

УДК 543.544.5.
068.7:615.212.3:
543.612

САЛІЙ О.О.¹, КУЗЬМІНА Г.І.¹, ФУКЛЕВА Л.А.², МАНАЦІЮК В.В.¹

¹Київський національний університет технологій та дизайну

²Запорізький державний медичний університет

ДОСЛІДЖЕННЯ ВАЛІДАЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАЦЕТАМОЛУ ТА ЙОГО ОСНОВНОЇ ДОМІШКИ В РЕКТАЛЬНИХ СУПОЗИТОРІЯХ

Мета. Дослідження валідаційних характеристик методики кількісного визначення парацетамолу та його основної домішки 4-амінофенолу в ректальних супозиторіях методами спектрофотометрії (СФ) та вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Методика. Спектрофотометричні вимірювання проводили на спектрофотометрі UV VIS Lambda 35 («Perkin Elmer», USA) в кюветах $l=1$ см. Використали рідинний хроматограф Waters 2695 з УФ-детектором Waters 2489, а також хроматографічну колонку Nucleosil C18 розміром $250 \times 4,6$ мм, заповнену октадецилсилільним сорбентом з розміром часток 10 мкм. При вивченні валідаційних характеристик застосовували реактиви: вода очищена, яку отримали з установки Milli Q, виробництва Millipore Corporation (Німеччина), натрію гідроксид Sigma-Aldrich, кат. № 06203, натрію 1-бутансульфонат Sigma-Aldrich, кат. № 19022-10G-F; етанол 96%, метанол Sigma-Aldrich (чистота 99.9%), мурашина кислота Sigma-Aldrich, кат. № 33015.

Результати. Підтверджені валідаційні характеристики як специфічність, правильність, прецизійність. Встановлено повну прогнозовану невизначеність аналітичної методики кількісного вмісту та ліміти кількісного визначення основної домішки парацетамолу, при якому виконується співвідношення сигнал/шум - 10% від вихідної концентрації розчину порівняння (0,5 мкг/мл). Підтверджена лінійність для кількісного визначення вмісту парацетамолу в діапазоні від 80 до 120 % від номінального значення. Проведено статистичну обробку експериментальних даних, коефіцієнт кореляції лінійної залежності (r) між введеним і знайденими значеннями для кількісного вмісту парацетамолу, який визначали, становить $>0,990$, що свідчить про коректність методики.

Наукова новизна. Розроблено і валідовано методику кількісного вмісту парацетамолу та його основної домішки у супозиторіях. Методика кількісного вмісту парацетамолу в супозиторіях є значно простішою при виконанні рутинного контролю серії лікарського засобу та рентабельною порівняно з методом ВЕРХ.

Практична значимість. Отримані результати експерименту свідчать, що за дослідженими валідаційними характеристиками методика коректна та може бути відтворена в інших лабораторіях.

Ключові слова. Парацетамол, 4-амінофенол, ректальні супозиторії, валідаційні характеристики, кількісне визначення, домішки.

Вступ. Відомо, що у педіатричній практиці парацетамол визнано золотим стандартом лікування зниження температури тіла у дітей [1]. Вибір лікарської форми, як супозиторії, особливо обґрунтовано у випадках, коли у дитини підвищення температури тіла супроводжується ознаками інтоксикації (відмова від їжі, пиття, надмірна сонливість, блювання) та/або пероральна доставка лікарського засобу неможлива [2]. Тому актуальним напрямком є оцінка якості лікарських засобів валідованими аналітичними методиками, які дозволяють отримувати коректні результати щодо вмісту діючої речовини у супозиторіях для педіатричного застосування, а також вмісту нормованих супутніх домішок.

Для кількісної оцінки вмісту парацетамолу в субстанції (син. Acetaminophen (APAP), N-(4-Гідроксифеніл)acetamide (IUPACName) згідно монографії Європейської фармакопеї та Державної Фармакопеї України використовується метод титрування [3, 4], в твердих

формах (таблетки, капсули) – метод абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області [5]. Описані метод міцелярної електрокінетичної хроматографії [6], метод електрохімічного окислення і визначення парацетамолу на склоподібному вуглецевому електроді (GCE) з використанням різноманітних вольтамперометричних методик [7]. Літературний пошук методів визначення вмісту парацетамолу у супозиторіях показав, що такі дослідження дуже рідкі. Так, швидкий і ефективний метод мікроемульсійної рідинної хроматографії на масляній воді (MELC) був оптимізований і підтверджений для аналізу парацетамолу у складі супозиторіїв [8]. Фармакопейним методом є високоефективна рідинна хроматографія [9].

Також для субстанції парацетамолу фармацевтичного застосування згідно монографії Європейської фармакопеї визначено 14 домішок, але якість готових лікарських форм доводиться аналітичним визначенням основних токсичних домішок як 4-амінофенол (домішка К) та хлор ацетанілід (домішка J). Оскільки для домішок встановлено більш жорсткі критерії вмісту, то для їх визначення застосовують високочутливі методи, як метод поверхнево-розширеного рамановського розсіювання (SERS) [10], флуориметричний метод для кількісної оцінки малої кількості домішок (50 ppm) [11], метод міцелярної електрокінетичної хроматографії [6], високоефективної рідинної хроматографії з амперометричним детектуванням [12].

При розробці супозиторіїв з парацетамолом 80 мг нами як діючу речовину досліджували субстанцію парацетамол виробника Atabay, Туреччина. Компанія Atabay є виробником парацетамолу з 1965 року, та згідно даних DMF, синтезує речовину без використання галогенових ароматичних сполук, тому відсутнє утворення токсичних галогенових ароматичних речовин, таких як парахлорацетанілід в субстанції парацетамол [13]. 4-амінофенол (домішка К) є основним продуктом розпаду при гідролізі парацетамолу. Отже, в специфікацію для контролю якості дитячих супозиторіїв введено нормування та обов'язкове визначення ідентифікованої домішки 4-амінофенол.

Постановка завдання. Метою даної роботи було дослідження валідаційних характеристик методики кількісного визначення парацетамолу та його основної домішки в ректальних супозиторіях методами спектрофотометрії (СФ) та високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) відповідно.

Матеріали та методи дослідження. Наважки субстанції парацетамолу, стандартних зразків і реактивів зважували на аналітичних вагах «Mettler Toledo XP105DR» (Швейцарія). Величину рН вимірювали рН-метром «Mettler Toledo Seven Multi S40» (Швейцарія). У роботі застосували посуд класу А фірми «Simax» (Чехія).

Спектрофотометричні вимірювання проводили на спектрофотометрі UV VIS Lambda 35 («Perkin Elmer», USA) в кюветах $l=1$ см. Хроматографічні роботи виконали з застосуванням ВЕРХ системи Separations Module Waters 2695 з УФ-детектором Waters 2489.

В якості стандартного зразку парацетамолу (СЗ) використовували стандарт EP CRS, кат. № P0300000, в якості стандартного зразку Paracetamol impurity K (СЗ) використовували 4-амінофенол виробництва Sigma-Aldrich (Німеччина), кат. № A71328 із заявленим вмістом основної речовини 99,5% (GC). В якості плацебо супозиторіїв з парацетамолом застосовували твердий жир (суміш тригліцеридів C12-C18), марки Suppocire NAS 50 («Gattefosse», Франція).

При вивченні валідаційних характеристик застосовували реактиви: вода очищена, яку отримали з установки Milli Q, виробництва Millipore Corporation (Німеччина), натрію гідроксид Sigma-Aldrich, кат. № 06203, натрію 1-бутансульфонат Sigma-Aldrich, кат. № 19022-10G-F; етанол 96%, метанол Sigma-Aldrich (чистота 99.9%), мурашина кислота Sigma-Aldrich, кат. № 33015.

Контрольовані валідаційні характеристики обрані відповідно до вимог ДФУ та рекомендацій ІСН [14, 15], а саме для методики кількісного визначення парацетамолу відвалідовано характеристики: максимально допустима невизначеність результату аналізу Δ_{As} , невизначеність пробопідготовки Δ_{SP} , специфічність, лінійність, діапазон застосування, правильність; методику визначення вмісту домішки граничним випробуванням відвалідовано за характеристиками максимально допустима невизначеність результату аналізу Δ_{As} , специфічність, межа кількісного визначення. Розрахунки та статистичну обробку проводили згідно вимог ДФУ [16].

Досліджували наступні методики: Методика кількісного визначення парацетамолу у супозиторіях 80 мг/доза методом спектрофотометрії.

Приготування розчину випробування. До 1,250 г супозиторіїв додають 25,0 мл води очищеної та поміщають на водяну баню при температурі $(37 \pm 5)^\circ \text{C}$ до розплавлення основи. Витримують на водяній бані на протязі 5 хвилин при перемішуванні. Охолоджують на льодовій бані. Видаляють застиглий твердий жир та фільтрують водний шар крізь паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 5 мл фільтрату. До 1,0 мл отриманого розчину додають 25 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду і доводять об'єм розчину водою очищеною до 250,0 мл. До 10,0 мл отриманого розчину додають 2,5 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду та доводять об'єм розчину водою очищеною до 25,0 мл.

Приготування розчину порівняння. 0,040 г СЗ парацетамолу розчиняють у воді очищеної і доводять тим самим розчинником до 25,0 мл. До 1,0 мл отриманого розчину додають 10 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду і доводять об'єм розчину водою очищеною до 100,0 мл. До 1,0 мл отриманого розчину додають 2,5 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду та доводять об'єм розчину водою очищеною до 25,0 мл.

Компенсаційний розчин. 0,01 М розчину натрію гідроксиду. Вимірюють оптичну густину випробувального розчину та розчину порівняння відносно компенсаційного розчину на спектрофотометрі при $\lambda=257$ нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Розраховують вміст парацетамолу в супозиторіях (m), в мг/г, за формулою згідно ДФУ 2.2.25. Вміст парацетамолу ($\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2$) в одному супозиторії має бути від 76,0 до 84,0 мг в перерахунку на середню масу одного супозиторію.

Методика визначення 4-амінофенолу у супозиторіях 80 мг/доза методом вискоєфективної рідинної хроматографії.

Приготування розчину випробування. До 4,70 г супозиторіїв додають 20 мл етанолу Р і 30мл води очищеної, нагрівають на водяній бані при температурі $(37 \pm 5)^\circ \text{C}$ при перемішуванні до розплавлення основи. Витримують на водяній бані при температурі $(37 \pm 5)^\circ \text{C}$ на протязі 10 хвилин при перемішуванні скляною паличкою. Охолоджують на льодовій бані. Видаляють застиглий твердий жир та фільтрують водний шар крізь паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 3мл фільтрату. 5,0мл отриманого розчину доводять рухомою фазою в мірній колбі на 20мл до мітки.

Приготування розчину порівняння. 5 мг 4-амінофенолу розчиняють в метанолі та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 50,0мл. 1,0мл отриманого розчину доводять рухомою фазою в мірній колбі на 20мл до мітки.

Хроматографічні умови: Хроматографічна колонка Nucleosil C18 розміром 250×4,6mm, заповнена октадецилсилільним сорбентом з розміром часток 10 мкм; Рухома фаза – 0,01М розчин натрію 1-бутансульфонату у суміші мурашина кислота- метанол-вода очищена Р (0,4:15:85, об/об/об); Швидкість потоку рухомої фази – 1,5мл/хв.; Температура термостату колонки – 25°C; Довжина хвилі детектування – 272nm; Об'єм інжекції – 20 мкл.

Для оцінювання вмісту домішки, площу піку, одержаного на хроматограмі випробовуваного розчину, порівнюють із площею піку, що одержана на хроматограмі розчину порівняння. Вміст 4-амінофенолу для супозиторіїв має бути не більше 0,1 %.

Результати дослідження. Нами розроблена аналітична методика спектрофотометричного визначення кількісного вмісту парацетамолу в супозиторіях, яка є значно простішою при виконанні рутинного контролю серії лікарського засобу та рентабельною порівняно з методом ВЕРХ. Оскільки парацетамол у лужних розчинах дуже добре розчинний і утворений розчин характеризується максимумом світлопоглинання при $\lambda = 257$ нм, тому основний вплив на результат кількісного визначення діючої речовини має пробопідготовка, а саме попередня процедура виділення парацетамолу та його очистка від допоміжних речовин, що складають супозиторну основу.

Для валідаційних процедур використовували розрахунок прогнозованої повної невизначеності аналізу та її порівняння з максимально допустимою повною відносною невизначеністю. Максимально допустима невизначеність результату аналізу Δ_{As} при допусках вмісту $B = 5\%$, обчислена відповідно до встановлених вимог ДФУ становить $\Delta_{As} \leq 1.6\%$. Результати прогнозу невизначеності пробопідготовки наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Результати обчислення невизначеності пробопідготовки для визначення кількісного вмісту парацетамолу у супозиторіях

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули		Значення невизначеності
	РСЗ	РДЗ	
1.1 Взяття наважки парацетамолу (для РСЗ)	40		0,2мг/40 мг x100% = 0,50 %
1.2. Взяття наважки супозиторіїв (для РДЗ)		1250	0,2мг/1250 мг x100% = 0,016 %
2. Доведення до об'єму у мірній колбі 25,0 мл	25	25	0,23 %
3. Відбір аліквоти 1,0 мл	1	1	0,6 %
4. Доведення до об'єму у мірній колбі, мл	100	250	0,12 % / 0,08 %
5. Відбір аліквоти 10,0 мл	10	10	0,5 %
6. Доведення до об'єму у мірній колбі 25,0 мл	25	25	0,23 %

Обчислена невизначеність пробопідготовки становить:

$$\Delta_{sp} = \sqrt{0,50^2 + 0,23^2 + 0,6^2 + 0,12^2 + 0,5^2 + 0,23^2 + 0,016^2 + 0,23^2 + 0,6^2 + 0,08^2 + 0,5^2 + 0,23^2} = 1,305\%$$

$$1,305 \% > 0,51 \%$$

Розрахунок прогнозованої невизначеності кінцевої аналітичної операції становить:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{2} \cdot \frac{0,52 \cdot 1,645}{\sqrt{3}} = 0,692$$

Розрахунок повної прогнозованої невизначеності кінцевої аналітичної операції становить:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} = \sqrt{1,305^2 + 1,60^2} = 2,07 > \max \Delta_{As} = 1,6\%$$

Отже, повна прогнозована невизначеність аналітичної методики визначення парацетамолу не перевищує гранично допустимої невизначеності результатів, вимоги до невизначеності методик витримуються.

Специфічність методики кількісного визначення парацетамолу перевіряли, порівнюючи спектри поглинання розчинів порівняння та розчинів плацебо. Вимірювання проводили тричі зі зніманням кювет, при $\lambda=257\pm 2$ нм, в кюветах з товщиною шару 10 мм. Результати досліджень представлено в табл. 2 та (Рис.1.)

Таблиця 2

Визначення впливу фонового поглинання при перевірці специфічності аналітичної методики

A_{blank}	A_{st}	A_{blank} / A_{st}	Вимоги
0,0002	0,4689		
0,0003	0,4699		
0,0002	0,4697		
Середнє: 0,0002	Середнє: 0,4695	0,04	$\leq 0,96$

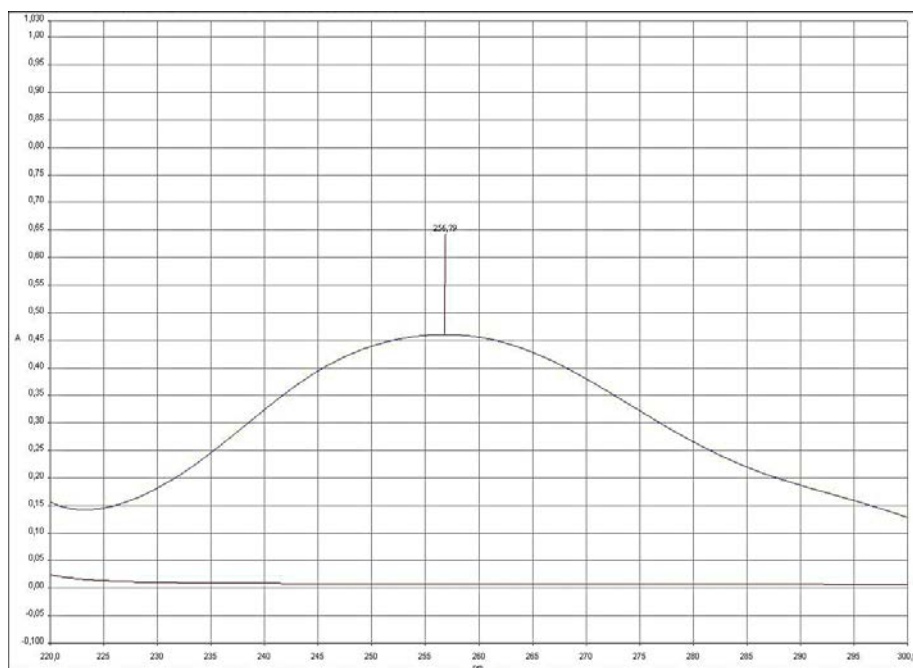


Рис. 1. Спектри поглинання розчину плацебо та розчину порівняння при $\lambda=257\pm 2$ нм, отримані в умовах перевірки специфічності методики

Як видно з (Рис.1.) на спектрі розчину плацебо відсутні максимуми поглинання, характерні для парацетамолу. Спектр розчину порівняння має максимум поглинання при

$\lambda=257\pm 2\text{ нм}$ і співпадає зі спектром стандартного розчину. Отже, вимоги щодо специфічності методики витримуються.

Лінійну залежність досліджували в межах діапазону застосування аналітичної методики, для чого готували модельних 9 розчинів з вмістом парацетамолу від 80% до 120% та розчину порівняння (RS). Вимірювання проводили згідно умов методики, наведеної вище. В табл. 3 представлені результати розрахунку концентрацій парацетамолу, значень оптичних густин (A_i), а також значень фактично отриманих концентрацій парацетамолу.

Таблиця 3

Результати дослідження лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації парацетамолу у модельних розчинах

№	Концентрація парацетамолу, мг/мл «введено»	Назва розчину % від номінальної концентрації розчину	Оптична густина A_i	Концентрація парацетамолу, мг/мл «знайдено»
1		RS	0,4689	0,0064
2		RS	0,4699	0,0064
3		RS	0,4697	0,0064
4	0,0051	80%	0,3705	0,0051
5		80%	0,3700	0,0051
6		80%	0,3712	0,0051
7	0,0054	85%	0,3951	0,0054
8		85%	0,3948	0,0054
9		85%	0,3946	0,0054
10	0,0058	90%	0,4121	0,0058
11		90%	0,4120	0,0058
12		90%	0,4121	0,0058
13	0,0061	95%	0,4396	0,0061
14		95%	0,4395	0,0061
15		95%	0,4398	0,0061
16	0,0064	100%	0,4571	0,0064
17		100%	0,4572	0,0064
18		100%	0,4573	0,0064
19	0,0067	105%	0,4859	0,0067
20		105%	0,4864	0,0067
21		105%	0,4862	0,0067
22	0,007	110%	0,5090	0,0070
23		110%	0,5091	0,0070
24		110%	0,5093	0,0070
25	0,0074	115%	0,5342	0,0074
26		115%	0,5345	0,0074
27		115%	0,5341	0,0074
28	0,0077	120%	0,5535	0,0077
29		120%	0,5544	0,0077
30		120%	0,5551	0,0077

На Рис. 2 представлено графік залежності наведених значень при дослідженні лінійної залежності ($r_f = a + b \times C$).

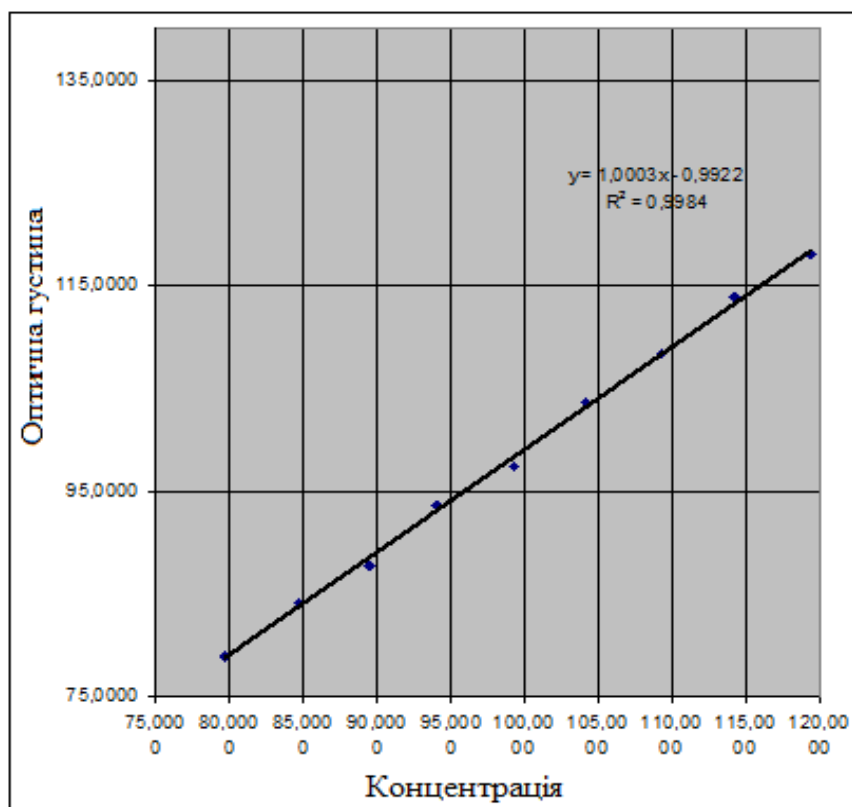


Рис.2. Графік лінійної залежності $y = a + b \times C$

Виходячи з отриманих результатів можна зробити висновок, що методика в діапазоні концентрацій від 80 до 120 % від номінального значення для парацетамолу є лінійною, отже, вимоги до лінійності витримуються. Виконання критеріїв правильності та збіжності для визначення парацетамолу в готовій лікарській формі методом ВЕРХ наведена в табл. 4.

Таблиця 4

Результати аналізу модельних розчинів при дослідженні критерію «Правильність»

Модельний розчин	Концентрація парацетамолу, мг/мл	Введено у % до концентрації р-ну порівняння ($C_{i, \text{факт.}}$)	Оптична густина	Найдено у % до концентрації р-ну порівняння ($S_{i, \text{факт.}}$)	Найдено у % до введенного $X_i = 100 \cdot (S_{i, \text{факт.}} / C_{i, \text{факт.}}), \%$
80 %	0,0051	79,70	0,3706	78,94	99,04
85 %	0,0054	84,67	0,3948	84,09	99,32
90 %	0,0058	89,53	0,4121	87,77	98,04
95 %	0,0061	94,09	0,4396	93,63	99,51
100 %	0,0064	99,26	0,4572	97,38	98,11
105 %	0,0067	104,22	0,4862	103,56	99,37
110 %	0,007	109,28	0,5091	108,43	99,23
115 %	0,0074	114,24	0,5343	113,80	99,61
120 %	0,0077	119,31	0,5543	118,06	98,96
Середнє, $\bar{X}, \%$					99,02

Методика визначення парацетамолу в супозиторіях методом СФ задовольняє критеріям прийнятності валідаційного показника «Правильність». В табл. 5 наведені результати статистичної обробки отриманих даних.

Виходячи з отриманих результатів можна зробити висновок, що методика коректна, вклад вільного члену незначний у порівнянні з максимально допустимою невизначеністю аналізу, валідаційні характеристики (специфічність, правильність, лінійність) обраної методики кількісного визначення відповідають критеріям прийнятності, встановленим і розрахованим для них.

Таблиця 5

Результати статистичної обробки перевірки методики кількісного визначення

Параметр	Розрахунок	Отримані значення
Вільний член	a	-0,9922
Кут нахилу	b	1,0003
Коефіцієнт кореляції	r	0,9984
Стандартне відхилення величини S_i :	$s_y = \sqrt{\frac{\sum S_i^2 - n \cdot \bar{S}}{n-1}}$	16,9674
Остаточне стандартне відхилення	$s_0 = \sqrt{\frac{\sum (S_i - (a + b \cdot C_i))^2}{n-2}}$	0,5797
Стандартне відхилення кута нахилу прямої	$s_b = \sqrt{\frac{s_y^2}{\sum (C_i - \bar{C})^2}}$	0,0151
Стандартне відхилення вільного члену	$s_a = s_0 \cdot \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{C}^2}{\sum (C_i - \bar{C})^2}}$	1,5158
Критерій максимально допустимого значення залишкового стандартного відхилення	$s_0 \leq \max \Delta_{As} \cdot b / t(95\%, n-2) = 0,8442$	Виконується
Критерій статистичної незначущості відмінності a від нуля	$ a \leq t(95\%, n-2) \cdot s_a = 1,8946 \cdot 1,3837 = 2,8719$	Виконується
Критерій практичної незначущості відмінності a від нуля	$ a \leq \frac{0,32 \cdot \Delta_{As}}{1 - C_{\min} / 100} = 2,56$	Виконується
Критичне мінімально допустиме значення коефіцієнта кореляції	$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{\Delta_{As}}{s_y \cdot t(95\%; n-2)} \right)^2} = 0,9994$	Виконується

Розроблена методика контролю 4-амінофенолу у супозиторіях 80 мг/доза методом ВЕРХ, що забезпечує розділення парацетамолу та його основного продукту розпаду. Для валідації розраховали максимально допустиму невизначеність аналізу, що становить $\max \Delta_{As} \leq 16.0\%$.

Загальна невизначеність пробопідготовки має бути не більше 5,12%. Розрахунки прогнозу невизначеності пробопідготовки наведені в (табл. 6).

Розрахунки проводили, як наведено вище. Розрахунок повної прогнозованої невизначеності кінцевої аналітичної операції склав $\Delta_{As} = 15,89\% \leq 16\%$. Отже, вимоги до невизначеності методики витримуються.

Придатність хроматографічної системи. Перед початком експериментальних валідаційних робіт проаналізували розчин для перевірки придатності хроматографічної системи (Рис. 3). У табл. 7 наведені результати щодо придатності хроматографічної системи.

Таблиця 6

Розрахунки прогнозу невизначеності пробо підготовки

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Значення невизначеності
Випробувальний розчин		
Взяття наважки супозиторіїв	4,7	0,0044 %
Відбір аліквоти 5,0 мл	5	0,6%
Доведення до об'єму у мірній колбі 20,0 мл	20	0,23%
Розчин стандартного зразку		
Взяття наважки РСЗ 4-амінофенолу	5	4%
Доведення до об'єму у мірній колбі 50,0 мл	50	0,17%
Відбір аліквоти 1,0 мл	1	0,6%
Доведення до об'єму у мірній колбі 20,0 мл	20	0,23%

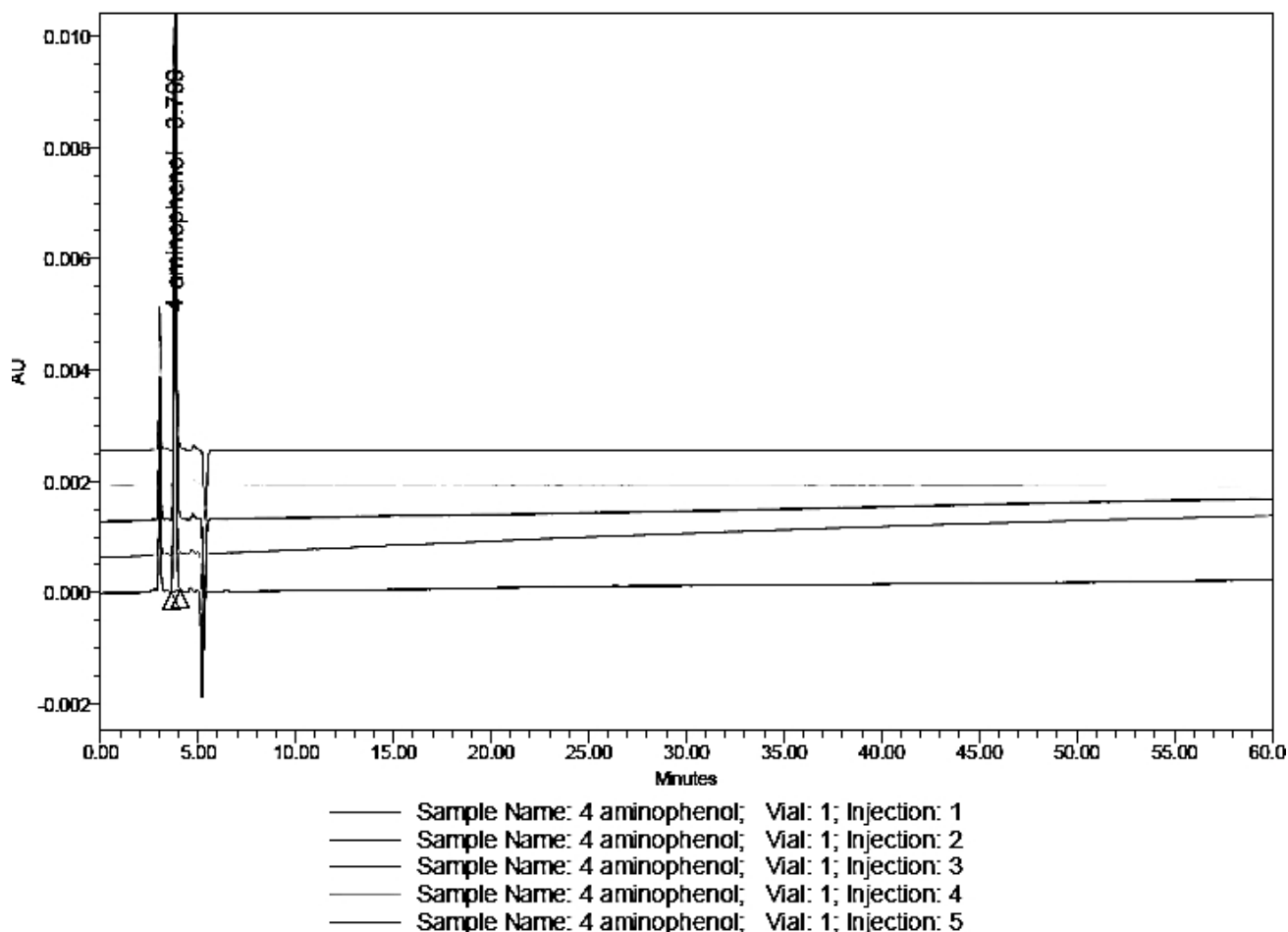


Рис. 3. Хроматограми розчину для перевірки придатності хроматографічної системи

Таблиця 7

Перевірка придатності хроматографічної системи

№ інжекції	4- амінофенол	
	Час витримки	Площа піку
1	3,799	76380
2	3,809	76918
3	3,822	76879
4	3,834	76726
5	3,834	76654
Середнє значення	3,820	76613
RSD, %	0,400	0,269
Висновок ПХС	виконується	

При хроматографуванні розчину порівняння було показано, що відносне стандартне відхилення відносин площ піків 4-амінофенола становить 0,269%, що менше критичного значення (2,0%). Отже, хроматографічна система є придатною для виконання методики.

Специфічність. Визначено, що методика дозволяє точно і правильно встановити зміст ідентифікованої домішки 4-амінофенола в присутності всіх інших компонентів. Показано відсутність вкладу плацебо, тобто в плацебо не міститься речовина, час утримання якого відповідає часу утримування 4-амінофенола розчину порівняння. Час утримування 4-амінофенола на хроматограмі модельного розчину відповідає часу утримування 4-амінофенола розчину порівняння, то можна стверджувати, що методика є специфічною. Отримані хроматограми наведені на Рис. 4.

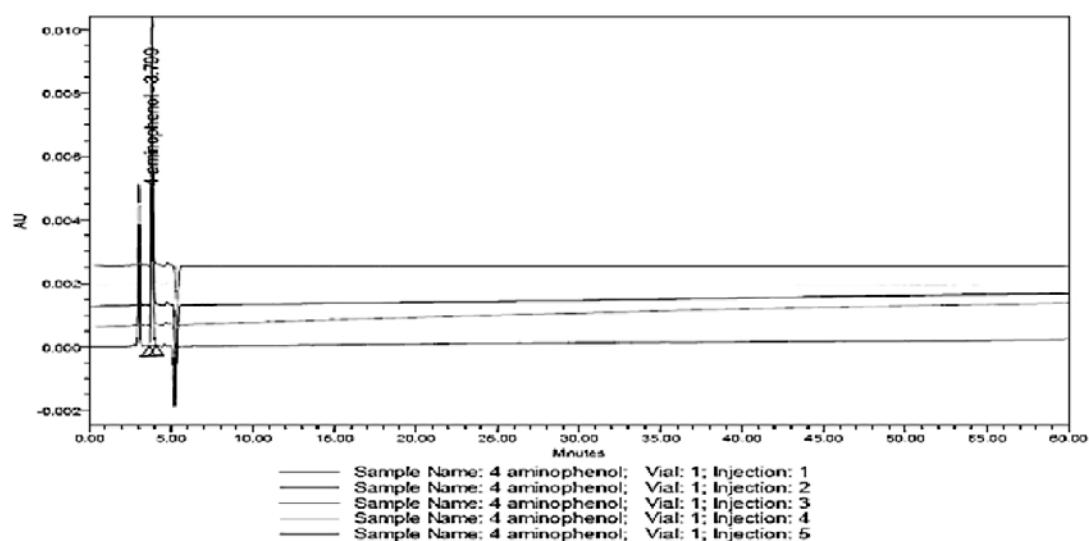
Межі виявлення. При проведенні експерименту встановлена - мінімальна концентрація речовини, при якій має виконуватися співвідношення: сигнал/шум > 2. Для проведення експерименту був приготований ряд послідовних розведень розчину порівняння згідно з протоколом валідації.

Межа виявлення 4-амінофенола, при якому виконується співвідношення сигнал/шум складає 10% від вихідної концентрації розчину порівняння (0,5 мкг/мл).

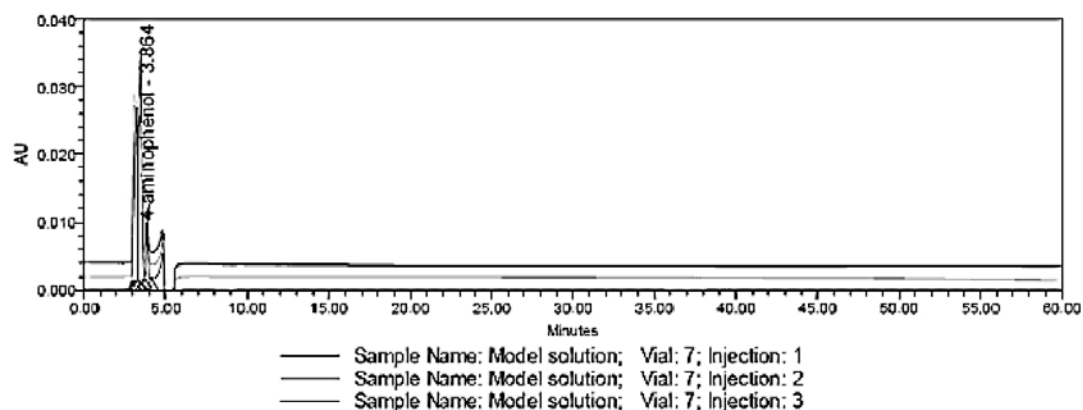
Таблиця 8

Межі виявлення 4-амінофенолу

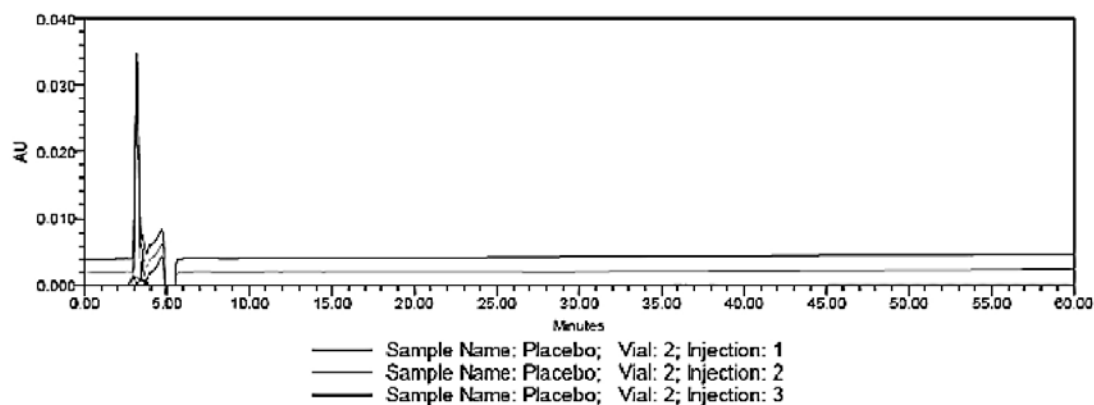
Концентрація модельних розчинів, % від розчину порівняння	Середнє значення площі піку 4-амінофенола	Середнє значення відношення сигнал/шум	Критерії прийнятності	Висновок
2	-	-	>2	Не виконується
5	-	-	>2	Не виконується
10	9068	26,2	>2	Виконується
20	12369	34,6	>2	Виконується



Хроматограма розчину порівняння

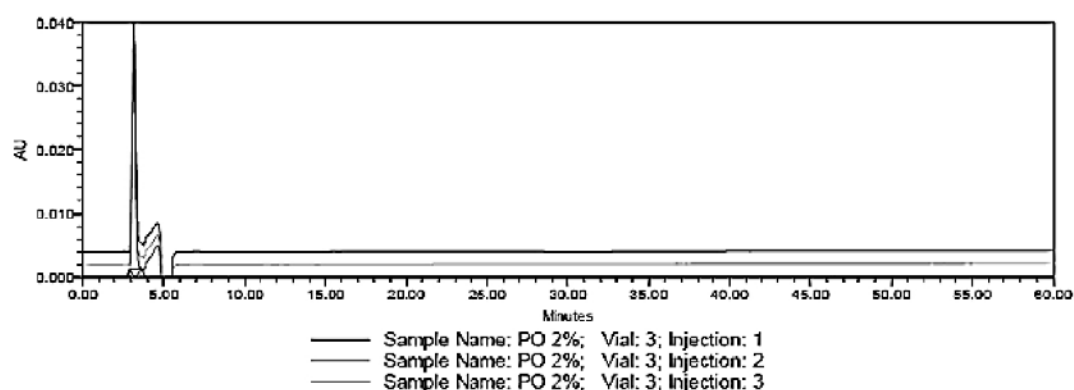


Хроматограма модельного розчину перевірки специфічності методики

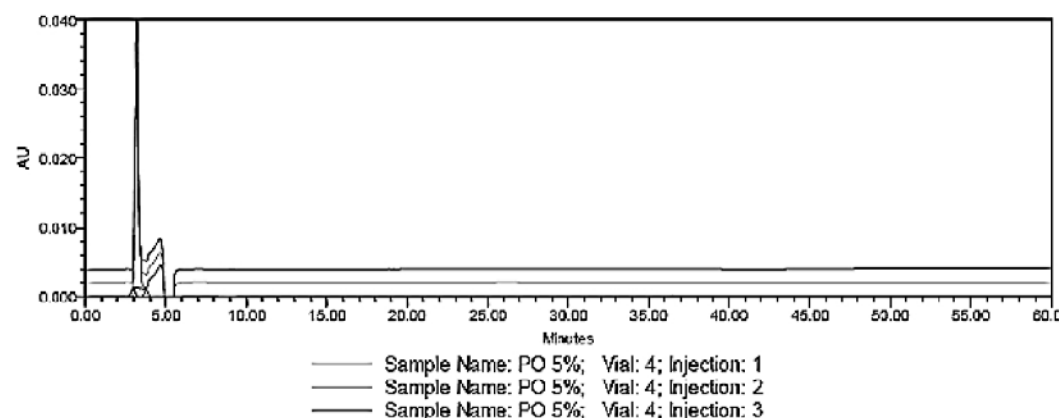


Хроматограма розчину плацебо перевірки специфічності методики

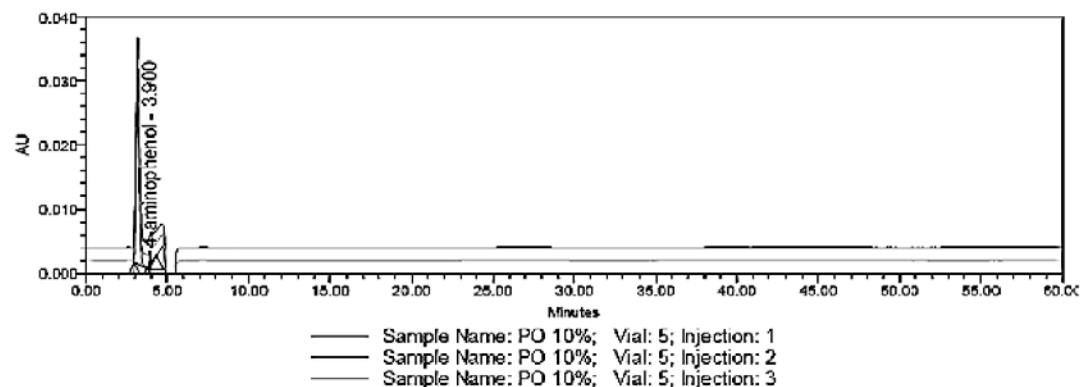
Рис.4. Хроматограми, що підтверджують специфічність методики



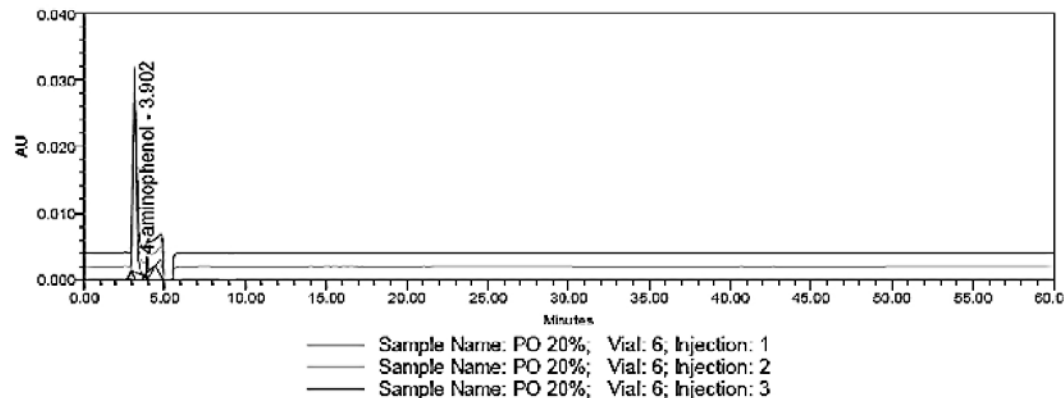
Хроматограма 2% модельного розчину межі виявлення 4-амінофенола



Хроматограма 5% модельного розчину межі виявлення 4-амінофенола



Хроматограма 10% модельного розчину межі виявлення 4-амінофенола



Хроматограма 20% модельного розчину межі виявлення 4-амінофенола

Рис. 5. Хроматограми модельних розчинів межі виявлення 4-амінофенолу

Експериментально встановлено, що межа виявлення 4-амінофенола становить 0,5мкг/мл. Отже, за дослідженими валідаційними характеристиками методика коректна та може бути відтворена в інших лабораторіях.

Висновок. Проведено дослідження валідаційних характеристик методики кількісного визначення парацетамолу та його основної домішки 4-амінофенола в ректальних супозиторіях.

Визначені специфічність, лінійність, правильність, максимально допустима невизначеність результату аналізу ΔA_s , невизначеність пробопідготовки ΔSP , діапазон застосування, правильність методик кількісного вмісту парацетамолу та домішки 4-амінофенола.

Підтверджена лінійність для кількісного визначення вмісту парацетамолу в діапазоні від 80 до 120 % від номінального значення. Доведено, що лінійність, точність і правильність визначення парацетамолу в зазначеному діапазоні прийнятна, методика кількісного визначення систематичною похибкою не обтяжена. Проведено статистичну обробку експериментальних даних, коефіцієнт кореляції лінійної залежності (r) між введеними і знайденими значеннями для кількісного вмісту парацетамолу, становить $>0,990$, що свідчить про коректність методики.

Встановлено межу виявлення 4-амінофенола, при якому виконується співвідношення сигнал/шум - 10% від вихідної концентрації розчину порівняння (0,5 мкг/мл). Всі контрольовані валідаційні характеристики відповідають критеріям прийнятності і можуть бути використані для контролю супозиторіїв з парацетамолом для застосування у педіатрії.

Література

1. Kogan Michael D. Over-the-counter Medication Use Among US Preschool-age Children / Michael D. Kogan, Gregory Pappas, Stella M. Yu, et al. // JAMA. 1994,272:1025-1030. DOI:https://doi.org /10.1001/jama.1994.03520130063034
2. Kalmár É. Validated HPLC Determination of 4-Dimethylaminoantipyrine in Different Suppository Bases / É Kalmár, B. Kormányos, G. Szakonyi, G. Dombi // Indian J PharmSci., 2014. - № 76(1). - P. 31–37. PMID: 24799736; PMCID: PMC4007253
3. European Pharmacopoeia. 9th Edition. – European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). – Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France 2016. – 4016 p.
4. Парацетамол // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». — 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. — Т. 2. — С.525-527.
5. Парацетамол таблетки // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 2-е вид. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр

References

1. Kogan M., Pappas G., Stella M. (1994). Over-the-counter Medication Use Among US Preschool-age Children. JAMA, P.1025-1030. [in English]
2. Kalmár É., Kormányos B., Szakonyi G., Dombi G. (2014). Validated HPLC Determination of 4-Dimethylaminoantipyrine in Different Suppository Bases. Indian J PharmSci. Vol. 76(1), 31–37. [in English]
3. European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) (2016). European Pharmacopoeia. Vol. 9. (P.2016-4016). France [in English]
4. Derzhavne pidpriemstvo Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv (2014). Derzhavna Farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]. Vol. 2(2) (P. 525-527). Kharkiv. [in Ukrainian]
5. Derzhavne pidpriemstvo Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv (2018). Derzhavna Farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]. Vol. 2(3). P. 635-637. Kharkiv. [in Ukrainian]
6. Németh T., Jankovics P., Németh-Palotás

- якості лікарських засобів», 2018. — Т. 3. — С. 635-637.
6. Németh T., Jankovics P., Németh-Palotás J., Koszegi-Szalai H. Determination of paracetamol and its main impurity 4-aminophenol in analgesic preparations by micelle relectrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008 Aug 5;47(4-5):746-749. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.03.003>.
7. Engin C., Yilmaz S., Saglikoglu G., Yagmur S., Sadikoglu M. Electroanalytical Investigation of Paracetamol on Glassy Carbon Electrode by Voltammetry. *International Journal of Electrochem. Sci.*, 2015. – V.10. – P.1916 – 1925.
8. Mcevoy, Eamon & Donegan, Sheila & Power, Joe & Altria, Kevin. (2007). Optimisation and validation of a rapid and efficient microemulsion liquid chromatographic (MELC) method for the determination of paracetamol (acetaminophen) content in a suppository formulation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 44. 137-43. DOI: 10.1016/j.jpba.2007.02.025.
9. Acetaminophen Suppositories. USP 39–NF 34, P. 2298
10. De Bleye C., Dumont E., Rozet E., Sacré P.Y., Chavez P.F., Netchacovitch L., Piel G., Hubert P., Ziemons E. Determination of 4-aminophenol in a pharmaceutical formulation using surface enhanced Raman scattering: from development to method validation. *Talanta*. 2013, Nov 15;116:899-905. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.084>.
11. Dejaegher B., Bloomfield M.S., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y.. Validation of a fluorimetric assay for 4-aminophenol in paracetamol formulations. *Talanta*. 2008 Mar 15;75(1):258-265. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.11.029>.
12. Wyszczka-Kaszuba E., Warowna - Grześkiewicz M., Fijałek Z. Determination of 4-aminophenol impurities in selected pharmaceutical preparations by HPLC method with amperometric detection. *ActaPolPharm* 2001, Vol.58. - №5. –p.325-329.
13. Салій О. О. Дослідження впливу фізико-хімічних властивостей парацетамолу на вивільнення із супозиторіїв / О. О. Салій, О. П. Баула, І. М. Бовгіря // *КиївPharma-2017. Фармакологія та фармацевтична технологія в забезпеченні активного довголіття : збірник наукових праць III Міжнародної науково-практичної конференції (8 грудня 2017 р., м. Київ) / під заг. ред. В. В. Страшного. – Київ : КНУТД, 2017. – С. 115-119.*
14. Валідація аналітичних методик і випробувань // *Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр».* – 2-е вид. — Харків: J., Koszegi-Szalai H. (2008) Determination of paracetamol and its main impurity 4-aminophenol in analgesic preparations by micelle relectrokinetic chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 47(4-5), 746-749. [in English]
7. Engin C., Yilmaz S., Saglikoglu G., Yagmur S., Sadikoglu M. (2015) Electroanalytical Investigation of Paracetamol on Glassy Carbon Electrode by Voltammetry. *International Journal of Electrochem. Sci.* – V.10. – P.1916 – 1925. [in English]
8. Mcevoy, Eamon & Donegan, Sheila & Power, Joe & Altria, Kevin. (2007). Optimization and validation of a rapid and efficient micro emulsion liquid chromatographic (MELC) method for the determination of paracetamol (acetaminophen) content in a suppository formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, – Vol. 44, P.137-143 [in English]
9. Acetaminophen Suppositories. USP 39–NF 34, P. 2298 [in English]
10. De Bleye C., Dumont E., Rozet E., Sacré P.Y., Chavez P.F., Netchacovitch L., et al (2013). Determination of 4-aminophenol in a pharmaceutical formulation using surface enhanced Raman scattering: from development to method validation. *Talanta*, 899-905. [in English]
11. Dejaegher B., Bloomfield M.S., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y. (2008). Validation of a fluorimetric assay for 4-aminophenol in paracetamol formulations. *Talanta*. 258-265. [in English]
12. Wyszczka-Kaszuba E., Warowna - Grześkiewicz M., Fijałek Z (2001). Determination of 4-aminophenol impurities in selected pharmaceutical preparations by HPLC method with amperometric detection . *ActaPolPharm*, Vol.58, 325-329. [in English]
13. Saliy, O. O., Baula, O. P., Bovhyria, I. M. (2017). *KyivPharma-2017. Farmakolohiia ta farmatsevychna tekhnolohiia v zabezpechenni aktyvnoho dovholittia: zbionyk naukovykh prats III Mizhnarodnoi naukovo-praktychnoi konferentsii*. Kyiv: KNUITD, 115–119. [in Ukrainian]
14. Derzhavne pidpriemstvo Ukrainyskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv (2015). *Derzhavna Farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]*. Vol. 2(1). P. 910-929. Kharkiv. [in Ukrainian]
15. Grizodub A.I., Evtifeeva O.A., Proskurina

Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. — Т. 1. — С. 910-929.

15. Гризодуб А.И., Евтифеева О.А., Проскурина К.И., Безумова О.В. Стандартизованная процедура валидации спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в варианте метода показателя поглощения. Сообщение 2. // Фармаком. – 2014. - № 2. – С. 45-53.

16. Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту // Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 2-е вид. — Доповнення 2. — Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. — С. 77-112.

K.I., Bezumova O.V. (2014) Standartizovannaja procedura validacii spektrofotometricheskikh metodik kolichestvennogo opredelenija lekarstvennyh sredstv v variante metoda pokazatelja pogloshhenija. [A standardized procedure for the validation of spectrophotometric methods for the quantitative determination of drugs in a variant of the absorption index method] *Farmakom*. Vol. 2. 45-53. [in Russian]

16. Derzhavne pidpriemstvo Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv (2018). Derzhavna Farmakopeia Ukrainy [State Pharmacopoeia of Ukraine]. Vol. 2 (1). P. 77-112. Kharkiv. [in Ukrainian]

SALIY OLENA

e-mail: saliy.oo@knutd.edu.ua

Researcher ID: AAC-5721-2019

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7103-2083>

Department of Pharmaceutical Industry of the Kyiv National University of Technologies and Design

MANATSIUK VIKTORIIA

e-mail: v.manatsyuk@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1731-1019>

Department of Pharmaceutical Industry of the Kyiv National University of Technologies and Design

KUZMINA GALINAIVANIVNA

e-mail: galina_kuzmina@ukr.net

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0691-8563>

Department of Pharmaceutical Industry of the Kyiv National University of Technologies and Design

FUKLEVA LARYSA

e-mail: fukleva@ukr.net

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2930-0619>

Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Chemistry and Preparations Technology of the Faculty of Postgraduate Education

ИССЛЕДОВАНИЕ ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАРАЦЕТАМОЛА И ЕГО ОСНОВНОЙ ПРИМЕСИ В РЕКТАЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЯХ

САЛИЙ О.О.¹, КУЗЬМИНА Г.И.¹, ФУКЛЕВА Л.А.², МАНАЦЮК В.В.¹

¹Киевский национальный университет технологий и дизайна

²Запорожский государственный медицинский университет

Цель. Исследование валидационных характеристик методики количественного определения парацетамола и его основной примеси 4-аминофенола в ректальных суппозиториях методами спектрофотометрии (УФ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Методика. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре UV VIS Lambda 35 («Perkin Elmer», USA) в кюветах $l = 1$ см. Использовали жидкостный хроматограф Waters 2695 с УФ-детектором Waters 2489, а также хроматографическую колонку Nucleosil C18 размером $250 \times 4,6$ мм, заполненную октадецилсилильным сорбентом с размером частиц 10 мкм. При изучении валидационных характеристик применяли реактивы: вода очищенная, которую получили по установке Milli Q, производства Millipore Corporation (Германия), натрия гидроксид Sigma-Aldrich, кат. № 06203, натрия 1-бутансульфонат Sigma-Aldrich, кат. № 19022-10G-F; этанол 96%, метанол Sigma-Aldrich (чистота 99.9%), муравьиная кислота Sigma-Aldrich, кат. № 33015.

Результаты. Подтверждены валидационные характеристики как специфичность, правильность, прецизионность. Установлено полную прогнозируемую неопределенность аналитической методики количественного определения и предел количественного определения основной примеси парацетамола, при котором выполняется соотношение сигнал/шум - 10% от

исходной концентрации раствора сравнения (0,5 мкг/мл). Подтверждена линейность для количественного определения содержания парацетамола в диапазоне от 80 до 120% от номинального значения. Проведено статистическую обработку экспериментальных данных, коэффициент корреляции линейной зависимости (r) между введенными и найденными значениями для количественного определения парацетамола, составляет $> 0,990$, что свидетельствует о корректности методики.

Научная новизна. Разработаны и валидированы методики количественного определения парацетамола и его основной примеси в суппозиториях. Методика количественного определения парацетамола в суппозиториях значительно проще при выполнении рутинной контрольной серии лекарственного средства и рентабельной по сравнению с методом ВЭЖХ.

Практическая значимость. Полученные результаты эксперимента свидетельствуют, что по исследованным валидационным характеристикам методика корректна и может быть воспроизведена в других лабораториях.

Ключевые слова. Парацетамол, 4-аминофенол, ректальные суппозитории, валидационные характеристики, количественное определение, примеси.

INVESTIGATION OF VALIDATION CHARACTERISTICS OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF PARACETAMOL AND ITS MAIN IMPURITY IN RECTAL SUPPOSITORIES

SALIY O.O.¹, KUZMINA G.I.¹, FUKLEVA L.A.², MANATSYUK V.V.¹

¹ Kyiv National University of Technologies and Design

² Zaporizhia State Medical University

Purpose. Exploration of validation characteristics of the method for the quantitative determination of paracetamol and its main impurity 4-aminophenol in rectal suppositories by spectrophotometry (UV) and high performance liquid chromatography (HPLC).

Methodology. Spectrophotometric measurements were carried out on a UV VIS Lambda 35 spectrophotometer (Perkin Elmer, USA) in cuvettes $l = 1$ cm. We used a Waters 2695 liquid chromatography with a Waters 2489 UV-detector, as well as a Nucleosil C18 chromatographic column with a size of 250×4.6 mm, filled with octadecylsilyl sorbent with a particle size of 10 microns. We used reagents: purified water, which was obtained from the Milli Q plant, manufactured by Millipore Corporation (Germany), sodium hydroxide Sigma-Aldrich, cat. № 06203, sodium 1-butanedisulfonate Sigma-Aldrich, cat. № 19022-10G-F; ethanol 96%, methanol Sigma-Aldrich (purity 99.9%), formic acid Sigma-Aldrich, cat. № 33015.

Findings. Validation characteristics were confirmed as specificity, correctness, precision. The total predicted uncertainty of the analytical method for quantitative determination and the limit of quantitative determination of the main impurity of paracetamol, at which the signal-to-noise ratio is fulfilled, is 10% of the initial concentration of the reference solution ($0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$). Confirmed linearity for quantitative determination of paracetamol content in the range of 80 to 120% of the nominal value. Statistical processing of experimental data was carried out; the correlation coefficient of the linear dependence (r) between the entered and found values for the quantitative determination of paracetamol is > 0.990 , which indicates the correctness of the method.

Originality. Methods for the quantitative determination of paracetamol and its main impurity in suppositories have been developed and validated. The method for quantitative determination of paracetamol in suppositories is significantly simpler for routine control of a batch of drugs and is cost-effective compared to the HPLC method.

Practical value. The obtained experimental results indicate that according to the studied validation characteristics, the technique is correct and can be reproduced in other laboratories.

Keywords. Paracetamol, 4-aminophenol, rectal suppositories, validation characteristics, quantification, impurities.