних тарілок, відносне стандартне відхилення для відношення площ піків внутрішнього стандарту та

аналіту для кожної аналізованої сполуки та симетричність піків. Параметри придатності хроматографічної системи наведені в таблиці 4.5. Наведені дані є середніми для 3 введень.

Таблиця 4.5

Придатність хроматографічної системи для розробленої методики (n = 3)

<i>Речовина</i>	<i>Час утримування, хв.</i>	<i>RSD % відношення площ внутрішнього стандарту та аналіту</i>	<i>Число теоретичних тарілок</i>	<i>Фактор асиметрії</i>
Ментол	5,0	0,24	64108	1,14
Метилпарабен	9,2	0,25	406197	1,72
Бензидаміну гідрохлорид	19,5	0,12	436177	1,04

Примітка. n – число введень, RSD% – відносне стандартне відхилення у %.

Хроматографічна система вважається придатною якщо виконуються наступні критерії прийнятності:

- відносне стандартне відхилення для трьох паралельних введень для кожної аналізованої речовини не повинно перевищувати 0,5%;
- число теоретичних тарілок для кожної сполуки повинно бути не менше 40000;
- фактор асиметрії піку для кожної речовини не повинен перевищувати 2,0.

У даній системі максимальне відносне стандартне відхилення для співвідношення площ піків становить 0,25 для трьох паралельних введень; число теоретичних тарілок для ментолу становить 64108, що вдвічі більше, ніж поріг придатності хроматографічної системи для розробленої методики; фактор асиметрії піку не перевищує 1,8 для кожної сполуки. Таким чином, придатність хроматографічної системи знаходиться в межах критеріїв прийнятності.

Лінійність та діапазон використання. Лінійність оцінювали шляхом введення стандартних розчинів у трьох паралельних дослідах з різною концентрацією аналітів, яка становила 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115% та 120% до їх номінального вмісту в лікарській формі.

Співвідношення знайденої кількості бензидаміну гідрохлориду (Y) до заданої кількості (X), тобто залежність виду $Y = B \cdot X + A$, визначали за допомогою методу найменших квадратів для дев'яти модельних розчинів.

Результати визначення лінійності методики наведені в таблицях 4.6.

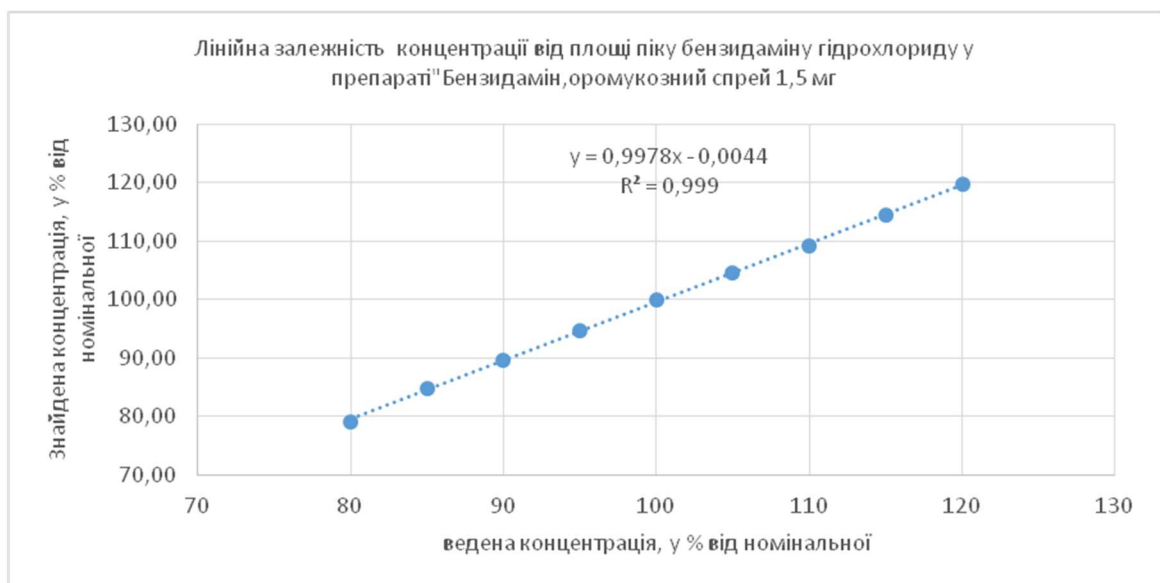


Рис. 4.5 Лінійна залежність бензидаміну гідрохлориду

Метрологічні характеристики лінійної залежності для бензидаміну гідрохлориду та розраховані дані лінійності наведені в таблицях 4.6 та 4.7.

Таблиця 4.6

**Метрологічні характеристики лінійної залежності для бензидаміну,
метилпарабену та ментолу**

<i>Параметр</i>	<i>Умо вне позн ачен ня</i>	<i>Критерій прийнятно сті для допуску 95%-105%</i>	<i>Отримане значення для бензидаміну гідрохлорид у</i>	<i>Критерій прийнятно сті для допуску 90%-110%</i>	<i>Отрима- не значення метилпа рабену</i>	<i>Отрим ане значенн я ментол у</i>
Коефіцієнт кореляції	r	$\geq 0,9981$	0,9990	$\geq 0,9924$	0,9997	0,9993
Вільний член рівняння	a	$\leq 2,6$	0,0044	$\leq 5,1$	0,6756	0,9156
Нахил лінії регресії	b	—	0,9978		1,0021	0,9886
Стандартне відхилення	S_A	—	1,02		0,69	0,998
Тангенс кута нахилу для розрахованої регресійної прямої;	S_b	—	0,0012		0,0069	0,0099
Залишкове стандартне відхилення	S_r	$\leq 0,84$	0,47	$\leq 1,69$	0,27	0,38

Таблиця 4.7

Розраховані дані лінійності для бензидаміну гідрохлориду

Номер модельного розчину	Введена концентрація $X_i=(C_i/C_{RS}) * 100\%$	Знайдена концентрація, $Y_i=(S_i/S_{RS}) * 100\%$	Знайдено, у % до введеного, $Z_i=(Y_i/X_i) * 100\%$
M1	80,00	80,18	99,46
M2	85,00	84,86	99,71
M3	90,00	89,44	99,63
M4	95,00	95,24	100,16
M5	100,00	99,67	99,96
M6	105,00	104,12	99,63
M7	110,00	109,33	99,52
M8	115,00	114,79	99,29
M9	120,00	120,40	100,33
Середнє, Z, %			99,78
Відносне стандартне відхилення RSD_z , %			0,43
Довірчий інтервал $\Delta = t(95\%,8) \cdot SD_z = 1,8595 \cdot SD_z$, %			0,79
Рівень значущості результатів $\Delta \leq \max \Delta_{AS} = 1.6\%$			(0,43 < 1,6)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0,22
Критерій незначущості системної похибки $\delta \leq \max \delta\%$			0,22 ≤ 0,79
Загальний висновок про точність методики			відповідає

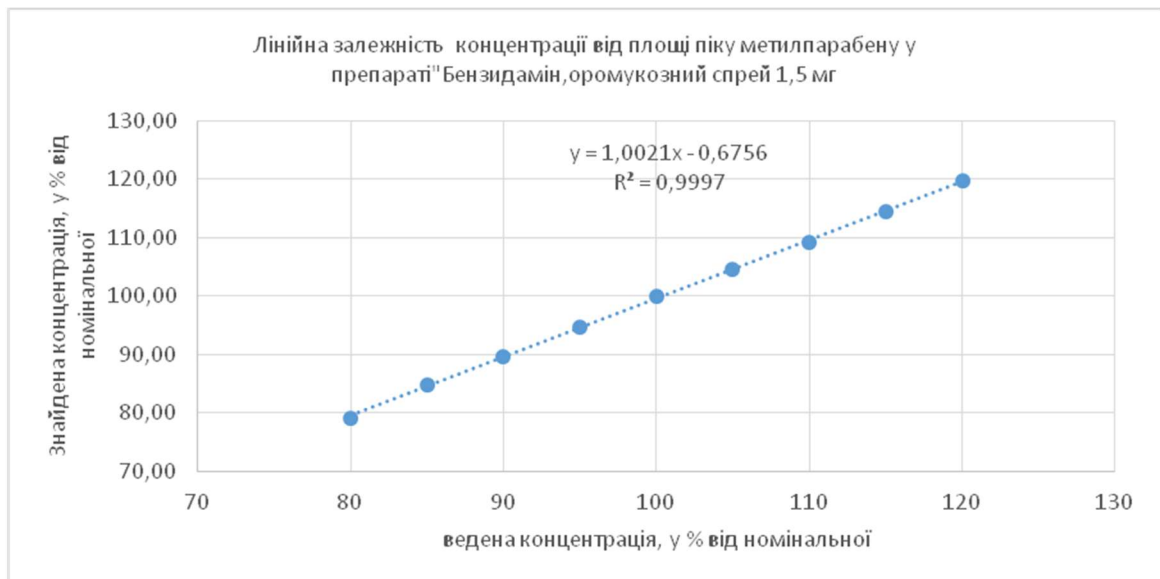


Рис. 4.6 Лінійна залежність метилпарабену

Розраховані дані лінійності для метилпарабену та ментолу наведені в таблиці 4.8.

Таблиця 4.8

Розраховані дані лінійності для метилпарабену та ментолу

Введено в % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Метилпарабен		Ментол		
	Знайдено в % до концентрації розчину порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	Знайдено в % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$ %	Введено в % до концентрації розчину порівняння ($X_i = C_i/C_{st}$, %)	Знайдено в % до концентрації порівняння ($Y_i = S_i/S_{st}$, %)	Знайдено в % до введеного $Z_i = 100 \cdot (Y_i/X_i)$ %
80	79,13	98,91	80,00	80,48	100,60
85	84,76	99,72	85,00	84,86	99,84
90	89,54	99,49	90,00	89,74	99,71
95	94,64	99,62	95,00	94,13	99,08
100	99,88	99,88	100,00	100,13	100,13
105	104,52	99,54	105,00	105,25	100,24

110	109,18	99,25	110,00	109,68	99,71
115	114,48	99,55	115,00	115,39	100,34
120	119,71	99,76	120,00	119,87	99,89
Середнє значення		99,52			99,79
$RSD_z, \%$		0,29			0,42
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z(\%) = t(95, n - 1) \times RSD_z = 1,860 \times RSD_z, \%$		0,54			0,78
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{As}, \%$ (гранична невизначеність)		(0,29<3,2)			Відповідає (0,42<3,2)
Систематична похибка $\delta = \bar{Z} - 100 $		0,48			0,21
Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\% = \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_z}{3} = \frac{0,73}{3} = 0,24(0,18 \leq 0,24)$ якщо не виконується 1), то $\delta \leq 0,32 \times 5.0 = 1.6 \%$ (0,24≤1.6)		(0,48 < 0,54)	Критерій незначущості систематичної похибки $\delta\% = \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_z}{3} = \frac{0,99}{3} = 0,33 (0,33 \geq 0,10)$ якщо не виконується 1), то $\delta \leq 0,32 \times 10 = 3,2 \%$ (0,33≤3,2)		(0,21<0,78)
Загальний висновок про точність методики		відповідає			відповідає

Таким чином, отримані результати показують задовільну лінійність, правильність та повторюваність методики для визначення бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та ментолу. Коефіцієнт кореляції лінійної регресії для всіх речовин становить 0,999 в діапазоні визначення 80%-120% що відповідає

вимогам критерію прийнятності (0,998) і підтверджує лінійність залежності між «введеною» і «знайденою» кількістю досліджуваної речовини.

Методика аналізу також характеризується достатньою прецизійністю, та правильністю, так як відповідає вимогам критеріїв прийнятності для валідаційних параметрів.

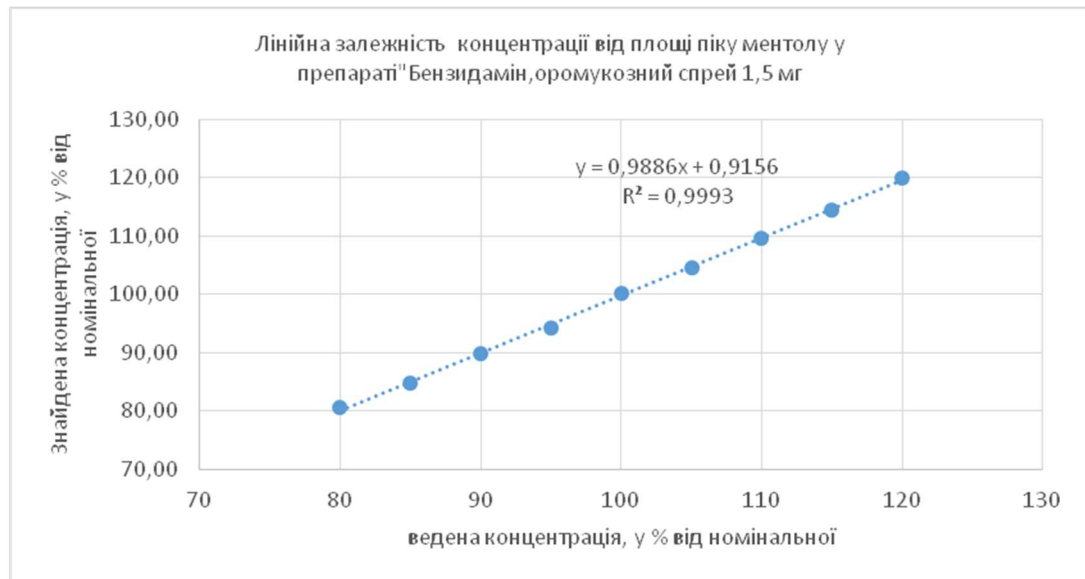


Рис. 4.7 Лінійна залежність ментолу

Внутрішньо лабораторна прецизійність.

Дослідження внутрішньо лабораторної прецизійності проводили на 5 пробах однієї серії препарату, двома аналітиками, в різні дні, шляхом оцінки значення відносного довірчого інтервалу, яке має бути менше максимально припустимої невизначеності результатів аналізу: $\Delta \bar{Z} \leq 1,6$ (при $V = 5\%$) та $\leq 3,2$ (при $V = 10\%$).

Внутрішньолaboratorна прецизійність результатів аналізу підтверджена тим, що величина відносного довірчого інтервалу для п'яти паралельних визначень однієї серії препарату ($\Delta \bar{Z} = 0,16\%$ для бензидаміну, $0,13\%$ для метилпарабену та $0,23$ для ментолу) задовольняє критерію прийнятності ($\leq 1,6\%$ для бензидаміну та $3,2\%$ для метилпарабену та ментолу) (табл. 3.3, 3.4).

Таблиця 4.9

**Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності для
бензидаміну гідрохлориду**

№ розчину	Величина Z_i , %	
	1 аналітик	2 аналітик
1	99,46	99,24
2	98,39	99,19
3	99,11	99,39
4	98,92	99,77
5	99,78	99,48
Середнє \bar{Z} (%), $\bar{Z}(\%) = \frac{1}{5} \sum Z_i$	99,132	99,414
Об'єднане середнє	99,273	
Відносне стандартне відхилення, RSD_Z (%), $RSD_Z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \bar{Z})^2}{15}} \times \frac{100}{\bar{Z}}$	0,20	
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_{\bar{Z}} = t(95\%, 14) \times \frac{RSD_Z}{\sqrt{5}}$	$1,76 \times 0,20 / \sqrt{5}$ $= 0,16 \leq 1,6$	
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	1,6	

Таблиця 4.10

**Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності для
метилпарабену та ментолу**

№ розчину	метилпарабен		ментол	
	Величина Z_i , %		Величина Z_i , %	
	1 аналітик	2 аналітик	1 аналітик	2 аналітик
1	100,28	100,88	98,56	98,14
2	100,03	100,71	99,01	98,25
3	100,34	100,03	98,45	98,63
4	100,65	100,98	98,83	98,39
5	99,95	99,81	99,04	98,47
Середнє \bar{Z} (%), $\bar{Z}(\%) = \frac{1}{5} \sum Z_i$	100,25	100,482	98,778	98,376
Об'єднане середнє	100,17		98,577	
Відносне стандартне відхилення, RSD _Z (%), $RSD_Z(\%) = \sqrt{\frac{\sum_i (Z_i - \bar{Z})^2}{15}} \times \frac{100}{\bar{Z}}$	0,16		0,29	
Відносний довірчий інтервал, $\Delta_{\bar{Z}} = t(95\%, 14) \times \frac{RSD_Z}{\sqrt{5}}$	1,76 × 0,16/ √5 = 0,13 ≤ 3,2		1,76 × 0,29/√5 = 0,23 ≤ 3,2	
Критичне значення збіжності результатів Δ_{As} , %	3,2		3,2	

Значення відносного стандартного відхилення для піків бензидаміну гідрохлориду, метилпапабену та ментолу складає відповідно 0,20%; 0,16% та 0,29%.

Таблиця 4.11

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину бензидаміну гідрохлориду

<i>№ n/n</i>	<i>Операції пробопідготовки</i>	<i>Невизначеність</i>
Розчин порівняння		
1.	Взяття наважки стандарту	$(0,2 \text{ мг} / 150 \text{ мг}) \cdot 100 \% = 0,13 \%$
2.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
3.	Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	0,25 %
4.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Випробовуваний розчин		
5.	Взяття аліквоти препарату 10 мл	0,25 %
6.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0,13^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2} = 0,42$		

Невизначеність кінцевої аналітичної операції розраховували за співвідношенням

$$\Delta_{FAO}, \% = \sqrt{2} \times \frac{RSD_{max} \times t_{95\%,n-1}}{\sqrt{n}};$$

Де:

- RSD_{max} – відносне стандартне відхилення (%), що описане у вимогах до придатності хроматографічної системи;

- $t_{95\%,n-1}$ – односторонній коефіцієнт Стьюдента для імовірності 95 %;
- n – число паралельних хроматограм

Таким чином невизначеність кінцевої аналітичної операції склала:

$$\Delta_{FAO}, \% = \sqrt{2} \times \frac{0,5 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 1,18\%;$$

Прогнозуєма повна невизначеність результатів аналізу не має перевищувати максимально припустиму невизначеність результатів аналізу для допусків вмісту $\pm 5,0$ % складає $\max \Delta_{As} \leq 1,6$ %.

Розрахунок $\Delta_{As}, \%$ проводили з урахуванням невизначеності пробопідготовки та невизначеності кінцевої аналітичної операції:

$$\Delta_{As}, \% = \sqrt{0,42^2 + 1,18^2} = 1,25\% \quad \Delta_{Asteop} = 1,6\%$$

Таким чином, повна прогнозуєма невизначеність результатів для тесту кількісне визначення бензидаміну гідрохлориду методом ГХ не більше критичного значення $\Delta_{Asteop} = 1,6$ %, тобто методика буде давати коректні результати в інших лабораторіях.

Аналогічно розраховували невизначеність для визначення метилпарабену та ментолу.

Таблиця 4.12

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину метилпарабену

<i>№ n/n</i>	<i>Операції пробопідготовки</i>	<i>Невизначеність</i>
Розчин порівняння		
1.	Взяття наважки стандарту	$(0,2 \text{ мг} / 100\text{мг}) \cdot 100 \% = 0,2 \%$
2.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
3.	Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	0,25 %

4.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Випробовуваний розчин		
5.	Взяття аліквоти препарату 10 мл	0,25 %
6.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{0,2^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2} = 0,46\%$		

Невизначеність кінцевої аналітичної операції складала:

$$\Delta_{FAO}, \% = \sqrt{2} \times \frac{0,5 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 1,18\%;$$

Сумарна невизначеність:

$$\Delta_{AS}, \% = \sqrt{0,46^2 + 1,18^2} = 1,27\% \text{ а } \Delta_{A_{\text{стєор}}} = 3,2\%$$

Повна прогнозуєма невизначеність результатів для тесту кількісне визначення метилпарабену методом ГХ не більше критичного значення $\Delta_{A_{\text{стєор}}} = 3,2\%$, тобто невизначеність методики є прийнятною .

Таблиця 4.13

Розрахунок невизначеності пробопідготовки розчину порівняння та досліджуваного розчину ментолу

<i>№ n/n</i>	<i>Операції пробопідготовки</i>	<i>Невизначеність</i>
Розчин порівняння		
1.	Взяття наважки стандарту	$(0,2 \text{ мг} / 20\text{мг}) \cdot 100 \% = 1 \%$

2.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
3.	Взяття аліквоти піпеткою 10 мл	0,25 %
4.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
Випробовуваний розчин		
5.	Взяття аліквоти препарату 10 мл	0,25 %
6.	Доведення до об'єму в мірній колбі на 100 мл	0,12 %
$\Delta_{SP} = \sqrt{1^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2 + 0,25^2 + 0,12^2} = 1,23\%$		

Невизначеність кінцевої аналітичної операції складала:

$$\Delta_{FAO}, \% = \sqrt{2} \times \frac{0,5 \times 2,92}{\sqrt{3}} = 1,18\%;$$

Сумарна невизначеність:

$$\Delta_{AS}, \% = \sqrt{1,23^2 + 1,18^2} = 1,71\% \text{ а } \Delta_{A_{\text{теор}}} = 3,2\%$$

Повна прогнозуєма невизначеність результатів для тесту кількісне визначення ментолу методом ГХ не більше критичного значення $\Delta_{A_{\text{теор}}} = 3,2\%$, тобто методика буде давати коректні результати після трансферу в інші лабораторії.

Робасність методики вивчалася шляхом зміни таких параметрів як швидкість потоку, об'єм введення, початкова температура колонки. Результати дослідження робасності наведені в таблицях 4.14-4.16.

Таблиця 4.14

Результати вивчення впливу початкової температури колонки

<i>Температура колонки, °C</i>	220	215	225
	Бензидаміну гідрохлорид		
Різниця між відношенням площ піків в залежності від початкової температури методики, %	—	0,34	0,26
	Метилпарабен		
Різниця між відношенням площ піків в залежності від початкової температури методики, %	—	0,77	0,53
	Ментол		
Різниця між відношенням площ піків в залежності від початкової температури методики, %	—	0,94	0,81

Таблиця 4.15

Результати вивчення впливу швидкості потоку

<i>Швидкість потоку, мл/хв.</i>	<i>Різниця між відношенням площ піків аналіту та внутрішнього стандарту порівняно із кінцевими умовами методики, %</i>		
	<i>Бензидаміну гідрохлорид</i>	<i>Метилпарабен</i>	<i>Ментол</i>
1,0	-	-	-
0,9	0,19	0,33	0,28
1,1	0,28	0,21	0,41

Таблиця 4.16

Результати вивчення впливу об'єму введення

<i>Об'єм введення, мкл</i>	<i>Різниця між відношенням площ піків аналіту та внутрішнього стандарту порівняно із кінцевими умовами методики, %</i>		
	<i>Бензидаміну гідрохлорид</i>	<i>Метилпарабен</i>	<i>Ментол</i>
1,0	-	-	-
0,9	0,09	0,11	0,12
1,1	0,06	0,10	0,11

Показано, що невелика зміна параметрів методики ($\pm 10\%$) не вплинула на кількісне визначення аналізованих сполук, тому методика є надійною при звичайному застосуванні.

Розроблена методика одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та ментолу за допомогою ГХ є простою, швидкою, прецизійною, правильною, специфічною, робасною та відповідає підходу зеленої хімії.

Розробка методики ґрунтувалася на підборі екстракційного розчинника з подальшим хроматографуванням методом газової хроматографії.

Для зменшення невизначеності кількісного визначення та похибки в процесі екстракції та пробопідготовки було обрано метод внутрішнього стандарту, в якості якої було обрано речовину, що є спорідненою для бензидаміну гідрохлориду, має схожі фізико-хімічні властивості, що характеризується незначною різницею в хроматографічному утримуванні та дозволяє елюювати речовини впродовж одного хроматографічного аналізу. Параметри хроматографічного методу варіювали для досягнення прийняттого розділення та селективності. Було підібрано оптимальні умови температурного градієнту, параметрів блоку вводу проби та детектору.

Було обрано оптимальні умови поділу потоку та швидкість рухомої фази для запобігання перегрузу хроматографічної системи, а також для отримання задовільної сіметрії хроматографічних сигналів.

В результаті для розділення було обрано капілярну колонку HP-5, 30 м, оскільки вона продемонструвала найкращу селективність та ефективність хроматографічної системи. Високий діапазон робочої температури дозволяє проводити розділення речовин, які містять полярні групи та мають високі температури кипіння.

Загальний час одної інжекції за запропонованих умов становить 30 хв., що набагато менше, ніж у випадку хроматографування кожного з компонентів за окремими методиками контролю якості.

Суть розробленого методу відповідає підходу зеленої хімії з точки зору одночасного визначення декількох сполук, часу проведення аналізу та одночасно

ефективного розділення. При цьому обраний метод газової хроматографії являє собою відносно «зелений» метод, який дозволяє мінімізувати шкідливий вплив на оточуюче середовище та персонал лабораторії контролю якості та згідно запропонованого дерева рішень є найбільш прийнятним у відповідності принципу «зеленої хімії».

Метод демонструє прийнятні показники та придатність для використання в лабораторіях контролю якості та дослідних лабораторіях.

Висновки до розділу 4

1. Розроблено методику одночасного визначення ментолу, метилпарабену та бензидамін гідрохлориду у оромукозній лікарській формі бензидамін гідрохлориду методом газової хроматографії. Час утримування ментолу, метилпарабену та бензидаміну гідрохлориду склав 5,0, 9,2 та 19,4 хв. відповідно. Проведено процедуру валідації методики одночасного визначення ментолу, метилпарабену та бензидамін гідрохлориду згідно вимогДФУ та ІСН Q2, яка підтверджує селективність, придатність хроматографічної системи, лінійність, прецизійність, правильність та робасність методики. Усі валідовані параметри були в межах критеріїв прийнятності. Методика є лінійною для всіх сполук з коефіцієнтом кореляції більше 0,999. Максимальне відносне стандартне відхилення для трьох паралельних введень становило менше 0,3% для кожної сполуки. Правильність для всіх сполук була в межах 98-102%. Методика є робасною і на неї не впливатимуть незначні зміни параметрів методу. Розроблена аналітична методика може бути використана в лабораторіях контролю якості для визначення бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та олії перцевої м'яти в оромукозній лікарській формі.

Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:

Chorny V.A., Georgiyants V.A., Gureyeva S.N., Chorna O.V. Simultaneous determination of benzydamine hydrochloride, methylparaben and peppermint oil in a spray dosage form by gas chromatography. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019. Vol. 11, № 6. P. 147–153.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено дерево рішення по вибору розробки аналітичних процедур з точки зору «зеленої хімії».
2. Запропоноване дерево рішення дає змогу визначити методи для розробки методів кількісного визначення та супровідних домішок препарату на основі бензидаміну гідрохлориду.
3. Використані при розробці готової лікарської форми АФІ та допоміжні речовини, відповідають вимогам Європейської Фармакопеї діючого видання, дозволені до медичного застосування та використовуються для виробництва рідких лікарських форм.
4. Розроблено методику визначення супровідних домішок бензидаміну гідрохлориду в готовій лікарській формі методом ВЕРХ. Визначено продукти деградації бензидаміну гідрохлориду під дією стресс-тестів. Проведено процедуру валідації розробленої методики та підтверджено її специфічність, лінійність, прецизійність, правильність, робасність. Усі валідовані параметри були в межах критеріїв прийнятності. Показання детектора були лінійними у діапазоні концентрацій аналіту 0,05–1,2% відносно номінальної концентрації бензидаміну гідрохлориду у препараті.
5. Розроблену методику визначення супровідних домішок покладено в основу методики ідентифікації бензидаміну гідрохлориду та його метаболіту бензидамін N-оксиду в присутності інших НПЗЗ (пат. України на корисну модель №142803).
6. Розроблено методику одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену в готовій лікарській формі методом ВЕРХ. Час однієї хроматографічної процедури склав менше 10 хв. Проведено процедуру валідації розробленої методики відповідно до вимог ДФУ та ІСН Q2 та підтверджено її надійність, специфічність, лінійність у діапазоні концентрацій 80–120 % для номінальної концентрації аналізованої речовини у препараті. Всі параметри валідації відповідають критеріям прийнятності. Максимальне RSD для кожного аналіту становило менше 1,3 %. Точність

методу була в межах критеріїв прийнятності. Розроблена методика може бути застосована у рутинному контролі в лабораторіях контролю якості для одночасного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену в лікарських формах бензидаміну.

7. Розроблено методику визначення залишкових кількостей бензидаміну на поверхні технологічного обладнання методом УФ-спектрофотометрії. Проведено процедуру валідації розробленої методики за показниками специфічності, лінійності та точності. Усі валідовані параметри були в межах критеріїв прийнятності згідно вимог ДФУ.
8. Розроблено методику кількісного визначення бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену у готовій лікарській формі методом газової хроматографії. Час однієї хроматографічної процедури склав 17,5 хв. Проведено процедуру валідації розробленої методики відповідно до вимог ІСН Q2 та ДФУ. Підтверджено її специфічність, лінійність, відтворюваність, правильність та робастність. Усі валідовані параметри були в межах критеріїв прийнятності. Методика є лінійною для всіх сполук що визначаються. Коефіцієнт кореляції методики для бензидаміну гідрохлориду та метилпарабену становить більше 0,999.
9. За результатами мікробіологічних досліджень для потенціювання антибактеріальних властивостей бензидаміну гідрохлориду найбільш ефективною виявилась олія м'яти перцевої. Для вибору постачальника досліджено відповідність зразків олії м'яти перцевої на їх відповідність вимогам ЄФ. З'ясовано, що хімічний профіль досліджуваних олій та вміст нормованих речовин відповідає фармакопейним вимогам.
10. Розроблено методику одночасного визначення ментолу (маркерному компоненту) ефірної олії м'яти, метилпарабену та бензидаміну гідрохлориду у оромукозній лікарській формі бензидамін гідрохлориду методом газової хроматографії. Час утримування ментолу, метилпарабену та бензидаміну гідрохлориду склав 5,0, 9,2 та 19,4 хв. відповідно. Сумарний час одного хроматографічного аналізу склав 30 хв. Проведено процедуру

валідації методики одночасного визначення ментолу, метилпарабену та бензидамін гідрохлориду згідно вимог ДФУ та ІСН Q2, яка підтверджує селективність, придатність хроматографічної системи, лінійність, прецизійність, правильність та робасність методики. Усі валідовані параметри були в межах критеріїв прийнятності. Методика є лінійною для всіх сполук з коефіцієнтом кореляції більше 0,999. Максимальне відносне стандартне відхилення для трьох паралельних введень становило менше 0,3% для кожної сполуки. Правильність для всіх сполук була в межах 98-102%. Методика є робасною і на неї не впливатимуть незначні зміни параметрів методу. Розроблена аналітична методика може бути використана в лабораторіях контролю якості для визначення бензидаміну гідрохлориду, метилпарабену та олії перцевої м'яти в оромукозній лікарській формі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Чорний В.А., Георгіянц В.А. Розмір частинок оромукозних спреїв як основний параметр, що визначає якість і характеристики продукції. *Зб. наук. прац. співробіт. НМАПО імені П. Л. Шупика*. 2017. № 28. С. 140-147.
2. Сушинская О.А., Голяк Н.С. Анализ ассортимента лекарственных средств в виде спреев в республике Беларусь. *Материалы научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Инновации в медицине и фармации»*. 2016. С. 814–818.
3. Bakshi A., Bajaj A., Malhotra G., Madan M., Amrutiya N. A novel metered dose transdermal spray formulation for oxybutynin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008. Vol.70, № 6. P. 733–739.
4. Державна фармакопея України. 2 вид. Т. 1. Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. 1128 с.
5. Губин М.М. Новая лекарственная форма – спрей. Отличия от аэрозолей, особенности технологии производства. *Медицинский бизнес. Фармацевтические технологии и упаковка*. 2008. № 11. С. 76–78.
6. Губин М.М., Азметова Г.В. Сравнительный анализ лекарственных форм: спрей и аэрозоль. *Фармация*. 2008. № 7. С. 40–48.
7. Настанова СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2016 Належна виробнича практика. Готові лікарські засоби. Київ: МОЗ, 2015. 315 с.
8. Георгиевский В.П., Конев Ф.А. Технология и стандартизация лекарств. Харьков.: РИРЕГ, 1996. 784 с.
9. Безуглая Е.П., Ляпунов Н.А., Бовтенко В.А. Методологический подход к фармацевтической разработке лекарственных препаратов и ее стандартизация. *Фармаком*. 2008. № 4. С. 75-82.
10. Тихонов О.І., Ярних Т.Г., Зупанець І.А. Біофармація: Підруч. для студ. фармац. вищ. навч. закл. і ф-тів. Х.: Вид-во НФаУ; Золоті сторінки, 2003. 240 с.

11. Деревянко И. Фармацевтический рынок Украины: анализ долгосрочных тенденций потребления препаратов в зависимости от форм их выпуска. *Фармацевтическая отрасль*. 2014. № 6 (47). С. 128–129.
12. Chvan P., Bajaj A., Parab A. Topical sprays: novel drug delivery system. *International Journal of Pharma and Chemical Research*. 2016. Vol. 2, №. 2. P. 102–111.
13. Djupesland P.G. Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective – a review. *Drug Delivery and Translational Research*. 2013. № 3 (1). P. 42–62.
14. Савлевич Е.Л., Дорощенко Н.Э., Славинская И.С. Важные нюансы воспалительного процесса в ротоглотке и выбор тактики оптимального лечения. *Медицинский Совет*. 2017. № 16. С. 48-54.
15. Кошир П. Сравнительное исследование терапевтической эквивалентности исследуемой и стандартной фиксированной комбинации 3 мг бензидамина гидрохлорида и 1 мг цетилпиридиния хлорида в лечении боли в горле, связанной с инфекциями верхних дыхательных путей. *Современная педиатрия*. 2017. № 2(82). С. 59-65.
16. Dierig A., Heron L.G., Lambert S.B., Yin J.K., Leask J., Chow M.Y., Sloots T.P., Nissen M.D., Ridda I., Booy R. Epidemiology of respiratory viral infections in children enrolled in a study of influenza vaccine effectiveness. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2014. Vol. 8, №3. P. 293–301.
17. Shulman S.T., Bisno A.L., Clegg H.W., Gerber M.A., Kaplan E.L., Lee G., Martin J.M., VanBeneden C. Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012. Vol. 55, № 10. P. 1279-1282.
18. Савлевич Е.Л., Дорощенко Н.Э. Патогенетическое обоснование топической терапии воспалительной патологии ротоглотки. *Фарматека*. 2015. № 1. С. 76-79.

19. Чекман І.С., Вікторов О.П., Горчакова Н.О., Свінціцький А.С. Нестероїдні протизапальні препарати: їх ефективність і доступність, прийнятність для пацієнта. Київ: Поліграф Плюс, 2011. 118 с.
20. Уварова Ю. Рынок нестероидных противовоспалительных препаратов. *Ремедиум*. 2010. № 9. С. 17–20.
21. Fendric A.M., Pan D.E., Johnson G.E. OTC analgesics and drug interactions: clinical implications. *Osteopathic Medicine and Primary Care*. 2008. Vol.7, № 2. P. 237–246.
22. Зязева Н.Н. Современное состояние, условия и перспективы развития мирового фармацевтического рынка. *Российский внешнеэкономический вестник*. – 2015. № 12. С. 118–129.
23. Чумакова Ю.Г., Трояненко Л.М., Голубкова Н.М. Оцінка ефективності препарату «ТантумВерде®» у комплексному лікуванні захворювань пародонту та слизової оболонки порожнини рота. *Современная стоматология*. 2010. № 3. С. 55–60.
24. Mangano G., Apicella C., Vitiello M., Milanese C., Polenzani L. Benzylamine local anesthetic activity and [3h]-batrachotoxin binding sites (poster presentation). *31-st National Congress of the Italian Society of Pharmacology*. Trieste, Italy, 2013.
25. Pina-Vaz C., Rodrigues A.G., Sansonetty F., Martinez-De-Oliveira J., Fonseca A.F., Merdh P.A. Antifungal activity of local anaesthetic against Candida Species. *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. 2014. № 8. P. 124–37.
26. Sironi M., Pozzi P., Polentarutti N., Benigni F., Coletta I., Guglielmotti A., Milanese C., Ghezzi P., Vecchi A., Pinza M., Mantovani A. Inhibition of inflammatory cytokine production and protection against endotoxin toxicity by benzylamine. *Cytokine*. 2006. Vol.8, № 9. P. 710–716.
27. Коваленко В.Н., Викторова А.П. Компендиум 2017 – Лекарственные препараты. Киев: Морион, 2017. 2270 с.
28. Державний реєстр лікарських засобів [Електроний ресурс]: Режим доступу: <http://www.drlz.kiev.ua/>

29. Чумакова Ю.Г., Трояненко Л.Н., Голубкова Н.Н.. Оценка эффективности препарата «ТАНТУМ ВЕРДЕ» в комплексном лечении заболеваний пародонта и слизистой оболочки полости рта. *Стоматолог-практик*. 2010. №4. С. 54–57.
30. Жукова Е.А., Казарина Л.Н., Пурсанова А.Е. Оценка эффективности лечения катарального гингивита у детей с хроническим гастродуоденитом путем сочетанного применения «Полиоксидония» и «Тантумверде». *Пародонтология*. 2008. № 3. С. 6–9.
31. Орехова Л.Ю., Кудрявцева Т.В., Акулович А.В., Сахарова Е.И. Применение препарата «ТантумВерде» на пародонтологическом приеме. *Институт стоматологии*. 2003. № 3. С. 58.
32. Страхова С.Ю., Дроботько Л.Н. Применение препарата «ТантумВерде®» при поражениях слизистой оболочки полости рта травматического происхождения. *Стоматолог-практик*. 2012. № 4. С. 46–48.
33. Семенів Д.В.. Аналіз фармацевтичного ринку України на прикладі стоматологічних препаратів. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2014. № 1(33). С. 44–49.
34. Шульга Л.І., Безценна Т.С., Пімінов О.Ф., Ролік С.М., Якущенко В.А. Дослідження асортименту стоматологічних лікарських засобів, представлених на фармацевтичному ринку України. *Запорізький медичний журнал*. 2012. № 5(74). С. 18–23.
35. Кобець Ю.М. Аналіз асортименту стоматологічних препаратів. *Вісник фармації*. 2013. №3(75). С.72–74.
36. Мнушко З.М., Попова Ю.В. Методики оцінки рівня конкурентоспроможності лікарських препаратів: методичні рекомендації. К., 2007.
37. Preshaw P.M. Definitions of periodontal disease in research. *Journal of Clinical Periodontology*. 2009. Vol. 36. P. 1–2.

38. Якубчук О.М., Фетісова О.Г., Доровський О.В. Андрюкова Л.М. Обґрунтування цільового профілю якості для розробки комбінованих очних крапель для терапії глаукоми. *Фармацевтичний часопис*. 2015. № 4. С. 25-31.
39. Андрюкова Л.М., Фетісова О.Г., Якубчук О.М., Коваленко С.М. Визначення критичних показників якості лікарської форми очні краплі. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2013. № 6. С. 4–9.
40. Андрюкова Л.М. Дослідження з стандартизації фармацевтичної розробки лікарських препаратів у формі очних крапель: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. фармацев. наук : спец. 15.00.03 «Стандартизація та організація виробництва лікарських засобів». Харків, 2011. 38 с.
41. Baiocchi L. Manufacturing of benzydamine purification of benzydamine using steam distillation. Pat. № 4749794 USA; appl. 29.07.1986; publ. 07.06.1988.
42. British Pharmacopoeia. 2020. Vol. I. P. 284–285.
43. European Pharmacopoeia 10.0. 2019. P. 1947–1948.
44. Avdeef A. Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State. John Wiley & Sons, Inc., 2003. 287 p.
45. СТ-Н МОЗУ 42–3.0:2011. Лікарські засоби. Фармацевтична розробка (ICH Q8). Київ: МОЗ України, 2012. 35 с.
46. Guidance for Industry: Q8 Pharmaceutical Development. ICH. 2009. [Електроний ресурс]: Режим доступу: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q8r2-pharmaceutical-development>
47. Guidance for industry. ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism, Chemistry, Manufacturing and Control Information. 2007. [Електроний ресурс]: Режим доступу: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/andaspharmaceutical-solid-polymorphism-chemistry-manufacturing-and-controls-information>
48. Kumar S. The importance of antioxidant and their role in pharmaceutical science. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*. 2014. Vol. 1, № 1. P. 27–44.

49. Перцев І.М., Дмитрієвський Д.І., Рибачук В.Д., Хоменко В.М., Гудзенко О.П., Котенко О.М., Маслій Ю.С. Допоміжні речовини в технології ліків: вплив на технологічні, споживчі, економічні характеристики і терапевтичну ефективність : навч. посіб. для студ. вищ. фармац. навч. закл. Х. : Золоті сторінки, 2010. 600 с.

50. Гудзь Н.І., Калинюк Т.Г., Білоус С.Б. Критерії вибору та безпеки допоміжних речовин для оральних рідких лікарських засобів. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. 2009. №3–4. С. 130–141.

51. Білоус С. Б., Чекман І. С., Мовчан Б. О., Рубан Н. М., Калинюк Т. Г. Фармацевтична розробка м'яких лікарських засобів для зовнішнього застосування з антимікробною дією. *Людина та ліки: матер. III Націон. Конгресу*. Київ, 2010. С. 18–19.

52. Білоус С.Б., Калинюк Т.Г., Чекман І.С. Методологічні підходи до досліджень із фармацевтичної розробки лікарських засобів з нанорозмірними інгредієнтами. *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. 2012. №1–2. С. 95–101.

53. Білоус С.Б., Калинюк Т.Г., Гудзь Н.І. Особливості фармацевтичної розробки лікарських засобів з діючими речовинами, одержаними методами нанотехнології. *Фармація України. Погляд у майбутнє. Матеріали VII Національного з'їду фармацевтів України*. Харків: Видавництво НФАУ, 2010. С. 443.

54. Перцев І.М., Рубан О.А. Чи можна провести чітку межу між активними та допоміжними речовинами? *Провізор*. 2011. №7. С. 20–25.

55. Scheler S., Saupé S., Herre A., Fahr A. Preservation of liquid drug preparations for oral administration. *Journal of Pharmaceutical Science*. 2010. Vol. 99, № 1. P. 357–367.

56. Hrynovets I., Kalyniuk T., Hrynovets V. Polymeric films with decametoxinum howtheof treatment of stomatology disease. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2009. № 3. С. 79–83.

57. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Sixth edition. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2009. 888 p.
58. Ковалевська І.В., Рубан О.А. Перспектива використання полімерів, як допоміжних речовин у виробництві твердих лікарських форм. *Scientific Journal «ScienceRise»*. 2015. №11/4(16). P. 4–8.
59. Waterman K.C., Adami R.C., Alsante K.M., Antipas A.S., Arenson D.R., Carrier R., Hong J., Landis M.S., Lombardo F., Shah J.C., Shalaev E., Smith S.W., Wang, H. Hydrolysis in pharmaceutical formulations. *Pharmaceutical development and technology*. 2002. Vol.7, № 2. P. 113–146.
60. Ващенко О.О., Калинюк Т.Г. Обґрунтування вибору допоміжних речовин при розробці складу лікувальних лаків для нігтів. *Фармація України. Погляд у майбутнє: Матер. VII Націонал. з'їзду фармацевтів України. У 2-х томах : Т.1*. Харків: Вид-во НФАУ, 2010. С. 456.
61. Голейко Д.М., Голейко М.В., Гавась Ю.І. Опрацювання складу та технології стоматологічних плівок з метронідазолом та хлорофіліптом. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: Матеріали 3-ї науково-практичної конференції*. Тернопіль, 2009. С. 50.
62. Федін Р.М., Гордзієвська Н.А., Магас М.Р. Опрацювання складу і технології протимікробного, знеболюючого, регенеруючого засобу у формі спрею. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів: Матеріали 3-ї науково-практичної конференції*. Тернопіль, 2009. С.70.
63. Hrynovets I., Kalyniuk T., Hrynovets V. Nowy sposób wprowadzenia lekarskich preparatów metodą aplikacji na błonę śluzową jamyustnej. *Środowisko i jego wpływ na stan zdrowia jamy ustnej. Problemy stomatologiczne w medycynie. Problemy medyczne w stomatologii: IV Międzynarodowa konferencja naukowo-shkoleniowa (23 kwietnia 2010)*. Katedra i zakład stomatologii zachowawczej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Nałęczów, 2010. PB 20. P. 108.

64. Hrynovets I., Kalyniuk T., Hrynovets V. Opracowanie składu nośnika, wybór substancji uzupełniających i technologia produkcji leczniczych płytek stomatologicznych. *Środowisko i jego wpływ na stan zdrowia jamy ustnej. Problemy stomatologiczne w medycynie. Problemy medyczne w stomatologii: IV Międzynarodowa konferencja naukowo-shkoleniowa (23 kwietnia 2010)*. Katedra i zakład stomatologii zachowawczej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Nalęczów, 2010. PB 20. P.109.
65. Curatolo W. Physical chemical properties of oral drug candidates in the discovery and exploratory development settings. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. 1998. Vol. 1, № 9. P. 387–393.
66. Гудзь Н.І. Коритнюк, Р.С., Калинюк Т.Г. Критерії вибору допоміжних речовин для рідких парентеральних лікарських засобів. *Фармацевтичний часопис*. 2009. № 4. С. 31–37.
67. Ільницька О.М., Рожко М.М., Попович З.Б., Жизномирська О.О., Голейко Д.М. Репецька О.М. Стоматологічна пов'язка для лікування і профілактики захворювань тканин пародонту. Пат. № 44291, Україна; заявл. 08.05.2009; опубл. 25.09.2009. Бюл № 18.
68. Begunova N.V. The choice of the optimal pH range for a parenteral drug based on salts of aldonic and polycarboxylic acids. *Вісник фармації*. 2014. №3(79). С. 25–29.
69. Yakubchuk O.M., Fetisova O.G., Andryukova L.M., Kovalenko S.M. Substantiation of the pH range for stability of timolol maleate and taurine in the aqueous solution. *News of Pharmacy*. 2013. № 4(76). P. 43–47.
70. Glass B.D, Haywood A. Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*. 2006. Vol. 9, №3. P. 398–426.
71. Stringer W.F. Stable Aqueous Cyclosporin Compositions. Pat. 20090286718 USA. appl. 17.11.2008; publ. 19.11.2009.

72. Richard B., Charles H.M., Nicholas H. Solution aqueuse stable de deoxyfructosazine. Pat. № 2803515B1 France; appl. 06.01.2000; publ.13.07.2001.
73. Шевченко В.О., Бондар В.С., Безрукавий Є.А. Вибір та вивчення впливу допоміжних речовин на якість ін'єкційного розчину папаверину гідрохлориду. *Український медичний альманах*. 2012. Т. 15, № 5. С. 283–284.
74. Swarbick J. Encyclopedia of pharmaceutical technology. 3-rd ed. NewYork, London: Informa health care, 2007. P.1609–1622.
75. Гуреєва С.М. Демчук, М.Б., Грошовий Т.А. Дослідження асортименту допоміжних речовин, які використовуються в лікарських засобах, що зареєстровані на території України. *Фармацевтичний часопис*. 2014. № 1. С. 63–69.
76. Шикова Ю.В., Лиходед В.А., Епифанова А.В. Бахтиярова С.Б., Кадырова З.Р., Баймурзина Ю.Л., Зарипов Р.А. Современные вспомогательные вещества в изготовлении лекарств. *Фармация*. 2011. № 6. С. 33–36.
77. Алмакаев М.С., Бегунова Н.В., Алмакаєва Л.Г. Розробка складу комбінованого гіпербаричного розчину місцевого анеститка. *Вісник фармації*. 2011. № 4(68). С. 24–27.
78. Meyer B. K., Ni A., Hu B., Shi, L. Antimicrobial preservative use in parenteral products: Past and present. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007. Vol. 96, № 12. P. 3155–3167.
79. Charnock C., Finsrud T. Combining esters of para-hydroxy benzoic acid (parabens) to achieve increased antimicrobial activity. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2007. Vol. 32, № 6. P. 567–572.
80. Завалько І.В. Сучасний стан створення суспензій для застосування в офтальмологічній та отологічній практиці. *Фармацевтичний часопис*. 2011. № 4. С. 184–188.
81. Kulshreshtha A.K., Singh O.N., Wall M.G. Pharmaceutical suspensions from formulation development to manufacyuring. London: Springer New Dordrecht Heidelberg, 2010. 327 p.

82. Note for Guidance on excipients, antioxidants and antimicrobial preservatives in the dossier for application for marketing authorization of a medicinal products [Електронний ресурс]: Режим доступу:

<http://www.jpcc.gr.jp/document/WC500003388.pdf>

83. Науменок Л.Г. Технологічні аспекти створення орального лікарського засобу на основі ніфуроксазиду. *Вісник фармації*. 2012. № 4(72). С. 19–21.

84. Титова А.В., Арзамасцев А.П. Технологические функции и свойства вспомогательных веществ и их систематизация. *Человек и лекарство: тез. докл. XI Росс. нац. конгр.* Москва, 2004. С. 897–898.

85. Parikh I., Selvaraj U. Compositions comprising microparticles of water-insoluble substances. Pat. № 743917, Australia; appl. 10.05.2000; publ. 07.02.2002.

86. Stogniew M., Zadei J.M. Stable amorphous amifostine compositions and methods for the preparation and use of the same. Pat. № 6407278 USA; appl. 16.11.1998; publ. 18.06.2002.

87. Gupta S., Maurer B.J., Reynolds P., Vishnuvajjala B.R. Pharmaceutical compositions of fenretinide having increased bioavailability and methods of using the same. Pat. № 7169819 USA; appl. 05.12.2001; publ. 30.01.2007.

88. Оганесян Е.А., Бадур Х., Балабаньян В.Ю., Аляутдин Р.Н. Разработка пероральной лекарственной формы рифампицина на основе полимера EUDRAGIT RL. *Фармация*. 2009. №5. С. 42-45.

89. Изумрудов В.А. Стабилизация полиэлектролитных комплексов карбоксилсодержащих полианионов в нейтральных и слабокислых средах и факторы, влияющие на нее. *Высокомолекулярные соединения*. 2007. Т. 49, №4. С. 691–700.

90. Алмакаев М.С., Шевченко І.В., Прокопенко І.І. Дослідження щодо розробки складу комбінованого лікарського засобу «Диклокаїн». *Фармацевтичний журнал*. 2008. № 5. С. 90–94.

91. Алмакаев М.С., Шевченко И.В. Комбинированный препарат на основе диклофенака натрия и лидокаина. *Актуальні питання фармацевтичної та*

медицинської науки та практики : зб. наук. ст. Запорізького державного медичного ун-ту. 2006. Т. 2, № 15. С. 465.

92. Андреева И.Н., Степанова Э.Ф., Шевченко А.М. Основные направления и перспективы развития технологии корригированных препаратов в отечественном фармацевтическом производстве. *Успехи современного естествознания*. 2004. № 1. С. 99–100.

93. Андреева И.Н., Степанова Э.Ф., Албаков А.Ю. Сиропы, содержащие фитопрепараты – технология, методологические принципы исследования. *Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: тез. докл. 5 междунар. съезда. 5-7 июля 2001 г.* СПб, 2001. С.59–62.

94. Якусевич Р.В., Евсеева С.Б. Разработка состава и технологические исследования корригированной лекарственной формы на базе цветков пижмы. *Нано- и супрамолекулярная химия в сорбционных и ионообменных процессах: материалы Всерос. конф. с элементами научной школы для молодежи (Белгород, 14-17 сент. 2010 г.)*. Белгород, 2010. С. 163.

95. Ким М.Е., Степанова Э.Ф., Евсеева С.Б. Сиропы: состав, технология, современное состояние исследований. *Фармация и фармакология*. 2014. № 3. С. 7–14.

96. Синева Т.Д., Потехина Т.С., Витенберг И.Г. Разработка технологии стандартизация качества сиропа сорбита как дисперсионной среды лекарственных препаратов для детей. *Химико-фармацевтический журнал*. 2007. Т. 35, № 12. С. 26–29.

97. Ahire S.B., Bankar V.H., Gayakwad P.D., Pawar S.P. A review taste masking techniques in pharmaceuticals. *Pharma ScienceMonitor*. 2012. V. 3, № 3. P. 68–82.

98. Шевченко В.А., Бондарь В.С., Ролик С.Н., Поветкин С.А.. Современные подходы к разработке оральных лекарственных средств в полиэтиленовой упаковке. *Научный и информационно-аналитический журнал для врачей, провизоров и фармацевтов «Фармация Казахстана»* 2014. № 4. С. 42–46.

99. Черних В.П. Фармацевтична енциклопедія. К.: «Моріон», 2005. 848 с.
100. Чуешова В.И. Промышленная технология лекарств: Т.2. Х.: МТК-Книга; Изд-во НФАУ, 2002. 716 с.
101. Khan I., Mulpuri K., Das B., Mohiuddin M.D., Rahman M.H.Ur. Analytical Techniques (Chromatography, Spectroscopy, Electrophoresis) In Pharmaceutical Analysis: A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Sciences*. 2015. Vol. 4, № 1. P. 19–27.
102. Kupiec T. Quality control Analytical Methods: high-performance liquid chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 2004. Vol. 8, № 3. P. 233–237.
103. Ahuja S., Ahuja S. High Pressure Liquid Chromatography. In Ahuja S., Jespersen N. (eds.) *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, 2006. Vol. 47. P. 486–559.
104. Lindholm J. Development and Validation of HPLC Methods for Analytical and Preparative Purposes. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 995, 2004. 87 p.
105. Kazakevich Y., Lobrutto R. HPLC for pharmaceutical scientists. New Jersey: John Wiley, 2007. 1135 p.
106. Ahuja S., Dong M.W. Handbooh of pharmaceutical analysis by HPLC. Amsterdam: Elsevier science, 2005. 679 p.
107. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Основы теории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига, "Зинатне", 1988. 390 с.
108. Хацаюк А.С., Павлова О.Е., Эхова М.Э. Роль и значение высокоэффективной жидкостной хроматографии в практике высокотехнологичных лабораторных исследований. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2016. № 3(66). С. 215–219.
109. Carlucci G., Iuliani P., Di Federico L. Simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and five impurities in an oral collutory as a pharmaceutical

formulation by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 2010. Vol. 48, № 10. P. 854–859.

110. Catanese B., Lagana A., Marino A., Picollo R., Rotatori M. HPLC determination of benzydamine and its metabolite N-oxide in plasma following oral administration or topical application in man, using fluorimetric detection. *Pharmacological Research Communications*. 1986. Vol. 18, № 4. P. 385–403.

111. Dogan A., Basci N.E. Development and validation of RP-HPLC and ultraviolet spectrophotometric methods of analysis for the quantitative determination of chlorhexidine gluconate and benzydamine hydrochloride in pharmaceutical dosage. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2011. Vol. 7, № 3. P. 167–175.

112. Reid E., Robinson J.D., Wilson I. D. Bioanalysis of Drugs and metabolites: especially anti-inflammatory and cardiovascular. Springer US, 1988. 415 p.

113. Bebawy L. I., Kousy N. E. Stability-indicating method for the determination of hydrochlorothiazide, benzydamine hydrochloride and clonazepam in the presence of their degradation products. *Pharmaceutical analysis*. 1997. Vol. 30. P. 1379–1397.

114. El-Didamony A.M. Spectrophotometric determination of benzydamine HCl, levamisole HCl and mebeverine HCl through ion-pair complex formation with methyl orange // [*Spectrochimica acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*](#). 2007 Vol. 69, № 3. P. 770–775.

115. Sharma D., Singh R., Garg R. Development and validation of stability indicating uv spectro-photometric method for the estimation of benzydamine hydrochloride in bulk and in pharmaceutical dosage form: a novel analytical technique for conducting in-vitro quality control tests // *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2018. Vol. 9, № 2. P. 678–686.

116. Siddiqui M.R., Alothman Z.A., Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017. Vol. 10. P. S1409–S1421

117. The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPS) Texts and annexes revised in 2017. Stockholm, 2018. 78 p.

118. Namiesnik J. Pro-Ecological education. *Environmental Science and Pollution Research*. 1999. Vol. 6, № 4. P. 243–244.

119. Talaviya S., Majmudar F. Green Chemistry: A Tool in Pharmaceutical Chemistry. *NHL Journal of Medical Sciences*. 2012. Vol. 1, № 1. P. 7–13.

120. Samanidou V.F. Pharmaceutical Analysis from a Green Perspective. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*. 2014. Vol. 1, № 4. 1016.

121. Gałuszka A., Migaszewski Z., Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013. Vol. 50. P. 78–84.

122. Koel M., Kaljurand M. Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry. *Pure and Applied Chemistry*. 2006. Vol. 78. № 11. P. 1993–2002.

123. Кулешова С.И., Удалов В.С., Симонова Е.П., Денисова И.А., Мишкин Д.В. Совершенствование методик определения примесей в антимикробных лекарственных средствах хроматографическими методами на примере анализа ципрофлоксацина. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018. Т. 8, № 4. С. 262-270.

124. Cielecka-Piontek J., Zalewski P., Jelińska A., Garbacki P. UHPLC: The greening face of liquid chromatography. *Chromatographia*. 2013. Vol. 76, № 21–22. P. 1429–1437.

125. Boussès C., Ferey L., Vedrines E., Gaudin K. Using an innovative combination of quality-by-design and green analytical chemistry approaches for the development of a stability indicating UHPLC method in pharmaceutical products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015. Vol. 115. P. 114–122.

126. Płotka J., Tobiszewski M., Sulej A. M., Kupka M., Górecki T., Namieśnik J. Green chromatography. *Journal of Chromatography*. 2013. Vol. 1307. P. 1–20.

127. Wardencki W., Namieśnik J. Some Remarks on Gas Chromatographic Challenges in the Context of Green Analytical Chemistry. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2002. Vol. 11, № 2. P. 185–187.

128. Мінаєва В.О. Хроматографічний аналіз: Підручник для студентів вищих навчальних закладів. Черкаси: Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. 284 с.

129. Лисенко О.М., Ковальчук Т.В., Зайцев В.М. Основи газової хроматографії. Навчальний посібник. К.: Київ нац. ун-т ім. Тараса Шевченка, 2013. 166 с.

130. Jwaili M. Pharmaceutical Applications of Gas Chromatography. *Open Journal of Applied Sciences*. 2019. Vol. 9. P. 683–690.

131. Инвестиции в здоровье: организация бизнеса по производству фармацевтической продукции. Kreston GCG, 2019. 24 с. [Електронний ресурс]: Режим доступу: <https://kreston-gcg.com/investment-in-health-setting-up-a-pharmaceutical-business/>

132. Regulation of the market for medicinal products in Ukraine: problems and solutions. NewSEP, 2016. 113 p. [Електронний ресурс]: Режим доступу: http://newsep.com.ua/media/news/816/files/Regulations_pharma_eng.PDF

133. Korany M.A., Mahgoub H., Haggag R.S., Ragab M.A.A., Elmallah, O. A. Green chemistry: Analytical and chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2017. Vol. 40, № 16. P. 839–852.

134. Anastas P. T., Warner, J. C. Principles of green chemistry, green chemistry theory and practice. New York: Oxford University Press, 1998. 152 p.

135. Manley J.B., Anastas P.T., Cue B. W. Frontiers in Green Chemistry: meeting the grand challenges for sustainability in R&D and manufacturing. *Journal of Cleaner Production*. 2008. Vol. 16, № 6. P. 743–750.

136. Anastas P.T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 1999. Vol. 29, № 3. P. 167–175.

137. Nledner, W., Karsten, M., Stelner, F., Swart, R. Automating Method Development with an HPLC System Optimized for Scouting of Columns, Eluents and Other Method Parameters. United States: Pittcon Presentation, 2008.

138. Byrne F.P., Jin S., Paggiola G., Petchey T.H.M., Clark J.H., Farmer T.J., Hunt A.J., McElroy C.R., Sherwood J. Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides. *Sustainable Chemical Processes*. 2016. Vol. 4, № 1. 7.
139. Dinç Zor Ş, Aksu Dönmez Ö.A Facile HPLC-PDA Method for Simultaneous Determination of Paracetamol, Methyl Paraben, Sunset Yellow, and Carmosine in Oral Suspensions. *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*. 2018. Vol. 5, № 2. P. 763–74.
140. Levchyk V., Zui M. Gas Chromatographic determination of parabens after derivatization and dispersive microextraction. *French-Ukrainian Journal of Chemistry*. 2015. Vol. 3, № 2. P. 72–79.
141. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Q2 (R1), 2005.
142. British Pharmacopoeia. 2020. Vol. III. P. 205–206.
143. Азарова И.Н., Барам Г.И. Применение перхлората лития в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии аминсоединений. *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2014. Т. 14, № 1. С. 858—867.
144. Державна фармакопея України друге видання / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-е вид.- Доповнення 4. 2020. С. 123 – 236.
145. R. Johnson, R. Steer. Methylparaben Monograph. Handbook of Pharmaceutical Excipients, Fifth Edition, Pharmaceutical Press, 2006. P. 466-470.
146. Elder D.P., Crowley P.J. Antimicrobial Preservatives Part Three: Challenges Facing Preservative Systems. 2017. [Електронний ресурс]: Режим доступу: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/345494-Antimicrobial-Preservatives-Part-Three-Challenges-Facing-Preservative-Systems/>
147. Turnbull R. S. Benzylamine Hydrochloride (Tantum) in the management of oral inflammatory conditions. *Journal of the Canadian Dental Association*. 1995. Vol. 61, № 2. P. 127–134.

148. Benson H.A.E., McElnay J.C. High-performance liquid chromatography assay for the measurement of benzy-damine hydrochloride in topical pharmaceutical preparations. *Journal of Chromatography A*. Vol. 394, № 2. P. 394–399.

149. Shabir G. A new validated HPLC method for the simultaneous determination of 2-phenoxyethanol, methylpara-ben, ethylparaben and propylparaben in a pharmaceutical gel. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010. Vol. 72, № 4. P. 421–425.

150. Kashid R.M., Singh S.G., Singh S. Simultaneous Determination of Preservatives (Methyl Paraben and Propyl Paraben) in Sucralfate Suspension Using High Performance Liquid Chromatography. *E-Journal of Chemistry*. 2011. Vol. 8, № 1. P. 340–346.

151. Turabi Z.M., Khatatbeh O.A., Al-Abed D.N. RP-HPLC Method Development and Validation for the Simultaneous Determination of Mebendazole and the Two Preservatives Methylparaben and Propylparaben in Pharmaceutical Oral Suspension Dosage Form. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2014. Vol. 6, № 1. P. 70–74.

152. PIC/S «Recommendations on Validation Master Plan, Installation And Operational Qualification, Non-Sterile Process Validation, Cleaning Validation». PI 006-3, 2007. 29 p. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://www.gmp-compliance.org/guidelines/gmp-guideline/pic-s-validation-master-plan-iq-oq-non-sterile-process-validation-cleaning-validation-pi-006-3-sept-2007>

153. Guide to Inspections Validation of Cleaning Processes. FDA, 1993. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://www.fda.gov/validation-cleaning-processes-793>

154. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline, Good manufacturing practice guide for active pharmaceutical ingredients Q7, 2000. 49 p. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>

155. World Health Organization Supplementary Guidelines on Good Manufacturing Practices (GMP): Validation. 77 p. [Электронный ресурс]: Режим доступа:

https://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/Validation_QA_S_055_Rev2combined.pdf

156. Pluta P., Sharnez R. Avoiding Pitfalls of Cleaning Validation. *Journal of GXP Compliance*. 2010. Vol. 14, № 3. P. 54.

157. Badawi A.A., Hegazy K., Louis D. Studies on cleaning validation for a cream and ointment manufacturing line. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2016. Vol. 15, № 11. P. 2329–2335.

158. Ghosh A., Dey S. Overview of Cleaning Validation in Pharmaceutical Industry. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*. 2010. Vol. 2, № 2. P. 26–30.

159. Haber S.L., El-Ibiary S.Y. Peppermint oil for treatment of irritable bowel syndrome. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2016. Vol. 73. P. 22–26.

160. Loolaie M, Moasefi N, Rasouli H, Adibi H. Peppermint and its functionality: a review. *Archives of Clinical Microbiology*. 2017. Vol. 8, №4. P. 1–16.

161. Keifer D., Ulbricht C., Abrams T.R., Basch E., Giese N. Peppermint (*mentha x piperita*) an evidence-based systematic review by the natural standard research collaboration. *Journal of Herbal Medicine*. 2008. Vol. 7. P. 91–143.

162. Saeidnia S., Gohari A.R., Yassa N., Shafiee A. Composition of the volatile oil of *achillea conferta* dc. from Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005. Vol. 13. P. 34–36.

163. Ghori S.S., Ahmed M.I., Arifuddin M., Khateeb M.S. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of formulation containing camphor, menthol and tymol. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2015. Vol. 8. P. 271–274.

164. The International Pharmacopoeia. 8th ed. 2018.

165. Baranowska I., Wojciechowska I., Solarz N., Krutysza E. Determination of preservatives in cosmetics, cleaning agents and pharmaceuticals using fast liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 2014. Vol. 52. P. 88–94.

166. Wolf S. Stability Testing of Mint Oils through Gas Chromatography Analysis. Honors Theses. 2007. 733. [Электронный ресурс]: Режим доступа: https://scholarworks.wmich.edu/honors_theses/733

167. Eldin A.B., Ismaiel O.A., Hassan W.E., Shalaby A.A. Green analytical chemistry: opportunities for pharmaceutical quality control. *Journal of Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 71. P. 861–71.

168. Bhandari M, Raj S. Practical approach to green chemistry. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2017. Vol. 9. P. 10–26.

169. Dhir N.K., Joshi M., Kaur V. Improved analytical method for estimation of essential oil in drug ointment through rapid static chromatography headspace for quality control analysis. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2018. Vol. 11. P. 290–294.

170. Kavetsou E, Detsi A. Ionic liquids as solvents and catalysts for the green synthesis of coumarins. *Journal of Critical Reviews*. 2016. Vol. 3. P. 50–55.

171. Rode D.M., Rao N.N. A review on development and validation of stability indicating HPLC methods for analysis of acidic drugs. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2019. Vol. 11. P. 22–33.

172. Sharma S., Goyal S., Chauhan K. A review on analytical method development and validation. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2018. Vol. 10. P. 8–15.

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

1. Cherniy V.A., Gureeva S.N., Georgiyants V.A. Development and validation of alternative analytical method for determination of related substances of benzydamine hydrochloride in oral spray by HPLC. *Pharmaceutical Sciences and Technology*. 2016. Vol. 1, № 5. P. 25–33.
2. Chorny V., Kushniruk, V., Georgiyants V. Design and implementation of green chemistry approaches into pharmaceutical analysis of benzydamine dosage forms. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2019. №5(21). P. 12-17.
3. Chorny V.A., Georgiyants V.A., Gureyeva S.N., Chorna O.V. Simultaneous determination of benzydamine hydrochloride, methylparaben and peppermint oil in a spray dosage form by gas chromatography. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019. Vol. 11, № 6. P. 147–153.
4. Черный В.А., Георгиянц В.А., Черная О.В., Журавель И.А., Ибадуллаева Г.С. Валидация методики определения остаточного количества бензидамина на поверхности технологического оборудования. *Фармація Казахстана*. 2019. №4(25). С. 25–28.
5. Chorny V., Georgiyants V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben in benzydamine dosage form by GC. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2019. Vol.6, № 1. P. 28–35.
6. Chorny V., O Chorna., Georgiyants V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben in dosage form by HPLC. *Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science»*. 2020. №3(25). P. 12–18.
7. Пат. України на корисну модель № 14283. «Спосіб ідентифікації бензидаміну та його метаболіту в присутності деяких протизапальних

- нестероїдних препаратів» № и 2020 00615; заявл. 03.02.2020 р.; опубл. 25.06.2020 р., Бюл. № 12.
8. Черный В. А., Гуреева С. Н., Георгианц В. А. Разработка и валидация методики определения сопутствующих примесей бензидамина гидрохлорида методом ВЭЖХ с использованием диодно-матричного детектирования. *Аналітична хімія у фармації* : матеріали II міжнар. наук.-практ. Інтернет-конф., м. Харків, 17 берез. 2016 р. – Х. : Вид-во НФаУ, 2016. – С. 85–86.
 9. Черный В. А., Пономарева Ю. Н., Черная О. В., Георгианц В. А. Разработка методики одновременного количественного определения бензидамина гидрохлорида и метилпарабена в готовой лекарственной форме методом ВЭЖХ с применением принципов зеленой химии. *Фармація XXI століття: тенденції та перспективи* : матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України, м. Харків, 13-16 верес. 2016 р. – Х., 2016. – Т. 1. – С. 213.
 10. Черный В. А., Гончарова Ю. Н., Черная О. В., Георгианц В. А. Разработка методики одновременного количественного определения бензидамина гидрохлорида и метилпарабена в готовой лекарственной форме методом газовой хроматографии. *Управління якістю в фармації* : матеріали XI наук.-практ. конф. з міжнар. участю, м. Харків, 19 трав. 2017 р. – Х., 2017. – С. 177.
 11. Черный В. А., Георгианц В. А., Черная О. В. Методология определения вымываемых веществ из элементов первичной упаковки в готовых лекарственных средствах. *Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології* : зб. наук. пр. – Х. : Вид-во НФаУ, 2017. – Вип. 3. – С. 325–326.
 12. Чорний В. А., Георгіянц В. А. Розмір частинок оромукозних спреїв як основний параметр, що визначає якість і характеристики продукції. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. – 2017. – Вип. 28. – С. 140–147.

Додаток Б

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. II міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Аналітична хімія у фармації» (м. Харків, 17 березня 2016 р., форма участі – публікація тез).
2. VIII Національний з'їзд фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (м. Харків, 13-16 вересня 2016 р., форма участі – публікація тез).
3. XI науково-практична конференція з міжнародною участю «Управління якістю в фармації» (м. Харків, 19 травня 2017 р., форма участі – публікація тез).
4. VI науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології» (м. Харків, 13 жовтня 2017 р., форма участі – публікація тез).

Додаток С

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з наукової роботи
Запорізького державного
медичного університету

проф. В.О. Туманський

12 // 2020 р.

Акт впровадження*Пропозиція до впровадження:*

методика визначення супровідних домішок в готовому лікарському засобі бензидаміна гідрохлориді.

Установа, автори:

АТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, здобувач Чорний В.А., доктор фармацевтичних наук Георгіянци В.А.

Джерела інформації:

Cherniy V.A., Gureeva S.N., Georgiyants V.A. Development and validation of alternative analytical method for determination of related substances of benzydamine hydrochloride in oral spray by HPLC. Pharmaceutical Sciences and Technology. 2016. Vol. 1, № 5, P. 25–33.

Де впроваджено:

Запропонована методика визначення супровідних домішок в готовому лікарському засобі бензидаміна гідрохлориді. Проведена валідація аналітичної методики.

Форма впровадження:

кафедра фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету.

Результат впровадження:

науково-педагогічний процес кафедри. удосконалення знань студентів та науковців з питань валідації методики визначення супровідних домішок в готовому лікарському засобі на прикладі бензидаміна гідрохлориді.

Термін впровадження:

12. 2019-12. 2020 н.р.

Завідувач кафедри
фармацевтичної хімії
Запорізького державного
медичного університету,
доктор фарм. наук, професор

Л.І. Кучеренко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Технічний директор ПАТ «Фармак»
 _____ А.М. Гой
 « 05 » _____ 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: методика визначення супровідних домішок в готовому лікарському засобі бензидаміна гідрохлориді.

2. Установа, її адреса, виконавці: АТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, начальник лабораторії розробки відділу технологічної розробки Чорний В.А..

3. Джерела інформації:

1. Черный В. А., Гуреева С. Н., Георгиянц В. А. Разработка и валидация методики определения сопутствующих примесей бензидамина гидрохлорида методом ВЭЖХ с использованием диодно-матричного детектирования. Аналітична хімія у фармації : матеріали II міжнар. наук.-практ. Інтернет-конф., м. Харків, 17 берез. 2016 р. – X. : Вид-во НФаУ, 2016. – С. 85–86.

2. Cherniy V.A., Gureeva S.N., Georgiyants V.A. Development and validation of alternative analytical method for determination of related substances of benzydamine hydrochloride in oral spray by HPLC. Pharmaceutical Sciences and Technology. 2016. Vol. 1, № 5. P. 25–33.

4. Інформація про об'єкт впровадження: В лабораторії фармацевтичної розробки Чорним В.А. були виконані роботи з розробки та валідації аналітичної методики визначення супровідних домішок в активному готовому лікарському засобі на основі бензидаміна гідрохлориду. Результати досліджень відображені в реєстраційних матеріалах, а методика використовується для вихідного контролю лікарського засобу.

5. Впроваджено: в процес вихідного контролю якості лікарського засобу (МКЯ UA/15007/01/01 від 28.03.2016).

Начальник відділу технологічної розробки АТ «Фармак»

Керівник департаменту досліджень та розробки АТ «Фармак»



С.М. Гуреева

Р.О. Смішко

«Затверджую»



Проректор з навчальної роботи

Вінницького національного медичного

університету ім. М.І. Пирогова

проф. Ю.Й. Гумінський

» 01 _____ 2021 р.

Акт впровадження**Пропозиція до впровадження:**

методика кількісного визначення бензидаміна гідрохлориду та метилпарабену в готовому лікарському засобі.

Установа, автори:

АТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, здобувач Чорний В.А., доктор фармацевтичних наук Георгіянець В. А..

Джерела інформації:

Черный В. А., Пономарева Ю. Н., Черная О. В., Георгіянець В. А. Разработка методики одновременного количественного определения бензидамина гидрохлорида и метилпарабена в готовой лекарственной форме методом ВЭЖХ с применением принципов зеленой химии. Фармація XXI століття: тенденції та перспективи : матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України, м. Харків, 13-16 верес. 2016 р. – X., 2016. – Т. 1. – С. 213.

Запропонована методика кількісного визначення бензидаміна гідрохлориду та метилпарабену в готовому лікарському засобі. Проведена валідація аналітичної методики.

Де впроваджено:

кафедра фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова.

Форма впровадження:

науково-педагогічний процес кафедри.

Результат впровадження:

удосконалення знань студентів та науковців з питань розробки та валідації методики кількісного визначення бензидаміна гідрохлориду та метилпарабену в готовому лікарському засобі.

Термін впровадження:

2020-2021 н.р.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармацевтичної хімії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, протокол №6 від «27» січня 2021 р.

Відповідальний за впровадження,
завідувач кафедри фармацевтичної хімії
Вінницького національного медичного
університету ім. М.І. Пирогова,
кандидат хімічних наук, доцент

Т.І. ЮЩЕНКО

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Технічний директор ПАТ «Фармак»
 _____ А.М. Гой
 « 05 » _____ 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва пропозиції для впровадження: методика кількісного визначення бензидаміна гідрохлориду та метилпарабену в готовому лікарському засобі.

2. Установа, її адреса, виконавці: АТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, начальник лабораторії розробки відділу технологічної розробки Чорний В.А..

3. Джерела інформації:

1. Черный В. А., Пономарева Ю. Н., Черная О. В., Георгианц В. А. Разработка методики одновременного количественного определения бензидамина гидрохлорида и метилпарабена в готовой лекарственной форме методом ВЭЖХ с применением принципов зеленой химии. Фармація ХХІ століття: тенденції та перспективи : матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України, м. Харків, 13-16 верес. 2016 р. – Х., 2016. – Т. 1. – С. 213.

2. Chornyi V., O Chorna., Georgiyants V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben in dosage form by HPLC. Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science». 2020. №3(25). P. 12–18.

4. Інформація про об'єкт впровадження: В лабораторії фармацевтичної розробки Чорним В.А. були виконані роботи з розробки та валідації аналітичної методики кількісного визначення бензидаміна гідрохлориду та метилпарабену в готовому лікарському засобі. Результати досліджень відображені в реєстраційних матеріалах, а методика використовується для вихідного контролю лікарського засобу.

5. Впроваджено: в процес вихідного контролю якості лікарського засобу (МКЯ UA/15007/01/01 від 28.03.2016).

Начальник відділу технологічної розробки АТ «Фармак»

Керівник департаменту досліджень та розробки АТ «Фармак»

С.М. Гурєєва

Р.О. Смішко

«Затверджую»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету

імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

проф. І. М. Кліщ

«12» _____ 11 2020 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. *Пропозиція до впровадження:* методика кількісного визначення бензидаміна гідрохлориду та метилпарабену в готовому лікарському засобі.
2. *Установа, автори:* АТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, м. Київ, Україна, здобувач Чорний В.А., доктор фармацевтичних наук Георгіянець В. А.
3. *Джерела інформації:* Chornyi V., O Chorna., Georgiyants V. Development and validation of the method for simultaneous determination of benzydamine hydrochloride and methylparaben in dosage form by HPLC. Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science». 2020. №3(25). P. 12–18.
Запропонована методика кількісного визначення бензидаміна гідрохлориду та метилпарабену в готовому лікарському засобі. Проведена валідація аналітичної методики.
4. *Де впроваджено:* кафедра фармацевтичної хімії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.
5. *Форма впровадження:* науково-педагогічний процес кафедри.
6. *Результат впровадження:* удосконалення знань студентів та науковців з питань розробки та валідації методики кількісного визначення бензидаміна гідрохлориду та метилпарабену в готовому лікарському засобі.
7. *Термін впровадження:* 2020-2021 н.р.

Завідувач кафедри фармацевтичної хімії
Тернопільського національного медичного
університету імені І.Я. Горбачевського
МОЗ України,
д. фарм. наук, професор

Л. С. ЛОГОЙДА