

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В. Н. Каразіна

Кафедра прикладної хімії

УДК 543,544+547,96+615,07+615,32+615,453

До захисту допускаю

_____ Завідувач кафедри

«__» _____ 2024 р. член-кор. НАНУ В.А. Чебанов

**РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ
ГІДРОКОРТИЗОНА АЦЕТАТУ, БЕНЗОКАЇНІ ТА БУТАМБЕНУ В ПРЕПАРАТІ В
ФОРМІ МАЗІ МЕТОДОМ ВЕРХ**

Кваліфікаційна робота магістра

II курсу хімічного факультету

**МЕЛЬНИК ВІКТОРІЇ
МИКОЛАЇВНИ**

Науковий керівник

доктор філософії (102 Хімія)

Д. М. Чудак

ХАРКІВ 2024

РЕФЕРАТ

Робота містить 94 сторінок машинописного тексту, 3 рисунка, 35 таблиць, 21 сторінку додатків та 40 літературних джерела.

Мета роботи – розробка та валідація методики кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену в складі мазі методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Для проведення досліджень застосовано фізико-хімічний аналіз, рідинно-рідинну екстракцію, спектрофотометрію, методи валідації (оцінка специфічності, точності, лінійності та відтворюваності результатів).

За результатами роботи вперше розроблено комплексну методику кількісного визначення трьох активних компонентів у багатоконпонентній мазі. Встановлено оптимальні параметри ВЕРХ для визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену. Проведено валідацію методики, що підтвердила її відповідність сучасним фармацевтичним стандартам.

Виконана робота сприяє підвищенню точності контролю якості комбінованих мазей, забезпечує стандартизацію методик аналізу в галузі фармацевтичного виробництва, а також відкриває нові можливості для їх застосування.

Ключові слова: ГІДРОКОРТИЗОНУ АЦЕТАТ, БЕНЗОКАЇН, БУТАМБЕН, ВИСОКОЕФЕКТИВНО РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, ВАЛІДАЦІЯ, КОМБІНОВАНІ МАЗІ, КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ.

ABSTRACT

The work contains 94 pages of typed text, 3 figures, 17 table, 35 pages of appendices, and 40 references.

The purpose of the work is to develop and validate a method for the quantitative determination of hydrocortisone acetate, benzocaine, and butamben in ointments using high-performance liquid chromatography (HPLC).

Physicochemical analysis, liquid-liquid extraction, spectrophotometry, and validation methods (evaluation of specificity, accuracy, linearity, and reproducibility) were used in the study.

As a result, a comprehensive methodology for the quantitative determination of three active components in a multi-component ointment was developed for the first time. Optimal HPLC parameters for hydrocortisone acetate, benzocaine, and butamben were established. The validation of the method confirmed its compliance with modern pharmaceutical standards.

The work contributes to improving the accuracy of quality control for combined ointments, standardizing analytical methods in pharmaceutical production, and opens new opportunities for their application.

Keywords: HYDROCORTISONE ACETATE, BENZOCAINE, BUTAMBEN, HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, VALIDATION, COMBINED OINTMENTS, QUALITY CONTROL.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	9
1.1 Характеристика активних компонентів комбінованої мазі	9
1.1.1 Фармакологічні та хімічні властивості гідрокортизону ацетату	9
1.1.2 Фармакологічні та хімічні властивості бензокаїну та бутамбену	10
1.1.3 Використання комбінованих мазей у фармації	11
1.2 Теоретичний огляд методів кількісного визначення активних речовин у мазях	13
1.2.1 Методи екстракції та підготовки проб	14
1.2.2 Аналітичні методи визначення активних речовин	18
1.2.3 Специфіка та вибір методів аналізу багатокомпонентних систем	21
1.3 Теоретичні аспекти валідації аналітичних методик	24
1.3.1 Теоретичні підходи до валідації методик	25
1.3.2 Оцінка достовірності та відтворюваності методик у літературі	29
1.3.3 Перспективи валідації розроблених методик для аналізу мазей	31
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	34
2.1 Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення	34
2.2 Валідація аналітичної методики	38
2.2.1 Специфічність.....	38
2.2.2 Правильність, прецизійність, лінійність та діапазон застосування	40
2.2.3 Робастність.....	43
2.2.4 Результати дослідження правильності, прецизійності(збіжність і внутрішнілабораторної прецизійності), лінійності та діапазону застосування	46
ВИСНОВКИ.....	70
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	71
ДОДАТОК А	74
ДОДАТОК Б.....	89

ВСТУП

Забезпечення якості та ефективності лікарських засобів є одним з пріоритетних завдань сучасної фармації. Особливу увагу приділяють контролю якості багатокомпонентних мазей, що мають складний склад і застосовуються для лікування широкого спектра запальних, інфекційних та больових синдромів. До таких препаратів належать комбіновані мазі, які містять гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен. Кожен із цих компонентів виконує специфічну терапевтичну функцію: гідрокортизону ацетат має виражену протизапальну та антиалергічну дію, бензокаїн і бутамбен виступають місцевими анестетиками, які зменшують больові відчуття. Комбіновані препарати мають важливі переваги, забезпечуючи комплексний терапевтичний ефект за рахунок дії різних речовин. Однак, для ефективного контролю якості таких препаратів необхідно розробляти і застосовувати точні методики кількісного визначення кожного компонента у складі мазі. Це вимагає ретельної адаптації аналітичних методів до складної багатокомпонентної матриці мазей, що включає активні речовини та допоміжні компоненти, які можуть впливати на результати аналізу.

Актуальність дослідження. Розробка методик кількісного визначення активних речовин у складних лікарських формах, таких як мазі, є актуальним завданням через зростаючу потребу в контролі якості та безпеки медикаментів. Відомо, що неправильне дозування або неадекватний контроль вмісту активних компонентів у мазі знижує терапевтичний ефект або викликає побічні реакції. Наявність в одному препараті декількох діючих речовин, які мають різні хімічні та фізичні властивості, ускладнює проведення кількісного аналізу і вимагає застосування спеціальних методів. На сьогоднішній день широко використовуються методи вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), газової хроматографії (ГХ) та спектрофотометрії для аналізу багатокомпонентних препаратів. Проте кожен із методів має свої обмеження та особливості при визначенні саме гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену в комбінованих мазях. Саме тому постає необхідність у розробці та валідації методики, яка б відповідала вимогам фармацевтичного аналізу і забезпечувала б точність, специфічність і відтворюваність результатів для кожного компонента препарату.

Об'єктом дослідження є комбінована мазь, що містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен як активні компоненти, призначені для протизапальної та анестезуючої дії.

Предмет дослідження: методи кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену в складі мазі, зокрема методики аналітичного контролю, які забезпечують точність, специфічність, відтворюваність та стабільність результатів при дослідженні багатокомпонентних лікарських форм.

Сучасна наукова література зосереджується на розробці та вдосконаленні методів аналізу комбінованих препаратів. Провідні дослідження розглядають специфіку кількісного визначення складових мазей за допомогою хроматографічних методів, таких як ВЕРХ і ГХ. У працях українських та закордонних авторів розглянуто оптимізацію цих методів для багатокомпонентних лікарських форм, зокрема в дослідженнях, що підкреслюють необхідність точності й стабільності методик (публікації в *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *Analytical Chemistry* та інших виданнях). Основними джерелами є наукові статті, монографії та методичні рекомендації з фармацевтичного аналізу, які пропонують апробовані методи кількісного визначення активних компонентів. Особливу увагу приділено нормативним документам, таким як Державна Фармакопея України та Європейська Фармакопея, що регламентують вимоги до якості та методів контролю багатокомпонентних лікарських форм. Ці джерела забезпечують надійну базу для розробки та валідації методик аналізу гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену в мазях.

Метою дослідження є розробка та обґрунтування методики кількісного визначення активних речовин (гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену) в складі комбінованої мазі, що забезпечує точність, специфічність, відтворюваність та відповідність сучасним вимогам фармацевтичного аналізу.

Завдання дослідження:

1. Провести аналіз сучасної наукової літератури та нормативної документації щодо методів кількісного визначення компонентів у багатокомпонентних лікарських формах.
2. Дослідити фізико-хімічні властивості гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену, щоб визначити оптимальні умови для їх аналізу в складі мазі.
3. Обґрунтувати вибір аналітичного методу (або методів) для кількісного визначення кожного з компонентів мазі та розробити методику аналізу.
4. Визначити основні параметри валідації методики: лінійність, точність, відтворюваність, специфічність та інші, що впливають на якість результатів.

5. Провести оцінку можливостей застосування розробленої методики для практичного контролю якості комбінованих мазей у фармацевтичній галузі.

Методологія дослідження ґрунтується на комплексному підході до вивчення методів кількісного аналізу багатокomпонентних мазей, що містять гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен. Для досягнення мети дослідження використано принципи системного аналізу, який дозволяє розглянути складні взаємодії між компонентами мазі, а також методологічні підходи, що забезпечують високу специфічність та відтворюваність результатів.

Методи дослідження:

1. Аналіз науково-літературних джерел – проведено аналіз наукової літератури, нормативної документації та публікацій у наукових журналах для визначення сучасних тенденцій та підходів у кількісному аналізі багатокomпонентних лікарських засобів.

2. Фізико-хімічний аналіз активних речовин – досліджено фізико-хімічні властивості гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену для обґрунтування вибору оптимальних умов аналізу.

3. Методи хроматографічного аналізу – високоефективна рідинна хроматографія або газова хроматографія, як основні методи кількісного аналізу, що забезпечують високу точність, відтворюваність і специфічність визначення окремих компонентів у багатокomпонентних мазях.

4. Методика екстракції – теоретично обґрунтовано і досліджено можливі способи вилучення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену із мазі за допомогою різних розчинників для покращення точності аналізу.

5. Методи математичної обробки даних – використовуються для інтерпретації отриманих результатів, а саме для оцінки лінійності, точності, відтворюваності та межі виявлення методики, відповідно до вимог валідації.

Застосування аналітичних і статистичних методів забезпечує системний підхід до розробки та валідації методики кількісного визначення активних компонентів у мазі.

Наукова новизна роботи полягає у розробці та теоретичному обґрунтуванні нової методики кількісного визначення активних речовин (гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену) у складі комбінованої мазі. Вперше пропонуються оптимальні умови хроматографічного аналізу та екстракції, що забезпечують високу специфічність і точність визначення кожного компонента в багатокomпонентній лікарській формі.

Розроблена методика враховує фізико-хімічні особливості трьох активних речовин у складній мазевій матриці, що дозволяє покращити надійність і відтворюваність результатів аналізу.

Отримані результати мають практичну цінність для фармацевтичної промисловості та контролю якості лікарських засобів. Запропонована методика може застосовуватись в лабораторіях контролю якості при виробництві комбінованих мазей, забезпечуючи точний та ефективний контроль вмісту активних компонентів, що підвищує безпеку та ефективність лікування. Крім того, методика відповідає вимогам сучасних фармакопейних стандартів і може використовуватись для стандартизації методів аналізу подібних багатокomпонентних препаратів.

1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Характеристика активних компонентів комбінованої мазі

Застосування комбінованих мазей у фармації дозволяє ефективно впливати на широкий спектр шкірних захворювань та ушкоджень завдяки поєднанню кількох активних речовин із різними механізмами дії. У складі таких препаратів кожен компонент відіграє свою унікальну роль, забезпечуючи комплексну терапію. Гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен – активні речовини з різними фармакологічними властивостями, що забезпечують одночасну протизапальну, знеболювальну та протисвербіжну дію. Для розробки ефективної методики кількісного аналізу цих компонентів важливо враховувати їхні хімічні та фізико-хімічні особливості, а також механізми фармакологічної дії кожного з них. У даному розділі розглядаються фармакологічні та хімічні властивості гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену, їх дія у складі мазі та клінічне значення. Цей аналіз є основою для подальшого вибору і розробки методів кількісного визначення компонентів у складі багатокомпонентного препарату.

1.1.1 Фармакологічні та хімічні властивості гідрокортизону ацетату

Гідрокортизону ацетат – синтетичний похідний природного кортикостероїда гідрокортизону. Хімічна назва: 11 β ,17 α ,21-тригідроксипрегн-4-ен-3,20-діон-21-ацетат. Молекулярна формула: C₂₃H₃₂O₆, молекулярна маса – 404,50 г/моль. Гідрокортизону ацетат є естером гідрокортизону, що надає йому кращу ліпофільність і забезпечує кращу проникність через епідермальні бар'єри при зовнішньому застосуванні, що робить його ефективним для використання в мазевих формах. В умовах нормальної температури і вологості ця сполука стабільна, добре розчиняється в жирних основах і має помірну розчинність в етанолі і воді, що дозволяє отримувати однорідні мазі.

Гідрокортизону ацетат належить до класу глюкокортикостероїдів і чинить виражену протизапальну, протиалергічну, антиексудативну і протисвербіжну дію. Його механізм дії пов'язаний із пригніченням активності фосфоліпази A₂ і подальшим зниженням синтезу арахідонової кислоти, що є попередником медіаторів запалення (простагландинів і лейкотрієнів). Гідрокортизон також знижує проникність капілярів, стабілізує клітинні мембрани і пригнічує накопичення макрофагів та інших імунокомпетентних клітин у вогнищі запалення, що зменшує набряк і почервоніння.

Гідрокортизону ацетат застосовують для місцевого лікування запальних та алергічних уражень шкіри, включаючи дерматити, екземи, псоріаз і свербіж. Як компонент мазі, він забезпечує зниження запальної реакції і дискомфорту, покращуючи загальний стан шкіри в ураженій ділянці. При місцевому застосуванні гідрокортизону ацетат, зазвичай, має низький профіль системної токсичності завдяки обмеженому всмоктуванню. Однак, можливі місцеві побічні ефекти, такі як подразнення шкіри, сухість або атрофія при тривалому застосуванні. У зв'язку з цим доцільно обмежити тривалість терапії і використовувати засіб під контролем лікаря [1-9; 18].

Таким чином, гідрокортизону ацетат є ключовим компонентом мазей, призначених для лікування запальних уражень шкіри, і його властивості дозволяють досягати швидкого терапевтичного ефекту з мінімальним ризиком системних побічних реакцій.

1.1.2 Фармакологічні та хімічні властивості бензокаїну та бутамбену

Бензокаїн (етилловий ефір п-амінобензойної кислоти) є місцевим анестетиком класу естерів. Хімічна формула: $C_9H_{11}NO_2$, молекулярна маса – 165,19 г/моль. Він має кристалічну структуру і є слабозчинним у воді, проте добре розчиняється в органічних розчинниках (етанол, ефір), що сприяє його використанню в мазах. Завдяки низькій водорозчинності бензокаїн забезпечує тривалу місцеву дію, оскільки його вивільнення зі складу мазі відбувається повільно, що продовжує час анестезії на місці нанесення.

Бензокаїн чинить анестезуючий ефект, блокуючи натрієві канали в мембранах нервових клітин, що пригнічує проведення нервових імпульсів. Це запобігає передачі больових сигналів від периферичних рецепторів до центральної нервової системи, забезпечуючи місцевий знеболюючий ефект. Бензокаїн використовується в комбінованих мазах для швидкого знеболення при травмах шкіри, запаленнях, подразненнях і опіках. Бензокаїн застосовується як місцевий анестетик для знеболення при болісних станах шкіри, поверхневих пошкодженнях, дерматитах, екземах і свербіжі. Завдяки швидкій дії він забезпечує миттєве полегшення болю, що особливо важливо при наявності запальних та подразнювальних процесів на шкірі.

Бензокаїн може спричиняти місцеві алергічні реакції, включаючи почервоніння та свербіж. У рідкісних випадках його всмоктування через пошкоджену шкіру або слизові оболонки може викликати метгемоглобінемію – серйозне порушення, при якому знижується здатність гемоглобіну переносити кисень. Через це бензокаїн рекомендують

використовувати з обережністю, особливо на великих поверхнях або в разі тривалого застосування [1].

Бутамбен (бутиловий ефір п-амінобензойної кислоти) також є місцевим анестетиком класу естерів. Хімічна формула: $C_{11}H_{15}NO_2$, молекулярна маса – 193,25 г/моль. Як і бензокаїн, бутамбен є погано розчинним у воді, проте добре розчиняється в жирах та органічних розчинниках. Завдяки високій ліпофільності бутамбен здатний проникати в глибші шари шкіри, що продовжує дію анестезії в порівнянні з іншими місцевими анестетиками. Бутамбен діє за аналогічним механізмом, як і бензокаїн, блокуючи натрієві канали в нервових клітинах і запобігаючи передачі больових сигналів. Однак, бутамбен забезпечує довшу тривалість дії, що дозволяє досягти пролонгованого знеболення в місці нанесення. Завдяки своїм властивостям бутамбен використовується як доповнення до бензокаїну в комбінованих препаратах для посилення та подовження анестезуючого ефекту.

Бутамбен застосовується для полегшення болю та свербіжу при запаленнях, опіках, поверхневих ушкодженнях шкіри та дерматитах. У комбінованих мазях він підсилює і подовжує знеболювальну дію бензокаїну, дозволяючи зменшити частоту нанесення препарату на шкіру. Бутамбен, як правило, добре переноситься при місцевому застосуванні, але в деяких випадках може викликати алергічні реакції або подразнення. Системне всмоктування бутамбену є мінімальним, однак при нанесенні на велику площу шкіри можливі побічні ефекти, тому рекомендується дотримуватися дозування і тривалості застосування [1; 18].

Поєднання бензокаїну та бутамбену у складі комбінованої мазі дозволяє швидко досягти місцевого знеболення (завдяки бензокаїну) з пролонгованою дією (завдяки бутамбену), що робить їх особливо ефективними при запаленнях і ушкодженнях шкіри. Ця комбінація забезпечує багатоступеневий анестезуючий ефект і знижує ризик системних побічних дій, забезпечуючи безпеку та комфорт пацієнта.

1.1.3 Використання комбінованих мазей у фармації

Комбіновані мазі є важливою групою лікарських засобів, що містять кілька активних компонентів із різними фармакологічними властивостями, які забезпечують комплексний лікувальний ефект. Їх застосування у фармації пояснюється необхідністю багатостороннього впливу на патологічний процес: такі мазі здатні поєднувати протизапальну, антисептичну, антибактеріальну, анестезуючу та інші дії в одному

препараті. Це робить їх особливо ефективними при лікуванні шкірних захворювань, ушкоджень шкіри, опіків, болю та запалень. Важливою перевагою комбінованих мазей є можливість одночасного впливу на кілька механізмів хвороби, що скорочує час лікування і зменшує необхідність застосування додаткових препаратів.

На сучасному фармацевтичному ринку існує великий вибір комбінованих мазей, до складу яких входять кортикостероїди, антибіотики, антисептики та місцеві анестетики. Їх можна умовно розподілити на такі основні групи за терапевтичною дією:

1. Протизапальні та анестезуючі комбіновані мазі. До цієї групи належать препарати, що містять кортикостероїди, такі як гідрокортизон, у поєднанні з анестетиками. Такі мазі ефективні при лікуванні запальних захворювань шкіри, що супроводжуються свербіжем і болем, як екзема, дерматити, псоріаз. Протизапальний ефект кортикостероїдів поєднується з анестезуючим ефектом місцевих анестетиків, що забезпечує швидке полегшення симптомів.

2. Антибактеріальні та протизапальні мазі. До цієї категорії належать препарати, які містять антибактеріальні компоненти (наприклад, неоміцин, бацитрацин) у поєднанні з кортикостероїдами. Їх застосовують для лікування бактеріальних інфекцій шкіри з одночасним запаленням. Такі мазі допомагають контролювати інфекцію і знижувати інтенсивність запальної реакції, особливо при дерматитах, ускладнених інфекцією.

3. Протигрибкові та протизапальні комбіновані мазі. Ця група представлена мазями, що поєднують кортикостероїди з протигрибковими засобами (наприклад, клотримазол, міконазол) і застосовується для лікування грибкових інфекцій шкіри з супутнім запаленням. Вони ефективні при мікозах, дерматомікозах та інших грибкових ураженнях.

4. Комбіновані мазі з декількома анестетиками. Такі мазі часто містять комбінацію бензокаїну, бутамбену та інших анестетиків для отримання швидкого та тривалого знеболювального ефекту. Вони використовуються при болісних станах шкіри, опіках, а також у стоматології для знеболення ясен та слизових оболонок [19; 34].

Сучасні тенденції розвитку комбінованих мазей спрямовані на створення препаратів із покращеними профілями безпеки і високою ефективністю. Зокрема, це досягається шляхом оптимізації дозування активних речовин та використання нових допоміжних компонентів, що забезпечують контрольоване вивільнення активних речовин, підвищують стабільність і біодоступність препарату. Тенденція до створення

багатокомпонентних формул дозволяє зменшити кількість препаратів, які пацієнт повинен застосовувати одночасно, що підвищує зручність і прихильність до лікування. Поєднання декількох активних компонентів дозволяє одночасно впливати на кілька патогенетичних механізмів захворювання, що скорочує час терапії. Удосконалення мазевих основ є ще однією тенденцією. Застосування основ із контролем вивільнення активних речовин (наприклад, ліпосомальні та нанокапсульовані системи) сприяє покращенню проникнення активних компонентів у глибші шари шкіри, підвищуючи ефективність і знижуючи частоту нанесення препарату. Завдяки досягненням у галузі фармакогенетики все більшого значення набуває індивідуальний підхід до лікування, що дозволяє розробляти мазі з урахуванням особливостей пацієнта, таких як генетична схильність до алергічних реакцій чи індивідуальна чутливість до компонентів. Це дозволяє зробити комбіновані мазі більш безпечними та ефективними для різних груп пацієнтів [5].

Отже, комбіновані мазі є важливим напрямом у фармації, який постійно вдосконалюється для підвищення ефективності лікування, зручності використання та безпеки для пацієнтів. Розробка нових комбінацій активних речовин та інноваційних мазевих основ дозволяє досягти багатостороннього терапевтичного ефекту з мінімізацією побічних реакцій.

1.2 Теоретичний огляд методів кількісного визначення активних речовин у мазях

Розробка ефективних методів кількісного визначення активних речовин у багатокомпонентних мазях є одним з ключових завдань сучасного фармацевтичного аналізу. Через складність мазевих основ, які можуть включати різні за природою ліпофільні й гідрофільні компоненти, кількісний аналіз активних речовин стає технічно складним завданням. У мазях компоненти мають різні властивості, що впливають на взаємодію з основою, стабільність і біодоступність, а також обумовлюють вибір підходів для точного і специфічного визначення кожного з них. Даний розділ присвячений огляду основних методів, що застосовуються для кількісного аналізу активних речовин у мазях, таких як ВЕРХ, ГХ, спектрофотометрія та інші методи. Дослідження даного питання дозволить оцінити переваги і обмеження кожного методу та їх придатність для визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну і бутамбену в комбінованій мазі. Особлива увага приділяється умовам екстракції активних речовин з маzewої основи, специфічності та відтворюваності методів, а також критеріям валідації, необхідним для забезпечення надійності аналізу. Детальний огляд методів кількісного визначення дозволить

обґрунтувати вибір найбільш підходящих підходів для подальшої розробки методики контролю якості комбінованих мазей.

1.2.1 Методи екстракції та підготовки проб

Ефективність кількісного аналізу активних речовин у мазах значною мірою залежить від правильно підбраної методики екстракції, оскільки мазі мають складну матрицю, яка містить жирові основи, емульгатори, гідрофільні та гідрофобні компоненти. Для надійного аналізу необхідно спочатку вилучити активні речовини з мазевої основи, щоб забезпечити точне та відтворюване вимірювання їхньої концентрації. Вибір оптимального методу екстракції залежить від фізико-хімічних властивостей активних компонентів, таких як гідрофільність/ліпофільність, розчинність, а також їх стабільність в умовах екстракції. Нижче розглянуто основні методи екстракції та підготовки проб для аналізу активних речовин у мазах.

1. Розчинникова екстракція є одним з найбільш широко використовуваних методів для вилучення активних речовин з мазевої матриці. Вона передбачає використання розчинників, здатних ефективно розчинити активні компоненти мазі, залишаючи основу практично нерозчинною. Для вилучення гідрофільних компонентів зазвичай використовують водні розчини або суміші розчинників з високим вмістом води. Ліпофільні компоненти екстрагують органічними розчинниками, такими як етанол, метанол, ацетон, гексан або хлороформ. Для гідрофільно-ліпофільних компонентів застосовують суміш розчинників, яка може включати воду і органічний розчинник у певних співвідношеннях. Методи розчинникової екстракції:

- Проста екстракція, де мазь змішують із розчинником при кімнатній температурі або з легким нагріванням, потім відокремлюють фазу розчинника для подальшого аналізу.
- У випадках, коли необхідна висока ефективність вилучення, застосовують екстракцію в апараті Сокслета, що забезпечує тривале повторне екстрагування активних речовин при певній температурі.
- Для покращення процесу екстракції активних речовин у мазах все частіше використовують сучасні методи, зокрема ультразвукову обробку (сонікацію). Наприклад, доведено, що ультразвукова обробка мазі з гідрокортизоном дозволяє скоротити час екстракції в 1,5 рази порівняно з традиційним нагріванням, зберігаючи стабільність

активних компонентів. Крім того, цей метод мінімізує вплив мазевої основи на процес екстракції [10].

2. Метод твердофазної екстракції (solid-phase extraction, SPE) використовується для вилучення та очистки активних речовин з проби шляхом адсорбції на твердий носій. Перевагою SPE є можливість селективного вилучення цільових компонентів та очищення проби від домішок. Проба мазі обробляється розчинником для вилучення активних речовин, після чого розчин пропускають через SPE-картридж, що містить сорбент (наприклад, C18 або іоннообмінний сорбент). Після завантаження проби на сорбент цільові компоненти елюють за допомогою відповідного розчинника, отримуючи концентрований та очищений екстракт [2].

3. Метод рідинно-рідинної екстракції (liquid-liquid extraction, LLE) часто застосовується для розділення активних речовин мазі між двома несумісними рідинами – водною та органічною фазами. Мазь змішують з відповідним розчинником, а потім екстрагують активні речовини за допомогою другого розчинника, який не змішується з першим. Це дозволяє розділити активні компоненти залежно від їхньої розчинності. Після перемішування рідини розділяються, і органічна фаза, що містить цільові компоненти, відокремлюється для подальшого аналізу. Цей метод дозволяє видаляти домішки та концентрувати активні компоненти мазі [25].

4. Методи фільтрації та центрифугування. Після екстракції для видалення залишків мазевої матриці часто застосовують методи фільтрації та центрифугування. Після екстракції отриманий екстракт може містити тверді частинки мазевої основи, тому для їх усунення використовують мембранні або шприцеві фільтри. Центрифугування застосовується для осадження важких фракцій, що покращує якість екстракту. Це особливо корисно, коли в мазі є емульсійні компоненти, які важко розділяються за допомогою фільтрації.

5. Методи підготовки проб для хроматографічного аналізу. Після екстракції важливо забезпечити підготовку проби до хроматографічного або іншого інструментального аналізу. Для підвищення чутливості аналізу екстракт часто концентрують шляхом випаровування розчинника в умовах вакууму або при зниженій температурі. Для стандартизації проби екстракт розчиняють у певному об'ємі розчинника, що є сумісним із хроматографічною системою. Іноді перед хроматографічним аналізом використовують додаткове очищення проби за допомогою SPE або LLE для усунення залишкових домішок, що можуть заважати точності вимірювань [27].

Вибір методу екстракції залежить від таких факторів:

1. Важливо враховувати розчинність, ліпофільність та стабільність компонентів при контакті з різними розчинниками.
2. Розчинникова екстракція підходить для більшості стандартних мазевих основ, тоді як для емульсійних основ часто необхідне центрифугування або LLE.
3. Якщо потрібно забезпечити високу чутливість і селективність (наприклад, для низькоконцентрованих компонентів), SPE та LLE є оптимальними методами, які забезпечують очищення проби.

Правильний вибір методу екстракції і підготовки проби є критичним етапом, що забезпечує точність і відтворюваність кількісного аналізу активних компонентів у багатокомпонентних мазях [9].

Таблиця 1.1 Порівняння методів екстракції.

Метод екстракції	Ефективність вилучення	Вартість	Час аналізу	Застосовність до компонентів
Розчинникова екстракція	Висока	Середня	Середній	Ліпофільні, гідрофільні
Ультразвукова екстракція	Дуже висока	Середня	Низький	Ліпофільні, гідрофільні
Твердофазна екстракція	Висока	Висока	Середній	Ліпофільні, складні матриці
Рідинно-рідинна екстракція	Середня	Середня	Високий	Гідрофільні

Проаналізовані методи екстракції та підготовки проб для кількісного визначення активних речовин у мазях свідчать про важливість адаптації методик до особливостей багатокомпонентних лікарських форм. Серед основних методів ефективною є розчинникова екстракція, що має широкий спектр застосування завдяки можливості підбору розчинника відповідно до природи активних речовин. Також методи твердофазної та рідинно-рідинної екстракції дозволяють додатково очищувати та концентрувати проби, що робить їх оптимальними для аналізу компонентів, таких як гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен.

Капілярний електрофорез є сучасним методом аналітичної хімії, що знаходить широке застосування для підготовки проб у фармацевтичному аналізі. Завдяки високій роздільній здатності, швидкості аналізу та низькому споживанню реагентів, цей метод

стає незамінним при роботі зі складними матрицями, такими як мазі. Основний принцип капілярного електрофорезу полягає у розділенні компонентів проби під дією електричного поля в тонкому капілярі, заповненому буферним розчином. Компоненти проби розділяються на основі їхнього заряду, розміру та взаємодії з буфером. При підготовці проб для аналізу мазей капілярний електрофорез виконує подвійну функцію. По-перше, він дозволяє виділити активні компоненти з матриці мазі без використання великої кількості органічних розчинників, що є екологічно безпечним та економічно вигідним. По-друге, цей метод забезпечує високу селективність і чутливість, що особливо важливо для аналізу багатокомпонентних мазей, де присутні як ліпофільні, так і гідрофільні компоненти.

Процедура підготовки проби за допомогою капілярного електрофорезу включає кілька етапів. Спочатку мазь розчиняють у відповідному буферному розчині, який підбирають залежно від хімічних властивостей активних речовин. Наприклад, для вилучення гідрокортизону використовують водно-метанольний розчинник із додаванням фосфатного буфера, який забезпечує стабільність речовини. Отриманий розчин центрифугують або фільтрують для видалення нерозчинних залишків мазевої основи, після чого пробу вводять у капіляр. У капілярі під дією електричного поля відбувається швидке розділення компонентів проби. Активні речовини, залежно від свого заряду, рухаються до катода або анода з різною швидкістю. Це дозволяє ефективно розділити навіть компоненти зі схожими фізико-хімічними властивостями, що є особливо важливим для багатокомпонентних мазей із гідрокортизоном, бензокаїном та бутамбеном.

Капілярний електрофорез має низку переваг у порівнянні з традиційними методами підготовки проб, такими як розчинникова або рідинно-рідинна екстракція. По-перше, цей метод не потребує великих обсягів розчинників, що знижує вартість аналізу та зменшує вплив на довкілля. По-друге, КЕ дозволяє уникнути стадії додаткового очищення проби, оскільки під час самого процесу електрофоретичного розділення видаляються більшість домішок мазевої основи. По-третє, метод є надзвичайно чутливим до мікроконцентрацій активних речовин, що робить його ідеальним для аналізу мазей із низьким вмістом компонентів. Однак КЕ має і певні обмеження. Зокрема, метод вимагає спеціалізованого обладнання, а також ретельного підбору буферних систем для досягнення оптимальних умов розділення. Крім того, висока ефективність розділення залежить від правильної підготовки капіляра, оскільки його забруднення може призвести до спотворення результатів аналізу. Таким чином, капілярний електрофорез поєднує в собі високу

ефективність, економічність та екологічність, що робить його ідеальним вибором для підготовки проб перед кількісним аналізом активних компонентів у мазах. Його застосування значно спрощує процедуру аналізу, зменшує витрати часу та ресурсів, а також забезпечує точність і відтворюваність результатів [21].

Вагомий внесок у розвиток методів екстракції для фармацевтичного аналізу багатокомпонентних препаратів зробили такі науковці, як Дж. Сміт і А. Вільямс. Їх дослідження щодо рідинно-рідинної екстракції для мазей підтвердили, що цей метод є одним із найбільш ефективних для селективного вилучення активних компонентів при аналізі складних лікарських форм [34]. Подібне дослідження проведене українськими науковцями Л. В. Коваленко і О. І. Гончар, які дослідили методи розчинникової екстракції для мазевих форм із гідрокортизоном. Вони показали, що використання суміші метанолу та води у певному співвідношенні забезпечує високий ступінь вилучення активних речовин без руйнування мазевої матриці [10]. Таким чином, результати проведених досліджень підтверджують, що вибір методу екстракції та підготовки проб є важливим етапом у забезпеченні точності і відтворюваності кількісного аналізу багатокомпонентних мазей. Отримані в цьому напрямку результати науковців є основою для подальших удосконалень і адаптації методик під конкретні фармацевтичні препарати.

1.2.2 Аналітичні методи визначення активних речовин

Аналіз активних речовин у багатокомпонентних мазах є складним завданням, що вимагає застосування точних, специфічних та відтворюваних методів. В умовах фармацевтичного аналізу для кількісного визначення компонентів мазей широко застосовуються такі методи, як високоефективна рідинна хроматографія, газова хроматографія, спектрофотометрія та інші інструментальні методи. Нижче наведено детальний опис основних методів, їхні переваги, обмеження та практичне застосування в аналізі активних речовин у мазах.

1. Високоефективна рідинна хроматографія. ВЕРХ є одним із найпоширеніших методів для аналізу активних речовин у мазах. Він базується на розділенні компонентів суміші в рідкій фазі шляхом їх адсорбції на твердій фазі сорбенту, який утримується в колонці. Компоненти розділяються на основі їхньої взаємодії з рухомою і нерухомою фазами, що дозволяє отримати високий рівень специфічності та чутливості. ВЕРХ забезпечує високу точність і відтворюваність аналізу, що робить її ідеальним інструментом для контролю якості фармацевтичних препаратів. Цей метод дозволяє

одночасно визначати кілька компонентів у багатокомпонентних системах, що є особливо цінним для аналізу мазей, які часто містять кілька активних речовин. Завдяки високій чутливості ВЕРХ здатна визначати навіть низькі концентрації активних компонентів. Однак, ВЕРХ має і певні недоліки: вона потребує дорогого обладнання і вимагає високої кваліфікації оператора. Крім того, для аналізу деяких компонентів можуть знадобитися спеціальні детектори, як УФ-детектори або мас-спектрометричні детектори, що підвищує вартість проведення аналізу. Ще одним недоліком є те, що не всі компоненти можна ефективно розділити за допомогою ВЕРХ, особливо якщо вони мають дуже схожі хімічні властивості. Метод ВЕРХ часто застосовується для аналізу гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену в мазах. Наприклад, ВЕРХ дозволяє розділити і точно виміряти концентрації цих компонентів навіть при наявності допоміжних речовин мазі, що забезпечує надійний контроль якості препарату [23].

2. Газова хроматографія є методом, який використовується для аналізу летких і термостабільних компонентів. Компоненти суміші випаровуються і переносяться рухомою фазою (газом) через колонку, заповнену сорбентом. Завдяки різній швидкості переміщення через колонку, компоненти розділяються і можуть бути ідентифіковані. ГХ забезпечує високу чутливість і точність, що дозволяє аналізувати низькі концентрації речовин. Цей метод підходить для компонентів, які легко випаровуються, таких як леткі розчинники і деякі активні речовини. Додатковою перевагою є можливість підключення до мас-спектрометричного детектора (ГХ-МС), що забезпечує точну ідентифікацію компонентів. Водночас ГХ має певні обмеження: вона непридатна для нелетких або термолабільних компонентів, які розкладаються при високих температурах. Крім того, для проведення аналізу необхідна ретельна підготовка проби, щоб уникнути втрат речовини під час випаровування. Деякі мазеві основи можуть перешкоджати процесу розділення, що вимагає додаткових етапів очищення проби. ГХ підходить для аналізу компонентів мазей, які мають леткі властивості або можуть бути розчинені в летких розчинниках. У випадку з комбінованими мазями цей метод може застосовуватися для визначення летких добавок або допоміжних речовин [22].

3. Спектрофотометрія базується на вимірюванні абсорбції світла певної довжини хвилі молекулами речовин. Кожна речовина має свій унікальний спектр поглинання, що дозволяє точно визначити її концентрацію в розчині. Спектрофотометрія є відносно доступним методом, що не потребує складного обладнання. Вона швидка, проста у виконанні і дозволяє проводити кількісний аналіз з мінімальною підготовкою проби, що

робить її зручною для широкого застосування. Спектрофотометрія підходить для аналізу сполук, які мають специфічний спектр поглинання в ультрафіолетовій або видимій області. Водночас цей метод має і певні обмеження: він менш специфічний у порівнянні з хроматографічними методами і може бути чутливим до домішок. Спектрофотометрія також обмежено застосовується для багатокомпонентних систем, оскільки спектри поглинання різних компонентів можуть накладатися один на одного, що ускладнює аналіз. Крім того, цей метод має низьку чутливість до компонентів, які не мають сильного поглинання в УФ- або видимій області спектру. Спектрофотометрія використовується для швидкого визначення концентрації активних речовин, таких як гідрокортизону ацетат. Наприклад, для аналізу бензокаїну використовується УФ-спектрофотометрія, оскільки ця речовина має виражений максимум поглинання в УФ-області [30].

4. Мас-спектрометрія дозволяє визначати масу молекул і їхніх фрагментів, що дає можливість ідентифікувати структуру молекул речовин. Метод поєднують із хроматографією для підвищення специфічності і точності. Мас-спектрометрія характеризується високою специфічністю і чутливістю, що дозволяє точно ідентифікувати навіть дуже низькі концентрації речовин. Поєднання цього методу з хроматографією забезпечує ефективне розділення і детекцію компонентів у складних сумішах, що робить його особливо корисним для аналізу багатокомпонентних систем. Мас-спектрометрія також дозволяє ідентифікувати невідомі компоненти на основі їхнього молекулярного та фрагментного спектрів. Однак цей метод має і певні недоліки: він є дорогим, потребує складного обладнання та високої кваліфікації оператора. Крім того, мас-спектрометрія вимагає складної підготовки проби, особливо якщо мазева основа заважає аналізу. Висока чутливість до домішок вимагає додаткових етапів очищення проби для отримання точних результатів. МС часто використовується для точного ідентифікаційного аналізу активних компонентів мазей. Метод забезпечує високу специфічність, що є особливо цінним для дослідження нових або складних лікарських препаратів [26].

Для кількісного визначення активних речовин у комбінованих мазях найбільш ефективним методом є ВЕРХ у поєднанні з УФ- або мас-спектрометричним детектуванням. Він забезпечує необхідну специфічність, відтворюваність та чутливість. Газова хроматографія використовується рідше через необхідність випаровування речовин, а спектрофотометрія підходить для простих аналізів, коли немає значного впливу мазевої основи або домішок. Отже, для кількісного аналізу багатокомпонентної мазі, що містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен, оптимальним методом є ВЕРХ. ВЕРХ

забезпечує високу чутливість і специфічність, необхідну для одночасного розділення та визначення концентрацій цих компонентів навіть у складній мазевій матриці. Завдяки можливості використання УФ-детектора для гідрокортизону ацетату і бензокаїну, ВЕРХ дозволяє досягти надійного і відтворюваного аналізу. Для підвищення чутливості та селективності може бути доцільним застосування ВЕРХ-МС, що дозволяє точно ідентифікувати кожен компонент, зокрема бутамбен, та уникнути впливу домішок або мазевої основи на результати аналізу. Це особливо важливо для багатокомпонентних мазей, де кожен активний компонент має свої фізико-хімічні особливості. Спектрофотометрія, хоч і є доступнішою та простішою, не забезпечує достатньої специфічності при наявності декількох активних речовин з перекривними спектрами поглинання, тому може використовуватися лише як додатковий метод для контролю окремих компонентів у чистих зразках [38].

1.2.3 Специфіка та вибір методів аналізу багатокомпонентних систем

Аналіз багатокомпонентних систем, таких як мазі з кількома активними речовинами, вимагає високого рівня специфічності, точності та чутливості. Оскільки різні компоненти взаємодіють з матрицею мазі та між собою, вибір методу повинен враховувати особливості кожного активного інгредієнта та можливі перешкоди від допоміжних речовин. Основними завданнями є розділення компонентів, ідентифікація, кількісне визначення та мінімізація впливу мазевої основи на результати аналізу. Специфічність методу означає здатність чітко ідентифікувати і кількісно визначити окремі компоненти в присутності інших речовин. Для багатокомпонентних систем специфічність має особливе значення, оскільки компоненти можуть мати схожі фізико-хімічні властивості, що ускладнює їхнє розділення. До того ж мазева основа і допоміжні речовини впливають на точність результатів, перекриваючи або зсуваючи сигнали компонентів. Щоб досягти необхідної специфічності, зазвичай обирають методи, які забезпечують високий рівень розділення і чітку ідентифікацію речовин. Найчастіше це досягається завдяки інструментальним методам, таким як ВЕРХ або ГХ у поєднанні з відповідними детекторами.

ВЕРХ є основним методом аналізу багатокомпонентних мазей, оскільки забезпечує високу специфічність і дозволяє одночасно визначати декілька компонентів. ВЕРХ ефективно працює для багатьох лікарських речовин завдяки можливості використовувати широкий діапазон колонок і розчинників, які можна підбирати відповідно до полярності

та розчинності компонентів [7; 13]. Основними критеріями ВЕРХ для багатокомпонентних систем є підбір розчинника або суміші розчинників, що забезпечують оптимальне розділення компонентів. Крім того, важливим є використання специфічної хроматографічної колонки, наприклад, колонки типу С18 для ліпофільних речовин або колонок із зворотною фазою для гідрофільних сполук, що підвищує ефективність розділення і точність аналізу [16].

ГХ підходить для летких або термостабільних компонентів мазей. ГХ є високочутливим методом, який ефективно розділяє речовини на основі їхньої летючості. Газова хроматографія з мас-спектрометричним детектором (ГХ-МС) дозволяє досягти високої чутливості та специфічності, що робить її придатною для аналізу складних багатокомпонентних мазей із леткими компонентами. Однак цей метод менш поширений для багатокомпонентних мазей через складність підготовки проби і обмеження щодо нелетких компонентів [4; 6].

Спектрофотометрія є швидким і відносно простим методом, однак її специфічність є нижчою, ніж у хроматографічних методів. Спектрофотометрія застосовується для багатокомпонентних мазей у випадках, коли активні речовини мають різні максимуми поглинання. Для аналізу комбінованих мазей спектрофотометрію використовують як додатковий метод контролю, оскільки вона забезпечує обмежену селективність при складних матрицях і вимагає попереднього очищення проби. Диференційна спектрофотометрія використовується, коли кожен компонент має характерний спектр поглинання і може бути кількісно визначений у присутності інших речовин. Дериватна спектрофотометрія дозволяє підвищити селективність аналізу, шляхом використання дериватів спектра поглинання, що допомагає розділити компоненти з подібними спектрами [17; 36].

Мас-спектрометрія є одним із найбільш специфічних методів, оскільки дозволяє ідентифікувати компоненти на основі їхньої молекулярної маси і фрагментації. МС використовується для підтвердження структури і точного кількісного визначення кожного компонента в багатокомпонентних системах. Мас-спектрометрію зазвичай поєднують із ВЕРХ або ГХ, що підвищує специфічність і точність. ВЕРХ-МС дозволяє проводити точний кількісний аналіз компонентів, що мають схожі фізико-хімічні властивості і вимагають високої специфічності. ГХ-МС застосовується для аналізу летких компонентів, які легко ідентифікуються за їхньою масою. Мас-спектрометрія є незамінною для

підтвердження ідентичності компонентів у випадках, коли інші методи не забезпечують достатньої специфічності [3].

Для аналізу багатокомпонентних систем часто застосовують комбіновані методи, які забезпечують вищу точність і специфічність. ВЕРХ-УФ-МС (високоєфективна рідинна хроматографія з ультрафіолетовим і мас-спектрометричним детекторами) дозволяє спочатку здійснити розділення і кількісне визначення компонентів за допомогою УФ-детектора, а потім підтвердити їх ідентичність мас-спектрометрією. Секвенційні методи для багатокомпонентних мазей можуть включати початкову підготовку проби, екстракцію активних компонентів і подальший аналіз хроматографічними або спектрометричними методами [28].

Основними факторами при виборі методу аналізу багатокомпонентних систем є:

1. Полярність, розчинність, летючість і стабільність компонентів.
2. У мазах, що мають складну матрицю, обираються методи, які дозволяють очищувати пробу і мінімізувати вплив допоміжних речовин.
3. У випадках, коли потрібна висока специфічність і чутливість, рекомендуються ВЕРХ-МС або ГХ-МС.
4. Вибір методу залежить від доступного аналітичного обладнання, витрат на аналіз і кваліфікації аналітиків [31].

У фармацевтичному виробництві ВЕРХ є одним із основних методів для контролю якості складних лікарських форм. Наприклад, у Європейському Союзі (зокрема у Німеччині) компанії широко використовують ВЕРХ для аналізу стабільності мазей із кортикостероїдами. У дослідженні [15] було продемонстровано, що ВЕРХ із використанням С18-колонки дозволяє точно визначати гідрокортизон у присутності продуктів розкладу протягом тривалого періоду зберігання. Газова хроматографія є стандартним методом у США для контролю залишкових органічних розчинників у мазах. Наприклад, компанія Pfizer застосовує ГХ із полум'яно-іонізаційним детектором (FID) для аналізу летких розчинників, таких як метанол або ацетон, у процесі виробництва мазей. У дослідженні [38] зазначено, що цей метод забезпечує чутливість до 0,01 мг/г, що дозволяє відповідати жорстким вимогам FDA до якості продукції.

У Канаді капілярний електрофорез активно використовують у дослідженнях біодоступності мазей. КЕ був застосований для визначення гідрокортизону в зразках шкіри пацієнтів після нанесення мазі [31]. Метод дозволив чітко розділити активну

речовину від компонентів біологічної матриці, що стало основою для затвердження мазі в клінічній практиці [32; 35].

Японські фармацевтичні компанії, такі як Takeda Pharmaceuticals, використовують ВЕРХ у поєднанні з мас-спектрометрією для одночасного визначення кількох активних речовин у багатокомпонентних мазях. ВЕРХ-МС застосовується для аналізу гідрокортизону, бензокаїну та бутамбену в мазі з високою специфічністю та чутливістю до 0,001 мг/г. У косметичній індустрії у Франції мультиспектральні методи, такі як FTIR, активно використовуються для швидкого контролю складу кремів та мазей. Наприклад, компанія L'Oréal застосовує FTIR для ідентифікації жирних кислот і восків у складі мазевих основ, що дозволяє знизити вартість та час аналізу на етапах виробництва.

У Великобританії компанія GlaxoSmithKline інтегрує системи штучного інтелекту для автоматизованого аналізу даних, отриманих з ВЕРХ і ГХ. Наприклад, нейронні мережі дозволяють автоматично ідентифікувати активні речовини в мазі, оцінювати їх кількісний вміст і видаляти артефакти хроматограм. У дослідженнях зазначено, що використання ШІ скоротило час аналізу на 25%, а також підвищило точність до 99%.

В Україні фармацевтичні компанії, такі як Фармак, активно застосовують ВЕРХ для аналізу багатокомпонентних мазей. ВЕРХ із УФ-детекцією використовуються для одночасного визначення гідрокортизону та бензокаїну у складі мазі. Метод продемонстрував високу точність і чутливість, що відповідає вимогам Державної фармакопеї України [20; 24].

Таким чином, комбіноване використання методів підвищує точність і надійність отриманих результатів, що є особливо важливим для контролю якості багатокомпонентних препаратів.

1.3 Теоретичні аспекти валідації аналітичних методик

Валідація аналітичних методик є необхідним етапом розробки та впровадження методів контролю якості лікарських засобів. Метою валідації є підтвердження того, що обрана методика здатна забезпечити точні, надійні та відтворювані результати, які відповідають вимогам до аналізу конкретного препарату. У фармацевтичному аналізі це особливо важливо для багатокомпонентних систем, таких як комбіновані мазі, де одночасно визначають кілька активних речовин, що потребує високого рівня специфічності та точності.

У цьому розділі розглядаються основні валідаційні параметри, такі як точність, відтворюваність, специфічність, лінійність, межа виявлення і межа кількісного визначення, які є ключовими для забезпечення якості та надійності аналітичної методики. Особлива увага приділяється підходам, рекомендованим міжнародними нормативними документами, зокрема рекомендаціям ICH Q2(R1) «Validation of Analytical Procedures», що є загальновизнаним стандартом для фармацевтичного аналізу. Розгляд теоретичних аспектів валідації методик створює основу для подальшого забезпечення відповідності методів кількісного визначення компонентів мазі сучасним вимогам, що дозволяє покращити їх застосування в контролі якості комбінованих лікарських форм.

1.3.1 Теоретичні підходи до валідації методик

Валідація аналітичних методик у фармацевтичному аналізі є критичним етапом, що дозволяє підтвердити їхню надійність, точність, специфічність та відповідність вимогам до якості лікарських засобів. Валідація має забезпечити гарантії, що методика адекватно підходить для виконання завдання та здатна давати точні і відтворювані результати. Основні підходи до валідації базуються на міжнародних стандартах, таких як рекомендації ICH Q2(R1) «Validation of Analytical Procedures», а також нормативних вимогах фармакопей.

Перший крок у процесі валідації – визначення параметрів, які потребують оцінки для конкретного типу методики. Параметри залежать від призначення методики, типу аналізу та особливостей лікарської форми, що аналізується. Наприклад, для кількісного визначення речовин у багатокомпонентних мазях зазвичай оцінюють такі параметри: специфічність, лінійність, межа виявлення, межа кількісного визначення, точність, відтворюваність, робочий діапазон. Для підтвердження відповідності методики проводиться тестування валідаційних параметрів з використанням стандартних і контрольних зразків. Залежно від валідаційного параметра обирають відповідні експериментальні підходи та методи оцінки [1].

Основні валідаційні параметри та підходи до їх оцінки:

1. Специфічність – це здатність методики точно визначати конкретну речовину в присутності інших компонентів, включаючи домішки, продукти розкладання та компоненти матриці. Для її оцінки проводяться дослідження з використанням мазі, що містить активні речовини разом із домішками та допоміжними речовинами. Візуально або

за допомогою хроматографії перевіряють, чи розділяються компоненти без взаємного впливу.

2. Лінійність методики визначається здатністю давати результати, що пропорційно відповідають концентрації аналізованої речовини в заданому діапазоні. Для оцінки цього параметра готують серію стандартних розчинів з різними концентраціями активної речовини, вимірюють їх і будують калібрувальний графік. Коефіцієнт кореляції (R^2) має наближатися до 1, щоб підтвердити лінійність.

3. Межа виявлення (Limit of Detection, LOD) – це мінімальна кількість речовини, яку методика може виявити, але не обов'язково кількісно визначити. Зазвичай LOD визначають за співвідношенням сигнал/шум (Signal-to-Noise Ratio) і використовують значення 3:1.

4. Межа кількісного визначення (Limit of Quantitation, LOQ) – це мінімальна кількість речовини, яку методика може кількісно визначити з прийнятною точністю і відтворюваністю. LOQ зазвичай визначається при співвідношенні сигнал/шум 10:1.

5. Точність методики описує ступінь близькості результатів до істинного значення і складається з трьох аспектів: внутрішньоденної точності (precision), міжденної точності (intermediate precision) та відтворюваності (reproducibility). Внутрішньоденна точність перевіряється шляхом аналізу декількох зразків в один день. Міжденна точність перевіряється шляхом повторного аналізу зразків в різні дні. Відтворюваність – здатність методики давати однакові результати при аналізі в різних лабораторіях, операторах та на різному обладнанні.

6. Відтворюваність (Repeatability) демонструє, наскільки послідовними є результати одного і того ж зразка при багаторазовому тестуванні в однакових умовах. Її оцінка включає аналіз повторень на одній апаратурі одним оператором у короткий проміжок часу. Відтворюваність виражають за допомогою відсоткового стандартного відхилення (%RSD) або коефіцієнта варіації (CV). Прийнятний рівень RSD залежить від вимог фармакопеї або стандартів.

7. Робочий діапазон (Range) методики – це інтервал концентрацій, у якому до концентрацій, характерних для аналізованих зразків. Вибір діапазону базується на очікуваних значеннях концентрацій активних речовин у мазі. Діапазон має охоплювати передбачувані межі використання методу, зокрема максимальні та мінімальні концентрації компонентів у мазі [11].

Валідація аналітичної методики також включає підтвердження стабільності активних компонентів у розчинах, мазевій основі та при зберіганні. Стабільність оцінюють через зміну концентрації активних речовин у мазі після певного періоду часу або за певних умов зберігання (наприклад, при різних температурах і освітленні). Стабільність підтверджується, якщо концентрації активних речовин залишаються стабільними в межах допустимих значень. Після проведення всіх необхідних експериментів результати валідації документують і аналізують. Результати мають відповідати вимогам Фармакопеї та стандартам якості для даного типу методик. Якщо методика успішно пройшла всі етапи валідації, вона вважається придатною для практичного застосування у фармацевтичному аналізі та використовується для контролю якості препарату [14].

Підходи до валідації аналітичних методик спрямовані на підтвердження їхньої відповідності критеріям специфічності, точності, лінійності та відтворюваності. Правильний вибір і проведення валідаційних параметрів забезпечує впевненість у результатах, отриманих при контролі якості багатокomпонентних мазей, що є важливим аспектом у фармацевтичному виробництві. В багатокomпонентних мазях, що містять гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен, особливий акцент слід робити на специфічність методики. Для кожного з компонентів слід оцінювати можливість перекриття піків у хроматографії або накладення спектрів у спектрофотометрії. Гідрокортизону ацетат і бензокаїн мають схожі хроматографічні властивості, що ускладнює їх розділення. Бутамбен має високу ліпофільність, тому для його виділення необхідні спеціальні сорбенти або мобільні фази. Для підтвердження специфічності необхідно проводити тестування в умовах присутності допоміжних речовин мазі, які можуть впливати на результат. Це потребує оптимізації мобільної фази, вибору довжини хвилі для УФ-детектування або підбору інших детекторів, таких як мас-спектрометрія.

При валідації точності для багатокomпонентної мазі слід враховувати можливий вплив маzewої основи та допоміжних речовин. Для цього часто проводять додаткові тестування з використанням стандартних додатків, тобто додають відомі кількості активних речовин до чистої маzewої основи. Це дозволяє оцінити, наскільки точно методика може визначати кожен компонент у присутності основи. Для багатокomпонентної мазі доцільно оцінити точність для кожного компонента окремо та перевірити, чи немає зміщень у результатах. Також необхідно перевірити відтворюваність

на різних рівнях концентрації (низька, середня, висока), оскільки кожен компонент проявляє різні властивості при різних концентраціях.

Розглянемо основні відмінності у валідації ВЕРХ і ГХ (таблиця 1.2).

Таблиця 1.2 Відмінності валідації ВЕРХ та ГХ

Параметри	ВЕРХ	ГХ
Об'єкти аналізу	Нелеткі, термолабільні	Леткі, термостабільні
Межі концентрації	Широкий діапазон	Низькі концентрації (слідові)
Лінійність	Широкий діапазон $R^2 \geq 0,99$	Висока чутливість до низьких концентрацій
Детектори	УФ-, флуоресцентний, мас-спектрометричний	Полум'яно-іонізаційний, ГХ-МС
Час аналізу	Довший для складних сумішей	Коротший для летких речовин
Стабільність зразка	Чутливий до деградації	Стабільний у газовій фазі

Оскільки багатокomпонентна мазь містить речовини, які мають різну фармакологічну активність і, відповідно, вимагають різних дозувань, для кожного компонента слід визначити свій робочий діапазон. Наприклад, гідрокортизону ацетат може бути присутній у більш низьких концентраціях порівняно з анестетиками, як-от бензокаїн та бутамбен. Це означає, що робочий діапазон для гідрокортизону має бути чутливішим до нижчих концентрацій. Лінійність для кожного компонента має підтверджуватись у відповідному інтервалі концентрацій, які є найбільш ймовірними у мазі, і це вимагає налаштування параметрів хроматографічної системи для кожної речовини окремо.

У багатокomпонентних мазях стабільність компонентів може бути різною, що особливо важливо врахувати при довготривалому зберіганні мазі. Гідрокортизону ацетат, наприклад, є чутливим до гідролізу, а бензокаїн може деградувати при впливі світла. Тому стабільність мазі потрібно оцінювати для кожного компонента окремо в умовах термінової стабільності (короткотривале зберігання зразка перед аналізом, щоб перевірити чи компоненти стабільні у розчині) та довготривалої стабільності (зберігання мазі при різних умовах температури і вологості для оцінки збереження концентрації кожного компонента протягом терміну придатності). Для підвищення точності та коректного врахування впливу допоміжних речовин у багатокomпонентних мазях часто

використовують внутрішні стандарти – сполуки, які додають до зразка в постійній концентрації. Внутрішній стандарт дозволяє скоригувати можливі зміни у вихідному сигналі для кожного компонента під час аналізу, які можуть виникати внаслідок впливу маzewої матриці та підвищити точність результатів для речовин, що мають слабкі сигнали або важко розділяються в хроматографічній системі. Використання внутрішнього стандарту є особливо корисним при роботі з ВЕРХ або ГХ, де маzewа основа частково перешкоджає вихідному сигналу компонентів [8; 15].

Валідація аналітичної методики для мазі з гідрокортизону ацетатом, бензокаїном і бутамбеном дозволяє впевнено використовувати її для контролю якості готового препарату. Правильний підбір параметрів і глибокий підхід до валідації кожного з аспектів (специфічність, точність, стабільність) забезпечує надійність методики у фармацевтичній практиці і гарантує, що кожен компонент відповідає нормативним вимогам якості.

1.3.2 Оцінка достовірності та відтворюваності методик у літературі

Оцінка достовірності та відтворюваності методик є важливим аспектом фармацевтичного аналізу, що визначає надійність результатів при кількісному визначенні активних речовин у багатокомпонентних лікарських формах. Достовірність методики підтверджується високим рівнем точності, відповідністю аналітичних показників реальним значенням концентрації компонентів, тоді як відтворюваність (прецизійність) демонструє, наскільки послідовно методика може повторювати результати при однакових умовах.

Достовірність (точність) аналітичної методики показує, наскільки близькими є результати аналізу до істинного або реального значення концентрації активної речовини. Для цього в науковій літературі застосовують різні підходи:

1. **Метод стандартних додатків (спайків).** В методі додають відому кількість активної речовини до мазі, а потім аналізують пробу для визначення того, наскільки точно методика визначає доданий компонент. Наприклад, Д. Вільямс у дослідженні щодо мазей з гідрокортизоном використовував стандартні додатки для оцінки точності та зазначив, що цей метод дозволяє коригувати можливі інтерференції, викликані допоміжними речовинами [39].

2. **Порівняння з референс-методом.** Існує визнаний стандартний метод для визначення активної речовини, нову методику порівнюють із референс-методом. У

літературі для багатокомпонентних мазей часто порівнюють нові хроматографічні методи (наприклад, ВЕРХ) із офіційними методиками, описаними в фармакопеях. Наприклад, Дж. Сміт і співавтори, розробляючи нову методику для визначення бензокаїну в мазі, порівнювали її з фармакопейним методом і отримали кореляційний коефіцієнт 0,99, що підтверджує достовірність нового методу [34].

3. Використання контрольних зразків з відомою концентрацією активних речовин (сертифікованих референс-матеріалів), щоб підтвердити, що методика точно визначає концентрацію в контрольних умовах.

Відтворюваність методики демонструє, наскільки послідовно вона дає однакові результати при повторних вимірюваннях за тих самих умов. Відтворюваність оцінюють шляхом вимірювання варіацій у серії аналізів:

1. Внутрішньоденна та міжденна прецизійність. Внутрішньоденну прецизійність визначають шляхом багаторазового аналізу зразків протягом одного дня, а міжденну – шляхом повторного аналізу тих самих зразків у різні дні. Так, у дослідженні Р. Жанга було продемонстровано, що відтворюваність для багатокомпонентної мазі з бензокаїном і бутамбеном становила менше 2% внутрішньоденного стандартного відхилення, що відповідає стандартам для фармацевтичного аналізу [40].

2. У літературі часто використовують коефіцієнт варіації (%CV) як показник відтворюваності. Для фармацевтичного аналізу допустиме значення %CV становить менше 2% для кількісних методик. Значення, які перевищують цей поріг, можуть свідчити про нестабільність методики або про вплив матриці мазі, що потребує корекції.

3. У великих дослідженнях також оцінюють, чи є методика відтворюваною при роботі різних операторів або з використанням різного обладнання. Наприклад, у багатокомпонентних мазях часто важко досягти стабільних результатів через вплив матриці мазі, але використання внутрішніх стандартів допомагає підвищити відтворюваність навіть при зміні лабораторних умов [12].

У наукових роботах часто наводять результати валідації методик у порівнянні з вимогами фармакопей. Ці стандарти вимагають, щоб методики для аналізу багатокомпонентних мазей мали прецизійність у межах $\%CV < 2\%$ та відповідали стандартам специфічності. Дослідники в літературі часто наводять приклади відповідності нових методик стандартам фармакопей, щоб підтвердити їхнє практичне застосування. У роботах деяких дослідників було розроблено ВЕРХ-метод для багатокомпонентної мазі,

який продемонстрував відповідність вимогам фармакопеї щодо прецизійності та відтворюваності [33].

У багатокомпонентних мазях, де можливі інтерференції між компонентами та матрицею мазі, для підвищення точності часто застосовують внутрішні стандарти. Внутрішній стандарт допомагає скоригувати будь-які варіації в умовах аналізу, спричинені матрицею або зміною обладнання, забезпечуючи стабільні результати. У літературі часто згадуються випадки, коли використання внутрішнього стандарту підвищувало точність методик для складних мазей, знижуючи стандартне відхилення до прийнятного рівня [31].

На основі літературних даних можна зробити висновок, що методи, які демонструють високу достовірність і відтворюваність, зазвичай мають такі характеристики:

1. Використання стандартних додатків та порівняння з референс-методами для підтвердження точності.
2. Низький коефіцієнт варіації ($\%CV < 2\%$) як показник високої відтворюваності.
3. Застосування внутрішніх стандартів для корекції можливих помилок, пов'язаних із складною матрицею мазі.

Вивчення літератури показує, що достовірність і відтворюваність є основними критеріями валідації, які підтверджують придатність методик для використання в контролі якості багатокомпонентних мазей.

1.3.3 Перспективи валідації розроблених методик для аналізу мазей

Валідація аналітичних методик є важливим аспектом забезпечення якості лікарських засобів, зокрема мазей, які мають складні багатокомпонентні матриці. Сучасні тенденції у фармацевтичній галузі спрямовані на розробку нових ефективних методів аналізу, що відповідають міжнародним стандартам і враховують специфіку кожного препарату. Перспективи валідації методик для аналізу мазей охоплюють адаптацію сучасних технологій, автоматизацію процесів і інтеграцію новітніх підходів для підвищення точності та відтворюваності.

ВЕРХ залишається основним методом для кількісного визначення активних речовин у мазях завдяки високій чутливості та універсальності. Сучасні перспективи включають використання колонок із модифікованими сорбентами, наприклад, зворотних

фаз із полярними групами, які забезпечують краще розділення речовин у складних мазевих матрицях. Такі підходи дозволяють підвищити специфічність аналізу навіть за наявності продуктів розкладу чи домішок. У валідації ВЕРХ-методик активно застосовуються автоматизовані системи підготовки проб, які зменшують вплив людського фактора і забезпечують стабільність умов аналізу. Наприклад, у дослідженнях мазей із гідрокортизоном такі системи дозволяють стандартизувати процес вилучення активної речовини з мазевої основи, що забезпечує точність та відтворюваність аналізу.

ГХ залишається методом вибору для визначення летких речовин, таких як залишкові розчинники, у мазях. Використання мас-спектрометричних детекторів (ГХ-МС) дозволяє одночасно проводити кількісний і якісний аналіз. Перспективи розвитку ГХ включають вдосконалення методик для зниження меж виявлення (LOD), що є критично важливим для слідових кількостей летких речовин у лікарських формах. Наприклад, у мазях із низьким вмістом органічних залишків ГХ-МС дозволяє досягти межі кількісного визначення на рівні 0,001 мг/г.

Капілярний електрофорез є перспективною методикою для аналізу мазей із гідрофільними активними компонентами. Завдяки високій роздільній здатності, швидкості і мінімальним витратам реагентів, КЕ все частіше використовується для кількісного аналізу складних систем. Наприклад, у дослідженнях мазей, що містять гідрокортизон і бензокаїн, капілярний електрофорез дозволяє досягти високої точності при значно скороченому часі аналізу (до 10 хвилин).

Поєднання ВЕРХ із мас-спектрометрією є сучасним інструментом для валідації методик аналізу складних мазей. Ця методика дозволяє визначати слідові кількості активних речовин, продуктів розкладу і домішок із дуже високою специфічністю. Наприклад, у мазях, що містять гідрокортизон, бензокаїн і бутамбен, ВЕРХ-МС дозволяє одночасно ідентифікувати та кількісно визначати кожен компонент навіть у присутності складної мазевої основи [1; 18].

Застосування автоматизованих систем для проведення аналітичних методів стає ключовим фактором у сучасній фармацевтиці. Наприклад, використання роботизованих платформ для підготовки проб і автоматизованих систем управління хроматографічними процесами дозволяє забезпечити стабільність валідаційних параметрів, таких як специфічність, точність і відтворюваність. Додатковим інструментом є інтеграція систем штучного інтелекту, які можуть аналізувати великі обсяги даних, отриманих із ВЕРХ чи ГХ. Наприклад, нейронні мережі дозволяють автоматично ідентифікувати піки,

виключати артефакти та оптимізувати параметри методики. Це підвищує точність аналізу та знижує час, необхідний для валідації методики.

Розвиток фармацевтичної технології привів до появи нових типів мазей, таких як наномазі, ліпосомальні мазі та мікроемульсії. Ці форми мають специфічні фізико-хімічні властивості, що впливають на розчинність і стабільність активних речовин. Для таких систем традиційні методи екстракції можуть бути недостатньо ефективними, тому перспективним є використання вдосконалених методів, наприклад, ультразвукової обробки в поєднанні з капілярним електрофорезом або ВЕРХ.

Мультиспектральні методи, такі як FTIR (інфрачервона спектроскопія) і раманівська спектроскопія, стають перспективним інструментом для валідації методик. Вони дозволяють отримувати дані про хімічні взаємодії між компонентами мазі без додаткової підготовки проби. Наприклад, FTIR широко використовується для визначення домішок у мазевій основі, тоді як раманівська спектроскопія може ідентифікувати активні речовини навіть у присутності складної матриці.

Міжнародні стандарти, такі як ІСН Q2(R1), постійно оновлюються, щоб відповідати вимогам до аналізу складних лікарських форм. У цьому контексті перспективним є впровадження комбінованих методів, наприклад, ВЕРХ-УФ-МС, які забезпечують високий рівень точності та специфічності. Такі підходи дозволяють адаптувати методики до нових нормативних вимог, забезпечуючи відповідність лікарських засобів міжнародним стандартам [29; 37].

Перспективи валідації методик для аналізу багатокomпонентних мазей охоплюють впровадження новітніх технологій для підвищення специфічності, чутливості та відтворюваності, а також розробку методик для нових типів мазевих основ. Покращення стабільності та автоматизація процесу валідації також відкривають нові можливості для швидкого та точного контролю якості препаратів, що сприяє забезпеченню відповідності міжнародним стандартам і підвищенню ефективності виробництва фармацевтичної продукції.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1 Розробка методики ідентифікації та кількісного визначення

Аналітична методика ідентифікації та аналітична методика визначення кількісного вмісту гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену при проведенні тесту «Кількісне визначення. Гідрокортизону ацетат, бензокаїн, бутамбен» у препараті, що містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен у формі мазі для місцевого застосування.

Валідаційні характеристики

Відповідно до ДФУ 2.0 для аналітичних методик ідентифікації методом ВЕРХ необхідно визначити таку валідаційну характеристику, як:

- *Специфіка;*

а для аналітичної методики визначення кількісного вмісту гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену також:

- *правильність;*

- *прецизійність (збіжність та внутрішньолабораторну прецизійність);*

- *Лінійність;*

- *робастність;*

- *Стабільність розчинів;*

- *Діапазон застосування.*

Крім того, слід розрахувати *повну невизначеність методики* кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену .

Аналітична методика ідентифікації

Часи утримання піків гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену на хроматограмі випробуваного розчину, отриманої за розділом «Кількісне визначення. Гідрокортизону ацетат, бензокаїн, бутамбен» повинні відповідати часом утримування відповідних піків на хроматограмі розчину порівняння з точністю $\pm 1,85\%$.

Ультрафіолетові спектри поглинання гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену, отримані в максимумі відповідних піків на хроматограмі випробуваного розчину, повинні відповідати ультрафіолетовим спектрам поглинання гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену хроматограма розчину порівняння.

Аналітична методика кількісного визначення

Зміст C₂₃H₃₂O₆ (гідрокортизону ацетату) в 1 г препарату, має бути від 5,00 мг до 6,14 мг (від 90 % до 110 % від заявленої кількості).

Зміст C₉H₁₁O₂N (бензокаїну) в 1 г препарату, має бути від 9,0 мг до 11,0 мг (від 90 % до 110 % від заявленої кількості).

Зміст C₁₁H₁₅O₂N (бутамбену) в 1 г препарату, має бути від 9,0 мг до 11,0 мг (від 90 % до 110 % від заявленої кількості).

Визначення проводять методом ВЕРХ.

Розчини готують у захищеному від світла місці!

Випробуваний розчин . Близько 1,0 г препарату (точна навішування) поміщають у мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, додають 60 мл метанолу, колбу поміщають

у водяну баню з температурою (50 ± 5) °C і перемішують до розплавлення препарату. Суміш охолоджують до кімнатної температури, об'єм доводять до мітки метанолом і перемішують. Мірну колбу поміщають у морозильну камеру з температурою від -10 до -15 °C і витримують протягом однієї години. Суміш фільтрують через попередньо охолоджений до тієї ж температури фільтр "синя стрічка", відкидаючи перші 2 мл фільтрату. Фільтрат нагрівають до кімнатної температури, після чого фільтрують через фторопластовий мембранний фільтр з діаметром пір 0,45 мкм, відкидаючи перші 2 мл фільтрату.

Розчин СО гідрокортизону ацетату. Близько 56 мг (точна навішування) СО гідрокортизону ацетату поміщають у мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, розчиняють у 80 мл метанолу, доводять об'єм розчину до мітки тим самим розчинником і перемішують.

Розчин СО бензокаїну. Близько 100 мг (точна навішування) бензокаїну СО поміщають у мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, розчиняють у 80 мл метанолу, доводять об'єм розчину до мітки тим же розчинником і перемішують.

Розчин СО бутамбену. Близько 100 мг (точна навішування) бутамбену СО поміщають у мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, розчиняють в 80 мл метанолу, доводять об'єм розчину до мітки тим же розчинником і перемішують.

Розчин порівняння. 10,0 мл розчину СО гідрокортизону ацетату поміщають у мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, додають 10,0 мл розчину СО бензокаїну, додають 10,0 мл розчину бутамбену, доводять об'єм розчину до мітки метанолом, перемішують і фільтрують через фторопласт, відкидаючи перші 2 мл фільтрату.

Хроматографічні умови. Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з діодно-матричним детектором у таких умовах:

- колонка хроматографічна розміром 4,6 мм × 250 мм, заповнена сорбентом Symmetry Shield RP18 з розміром частинок 5 мкм, виробництва фірми «Waters» з передколонкою розміром 3,9 мм × 5,0 мм, заповненою сорбентом Symmetry Shield RP18 мкм, або аналогічна, для якої виконуються умови придатність хроматографічної системи;
- рухлива фаза: вода для хроматографії – ацетонітрил для хроматографії (55: 45);
- швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;
- детектування: при довжині хвилі 245 нм для гідрокортизону ацетату та 288 нм для бензокаїну та бутамбену;
- температура колонки: 40 °C;
- Об'єм інжекції: 10 мкл.
- Порядок виходу піків на хроматограмі розчину порівняння: 1 - бензокаїн; 2 – гідрокортизону ацетат; 3 – бутамбен.

Хроматографують бланк, розчин порівняння та випробуваний розчин.

Перевірка придатності хроматографічної системи:

- ефективність хроматографічної системи, розрахована за піком гідрокортизону ацетату на хроматограмах розчину порівняння, повинна бути не менше 10000 теоретичних тарілок;

- ефективність хроматографічної системи, розрахована за піком бензокаїну на хроматограмах *розчину порівняння*, повинна бути не менше 8000 теоретичних тарілок;
- ефективність хроматографічної системи, розрахована за піком бутамбену на хроматограмах *розчину порівняння*, повинна бути не менше 12000 теоретичних тарілок;
- коефіцієнт симетрії піку гідрокортизону ацетату, піку бензокаїну та піку бутамбену на хроматограмах *розчину порівняння* має бути від 0,8 до 1,5;
- відносне стандартне відхилення площ піку гідрокортизону ацетату, піку бензокаїну та піку бутамбену на хроматограмах *розчину порівняння* та хроматограмах *випробуваного розчину* має перевищувати значення, зазначені в таблиці 2.1;

Таблиця 2.1 Вимоги до RSD_{max} (%).

Кількість паралельних інжекцій (n)	2	3	4	5	6
Максимально допустиме відносне стандартне відхилення RSD_{max} (%) для площ піку гідрокортизону ацетату, піку бензокаїну та піку бутамбену	0,51	1,34	1,92	2,37	2,75

Вміст гідрокортизону ацетату (X_1) в 1 г препарату, в міліграмах, обчислюють за формулою(2.1):

$$X_1 = \frac{S_1 \times m_{01} \times 100 \times 10 \times P_1}{S_{01} \times m \times 100 \times 100 \times 100} = \frac{S_1 \times m_{01} \times P_1}{S_{01} \times m \times 1000}, \quad (2.1)$$

- де S_1 – середнє значення площі піку гідрокортизону ацетату, розраховане за хроматограмами *випробуваного розчину* ;
- S_{01} – середнє значення площі піку гідрокортизону ацетату, розраховане за хроматограмами *розчину порівняння* ;
- m_{01} – маса навішування СО гідрокортизону ацетату, взятої для приготування *розчину СО гідрокортизону ацетату* в міліграмах;
- m – маса навішування препарату, у грамах;
- P_1 – вміст основної речовини в ЗІ гідрокортизону ацетату, використаного для приготування *розчину ЗІ гідрокортизону ацетату*, у відсотках.

Вміст бензокаїну (X_1) в 1 г препарату, в міліграмах, обчислюють за формулою(2.2):

$$X_1 = \frac{S_1 \times m_{01} \times 100 \times 10 \times P_1}{S_{01} \times m \times 100 \times 100 \times 100} = \frac{S_1 \times m_{01} \times P_1}{S_{01} \times m \times 1000}, \quad (2.2)$$

- де S_1 – середнє значення площі піку бензокаїну, розраховане за хроматограмами *випробуваного розчину* ;
- S_{01} – середнє значення площі піку бензокаїну, розраховане за хроматограмами *розчину порівняння* ;

- m_{01} – маса навішування СО бензокаїну, взятої для приготування розчину СО бензокаїну, в міліграмах;
- m – маса навішування препарату, у грамах;
- P_1 – вміст основної речовини в СО бензокаїну, використаного для приготування розчину СО бензокаїну, у відсотках.

Вміст бутамбену (X_1) в 1 г препарату, в міліграмах, обчислюють за формулою(2.3):

$$X_1 = \frac{S_1 \times m_{01} \times 100 \times 10 \times P_1}{S_{01} \times m \times 100 \times 100 \times 100} = \frac{S_1 \times m_{01} \times P_1}{S_{01} \times m \times 1000}, (2.3)$$

- де S_1 – середнє значення площі піку бутамбену, розраховане за хроматограмами випробуваного розчину;
- S_{01} – середнє значення площі піку бутамбену, розраховане за хроматограмами розчину порівняння;
- m_{01} – маса навішування СО бутамбену, взятої для приготування розчину бутамбену, в міліграмах;
- m – маса навішування препарату, у грамах;
- P_1 – вміст основної речовини в ЗІ бутамбену, використаного для приготування розчину ЗІ бутамбену, у відсотках.

Хроматографічна колонка, яка використовується для валідаційних показників: специфічність, правильність, прецизійність (збіжність та внутрішньолабораторна прецизійність), лінійність, робастність, стабільність, межа кількісного визначення, межа виявлення, діапазон застосування: Symmetry Shield RP-18, виробництва фірми Waters, розміром 250 мм × 4,6 мм, заповнена сорбентом з розміром частинок 5 мкм, кат. №186000112; серійний номер 01913318314032, з передколонкою.

Хроматографічна колонка, яка використовується для валідаційних показників: внутрішньолабораторна прецизійність, стабільність та робастність: Symmetry C18, виробництва фірми Waters, розміром 250 мм × 4,6 мм, заповнена сорбентом з розміром частинок 5 мкм, кат. № WAT054275; серійний номер 02573108313880, з передколонкою.

Стандартні зразки:

- ЗІ гідрокортизону ацетату USP RS, кат. №1317007; номер серії R044U0 (вміст основної речовини 99,3%);
- СО бензокаїну USP RS, кат. №1054000; номер серії J2M122 (вміст основної речовини 100,0%);
- ЗІ бутамбену USP RS, кат. №1081501; номер серії H1K373 (вміст основної речовини 99,9%).

Межі в готовому лікарському препараті:

- зміст C23H32O6 (гідрокортизону ацетату) в 1 г препарату, має бути від 5,00 мг до 6,14 мг (від 90 % до 110 % від заявленої кількості 5,58 мг/г);

- вміст $C_9H_{11}O_2N$ (бензокаїну) в 1 г препарату повинен бути від 9,0 мг до 11,0 мг (від 90 % до 110 % від заявленої кількості 10,0 мг/г);

- вміст $C_{11}H_{15}O_2N$ (бутамбену) в 1 г препарату повинен бути від 9,0 мг до 11,0 мг (від 90 % до 110 % від заявленої кількості 10,0 мг/г).

2.2 Валідація аналітичної методики

2.2.1 Специфічність

Критерії прийнятності

1. На хроматограмах *розчину плацебо*, яке не містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен, і *розчину плацебо*, яке не містить гідрокортизону ацетат, а також *розчину бланку (розчинника)* повинні бути відсутні піки з часом утримування, що збігаються з часом утримування піку гідрокортизону ацетату на хроматограмах *розчину порівняння та випробуваного розчину*.

2. На хроматограмах *розчину плацебо*, яке не містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен, і *розчину плацебо*, яке не містить бензокаїн, а також *розчину бланку (розчинника)* повинні бути відсутні піки з часом утримування, що збігаються з часом утримування піку бензокаїну на хроматограмах *розчину порівняння та випробуваного розчину*.

3. На хроматограмах *розчину плацебо*, яке не містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен, і *розчину плацебо*, яке не містить бутамбен, а також *розчину бланку (розчинника)* повинні бути відсутні піки з часом утримування, що збігаються з часом утримування піку бутамбену на хроматограмах *розчину порівняння та випробуваного розчину*.

4. Часи утримання піку гідрокортизону ацетату, піку бензокаїну та піку бутамбену на хроматограмах *випробуваного розчину* повинні збігатися з часом утримування піку гідрокортизону ацетату, піку бензокаїну та піку бутамбену на хроматограмах *розчину порівняння* з точністю $\pm 1,85\%$.

5. УФ спектр гідрокортизону ацетату, отриманий у максимумі піку гідрокортизону ацетату на хроматограмах *випробуваного розчину*, в діапазоні довжин хвиль від 200 нм до 400 нм повинен відповідати УФ спектру гідрокортизону ацетату, отриманому в максимумі піку на хроматограмах *розчину порівняння*.

6. УФ спектр бензокаїну, отриманий у максимумі піку бензокаїну на хроматограмах *випробуваного розчину*, в діапазоні довжин хвиль від 200 нм до 400 нм повинен відповідати УФ спектру бензокаїну, отриманому в максимумі піку на хроматограмах *розчину порівняння*.

7. УФ спектр бутамбену, отриманий у максимумі піку бутамбену на хроматограмах *випробуваного розчину*, в діапазоні довжин хвиль від 200 нм до 400 нм повинен відповідати УФ спектру бутамбену, отриманому в максимумі піку на хроматограмах *розчину порівняння*.

8. Піки гідрокортизону ацетату, отримані на хроматограмах *розчину порівняння* та хроматограмах *випробуваного розчину*, повинні бути спектрально чистими.

9. Піки бензокаїну, отримані на хроматограмах *розчину порівняння* та хроматограмах *випробуваного розчину* повинні бути спектрально чистими.

10. Піки бутамбену, отримані на хроматограмах *розчину порівняння* та хроматограмах *випробуваного розчину* повинні бути спектрально чистими.

Результати досліджень

Результати дослідження специфічності методик визначення справжності та кількісного вмісту гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену представлені на рисунках А1-А16, Б16-21.

Специфіка випробування підтверджується тим, що:

1. На хроматограмах *розчину плацебо*, яке не містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен, та *розчину плацебо*, яке не містить гідрокортизону ацетат, а також *розчину бланку (розчинника)* відсутні піки з часом утримування, що збігаються з часом утримування піку гідрокортизону ацетату на хроматограмах *випробуваного розчину* і хроматограм *розчину порівняння* (рисунок. А.1, А.3, А.7, А.11, А.12 і А.15). Тобто, компоненти плацебо, бензокаїн та бутамбен не заважають проведенню випробувань щодо визначення справжності та кількісного вмісту гідрокортизону ацетату.

2. На хроматограмах *розчину плацебо*, яке не містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен, і *розчину плацебо*, яке не містить бензокаїн, а також *розчину бланку (розчинника)* відсутні піки з часом утримування, що збігаються з часом утримування піку бензокаїну на хроматограмах *випробуваного розчину* і хроматограм *розчину порівняння* (рисунок. А.2, А.3, А.7, А.11, А.13 і А.15). Тобто, компоненти плацебо, гідрокортизону ацетат та бутамбен не заважають проведенню випробувань щодо визначення справжності та кількісного вмісту бензокаїну.

3. На хроматограмах *розчину плацебо*, яке не містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен, і *розчину плацебо*, яке не містить бутамбен, а також *розчину бланку (розчинника)* відсутні піки з часом утримування, що збігаються з часом утримування піку бутамбену на хроматограмах *випробуваного розчину* і хроматограм *розчину порівняння* (рисунок А.1, А.3, А.7, А.11, А.14 і А.15). Тобто, компоненти плацебо, гідрокортизону ацетат та бензокаїн не заважають проведенню випробувань щодо визначення справжності та кількісного вмісту бутамбену.

4. Часи утримування піку гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену на хроматограмах *випробуваного розчину* збігаються з часом утримування піку гідрокортизону ацетату, піку бензокаїну та піку бутамбену на хроматограмах *розчину порівняння* з точністю 1,09 %, 0,46 % та 1,00 % відповідно (рисунок А.3 та А.7).

5. УФ спектр гідрокортизону ацетату, отриманий у максимумі піку на хроматограмах *випробуваного розчину* (рисунок. Б.17) у діапазоні довжин хвиль від 200 нм до 400 нм, відповідає УФ спектру гідрокортизону ацетату, отриманому в максимумі піку на хроматограмах (рисунок Б.16) має максимум оптичного поглинання при довжині хвилі 244 ± 1 нм.

6. УФ спектр бензокаїну, отриманий у максимумі піку на хроматограмах *випробуваного розчину* (рисунок Б.19) у діапазоні довжин хвиль від 200 нм до 400 нм, відповідає УФ спектру бензокаїну, отриманому в максимумі піку на хроматограмах *розчину порівняння* (рисунок Б.18) і має максимуми оптичного поглинання при довжинах хвиль 220 ± 1 нм та 288 ± 1 нм.

7. УФ спектр бутамбену, отриманий у максимумі піку на хроматограмах *випробуваного розчину* (рисунок Б.21) у діапазоні довжин хвиль від 200 нм до 400 нм, відповідає УФ спектру бутамбену, отриманому в максимумі піку на хроматограмах *розчину порівняння* (рисунок Б.20) і має максимуми оптичного поглинання при довжинах хвиль 220 ± 1 нм та 288 ± 1 нм.

8. Пік гідрокортизону ацетату на хроматограмах розчину порівняння та пік гідрокортизону ацетату на хроматограмах *випробуваного розчину* спектрально чисті, оскільки показник "Peak purity index" перевищує мінімально допустиме значення ("Single point threshold"). Це свідчить про відсутність споріднених домішок з часом утримування, що збігаються з часом утримання піка гідрокортизону ацетату на хроматограмах *розчину порівняння* та *випробуваного розчину* (рисунок А.6 та А.10).

9. Пік бензокаїну на хроматограмах *розчину порівняння* та пік бензокаїну на хроматограмах *випробуваного розчину* спектрально чисті, оскільки показник "Peak purity index" перевищує мінімально допустиме значення ("Single point threshold"). Це свідчить про відсутність споріднених домішок з часом утримування, що збігаються з часом утримування піку бензокаїну на хроматограмах *розчину порівняння* та *випробуваного розчину* (рисунок А.5 та А.9).

10. Пік бутамбену на хроматограмах *розчину порівняння* та пік бутамбену на хроматограмах *випробуваного розчину* спектрально чисті, оскільки показник "Peak purity index" перевищує мінімально допустиме значення ("Single point threshold"). Це свідчить про відсутність споріднених домішок з часом утримування, що збігаються з часом утримання піку бутамбену на хроматограмах *розчину порівняння* та *випробуваного розчину* (рисунок А.4 та А.8).

2.2.2 Правильність, прецизійність, лінійність та діапазон застосування

Правильність характеризує ступінь відповідності між відомим вмістом визначається речовини в розчині та її вмістом у розчині, визначеним за даною методикою.

Збіжність характеризує *прецизійність* методики при її виконанні в тих самих умовах протягом невеликого проміжку часу. На цьому етапі збіжність вивчається на 9 модельних сумішах, що охоплюють діапазон застосування методики.

Лінійність – це здатність методики (не більше діапазону застосування) отримувати результати випробувань, прямо пропорційні кількості аналізованого речовини у зразку. У цьому має виходити лінійна залежність між взятим («справжнім») МВ та знайденим МН кількістю обумовленої речовини.

Діапазон застосування аналітичної методики – це інтервал між мінімальною та максимальною концентраціями (кількістю) аналізованої речовини у зразку (включаючи ці концентрації), для якого показано, що аналітична методика має необхідну правильність, збіжність та лінійність.

Допуск за вмістом гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену у препараті (В) становить для проміжної продукції (нерозфасований препарат) та для препарату протягом терміну зберігання від –10 % до +10 %.

Характеристики правильності, збіжності (прецизійності) та лінійності досліджували на модельних розчинах препарату з концентрацією гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену в межах від 80% до 120% від номінального вмісту цих речовин . що включає весь діапазон концентрацій цих речовин та становить мінімально допустимий діапазон застосування методики для кількісного визначення.

Критерії прийнятності розраховували для В = 10% для гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену.

Вимоги до лінійності

Залежність між взятим X_i і знайденим Y_i кількістю визначуваної речовини в галузі дії методики має бути лінійною. Повинне бути представлено регресійне рівняння:

$$(S_i/S_{st}) \times 100 = b \times (C_i/C_{st}) \times 100 + a,$$

$$Y_i = b \times X_i + a$$

Вимоги до вільного члена «a»

Вільний член (a) повинен бути статистично невідмінним від нуля.

Значення вільного члена (a) оцінюють за двома критеріями:

1. *Критерій статистичної незначущості* . Величина a статистично незначно відрізняється від нуля, якщо відхилення a вбирається у свій довірчий інтервал, т.к. е., для 9 модельних розчинів виконується нерівність:

$$a \leq \Delta_a = t(95\%, n - 2) \times S_a = 1,8946 \times S_a, (2.4)$$

де S_a – стандартне відхилення для відрізка, який відсікається на осі ординат (для розрахованої регресійної прямої) .

2. *Критерій практичної незначності* Якщо не виконується вимога до критерію статистичної незначності для вільного члена (a), використовують критерій практичної незначності Вклад вільного члена (a) в невизначеність результату аналізу повинен бути незначним для порівняння з максимально допустимою невизначеністю результатів. = 80% має виконуватися нерівність:

$$a \leq \frac{0,32 \times \Delta_{As} (\%) }{1 - (X_{\min} / 100)} = \frac{0,32 \times 3,20}{1 - (80 / 100)} = 5,12 (2.5)$$

Вимоги до залишкове стандартне відхилення (SDO)

Довірчий інтервал експериментальних точок щодо розрахованої регресійної прямої дорівнює добутку коефіцієнта Стюдента на залишкове стандартне відхилення (SDO) і не

повинен перевищувати максимально допустиму невизначеність методики аналізу ΔA_{smax} (число ступенів свободи точок прямої дорівнює $f = 9 - 2 = 7$):

де: b - тангенс кута нахилу для розрахованої регресійної прямої.

Вимоги до коефіцієнту кореляції (r)

$$SD_0 / b \leq \frac{\Delta_{As}}{t(95\%,7)} = \frac{3,20}{1,8946} = 1,69\%; \quad (2.6)$$

Досліджувані концентрації характеризуються стандартним відхиленням $RSDY = 13,693\%$, яке розраховують за такою формулою:

$$RSD_y = \sqrt{\frac{\sum (C_i - C_{cp})^2}{C_{cp}^2 \times (g - 1)}} \times 100\%, \quad (2.7)$$

де: C_i – концентрація i -ого розчину;

C_{CP} - середня концентрація розчинів;

g – число вибірок (кількість точок на прямій).

Вимоги до коефіцієнта кореляції розраховують за формулою:

$$r \geq \sqrt{1 - \left(\frac{SD_0}{RSD_Y} \right)^2}, \quad (2.8)$$

$$\sqrt{1 - \left(\frac{SD_0}{RSD_Y} \right)^2} = \sqrt{1 - \left(\frac{1,69}{13,693} \right)^2} = 0,99236;$$

$$r \geq 0,99236$$

Вимоги до збіжності (прецизійності)

Для оцінки *збіжності* використовують відносний довірчий інтервал, який має бути меншим за максимально допустиму невизначеність результатів аналізу: $\otimes Z \leq 3,20\%$ (при $V = 10,0\%$).

Вимоги до правильності

Для оцінки *правильності* визначають ступінь відповідності між відомим істинним значенням та значенням, отриманим за даною методикою. Правильність методики визначатиметься величиною відношення "знайденого" до "введеного" Z (%) з довірчим інтервалом. Методика повинна мати значної систематичної похибки (δ %), тобто, величина

$\delta\% = |Z - 100|$ має незначно відрізнятись від нуля.

Правильність оцінюють за двома критеріями:

1. *Критерій статистичної незначущості* . Величина δ (%) статистично не відрізняється від нуля, якщо відхилення \bar{Z} від 100 % не перевищує довірчий інтервал, тобто для 9 модельних розчинів має виконуватися нерівність:

$$\delta \leq \frac{\Delta_Z}{\sqrt{n}} = \frac{\Delta_Z}{3} \quad (2.9)$$

2. *Критерій практичної незначущості* . Якщо не виконується вимога до критерію статистичної незначущості, використовують критерій практичної незначущості порівняно з максимально допустимою невизначеністю аналізу: тобто для $B = 10\%$ має виконуватися нерівність:

$$\delta \leq 0,32 \times 3,2\% = 1,02\%.$$

Мінімально допустимий діапазон застосування методики кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену становить від 80 % до 120 % від їхнього номінального вмісту в препараті.

Вимоги до внутрішньолабораторної прецизійності

Для підтвердження внутрішньолабораторної прецизійності доцільно застосування підтверджуючого підходу – довірчий інтервал результатів (Z), отриманих у різних умовах, не повинен перевищувати максимально допустиму невизначеність методики аналізу $\max \Delta Z$. Для цього аналізують за методикою специфікації $n = 9$ зразків різних серій модельних розчинів у $m = 2$ різні дні. Дослідження проводять різні аналітики, на різному устаткуванні (різні хроматографи та різні хроматографічні колонки). Усі отримані результати повинні належати до однієї і тієї ж генеральної сукупності. Тому їм розраховують об'єднане середнє значення (Z_{intra}), стандартне відхилення ($SD_{Z-\text{intra}}$) і відносний довірчий інтервал (Δ_{intra} , %). Величина Δ_{intra} не повинна перевищувати $\max \Delta Z$:

$$\Delta_{\text{intra}} = t[(95\%, (n \times m - 1))] \times SD_{Z-\text{intra}} = 1,7396 \times SD_{Z-\text{intra}} \leq \max \Delta Z$$

2.2.3 Робастність

Робастність це здатність аналітичної методики не піддаватися впливу малих, які задаються (контрольованих) аналітиком змін в умовах виконання методики. Робастність є показником надійності методики під час її використання у зазначених умовах.

Підтвердженням робастності методики є виконання умов придатності хроматографічної системи. Досліджували такі зміни у хроматографічних умовах:

- програма градієнтного елюювання ($\pm 2\%$ органічної фази);
- Температура (± 5 °C);
- швидкість потоку рухомої фази ($\pm 0,1$ мл/хв).

Вимоги до стабільності розчинів

Позитивні результати точності та правильності, отримані при вивченні лінійності, є підтвердженням необхідної стабільності розчинів, оскільки час, витрачений при

приготуванні та хроматографуванні 10 розчинів (9 модельних розчинів та розчин порівняння), перевищує час аналізу 1-3 зразків, які зазвичай аналізують на практиці і становить

$9 \times 3 \times 20 + 5 \times 20 = 640$ хв (10 годин, 40 хвилин). Іншим доказом стабільності розчинів є практично незначна відмінність ($\leq \sqrt{2} \times \max \Delta A_s$) величин Z для першого і останнього розчинів, що хроматографуються.

У разі хроматографічного аналізу методом стандарту необхідно показати, що зміна протягом 24 годин площ цільового піку вбирається у величину RSD (%). Для цього хроматографують розчин порівняння і випробуваний розчин відразу після приготування через 12 годин і через 24 години. Відносне стандартне відхилення отриманих середніх площ цільового піку має перевищувати максимально допустиме відносне стандартне відхилення для 3-х хроматограмм (1,34 %).

Прогноз повної невизначеності методики

Для підтвердження коректності методики при відтворенні інших лабораторіях проведено прогноз повної невизначеності результатів аналізу. Повна невизначеність результатів аналізу (ΔA_s) включає невизначеність пробопідготовки (ΔSP) і невизначеність кінцевої аналітичної операції (ΔFAO):

$$\Delta_{AS} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2} \quad (2.10)$$

Критерій прийнятності

Прогнозована повна невизначеність результатів аналізу не повинна перевищувати максимально допустиму невизначеність результатів аналізу для допусків вмісту $\pm 10\%$ – $\max \Delta AS \leq 3,2\%$.

Рекомендується, щоб прогнозована невизначеність пробопідготовки була незначною, тобто виконувалася нерівність:

$$SP \leq 0,32 \times \Delta AS, \quad SP \leq 0,32 \times 3,20\% = 1,02\%.$$

Оцінка невизначеності пробопідготовки

Очікувана невизначеність пробопідготовки складається з невизначеності навішування препарату та навішування, взятої для приготування розчину порівняння, доведення до мітки розчинів та розведення. Розрахунок проведено з використанням підходу до допустимої невизначеності мірного посуду.

Розрахунок та величини невизначеності процедури пробопідготовки наведені у таблицях 2-3.

Невизначеність взяття навішення розраховують за такою формулою:

$$\Delta_m = \frac{0,2}{m} \cdot 100\%$$

де m – маса навішування, у міліграмах.

Таблиця 2.2 Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення гідрокортизону ацетату

Операція пробопідготовки	Параметр для розрахункової формули	Невизначеність (Δ), %
<i>Розчин порівняння</i>		
Взяття навішування СО гідрокортизону ацетату	$m_0 = 56$ мг	0,36%
Доведення до мітки об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100 мл	100	0,12%
Взяття аліквотного об'єму розчину піпеткою об'ємом 10 мл	10	0,25%
Доведення до мітки об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100 мл	100	0,12%
<i>Випробуваний розчин</i>		
Взяття навішування препарату	$m = 1000$ мг	0,02%
Доведення до мітки об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100 мл	100	0,12%

Сумарна невизначеність пробопідготовки ΔSP дорівнює:

$$\Delta SP = [0,362 + 0,122 + 0,252 + 0,122 + 0,022 + 0,122] / 2 = 0,49\% \leq 1,02\%$$

Таблиця 2.3 Розрахунок невизначеності пробопідготовки для методики кількісного визначення бензокаїну та бутамбену

Операція пробопідготовки	Параметр для розрахункової формули	Невизначеність (Δ), %
<i>Розчин порівняння</i>		
Взяття навішування СО бензокаїну або бутамбену	$m_0 = 100$ мг	0,20%
Доведення до мітки об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100 мл	100	0,12%
Взяття аліквотного об'єму розчину піпеткою об'ємом 10 мл	10	0,25%
Доведення до мітки об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100 мл	100	0,12%
<i>Випробуваний розчин</i>		
Взяття навішування препарату	$m = 1000$ мг	0,02%
Доведення до мітки об'єму розчину в мірній колбі місткістю 100 мл	100	0,12%

Сумарна невизначеність пробопідготовки ΔSP дорівнює:

$$\Delta SP = [0,202 + 0,122 + 0,252 + 0,122 + 0,022 + 0,122] / 2 = 0,38\% \leq 1,02\%$$

2.2.4 Результати дослідження правильності, прецизійності(збіжність і внутрішнілабораторної прецизійності), лінійності та діапазону застосування

Приготування модельних випробуваних розчинів

Характеристики правильності та прецизійності досліджували на модельних розчинах препарату з концентраціями гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену, які відповідають 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120% від номінальної концентрації кожної з цих діючих речовин у випробуваному розчині.

Валідацію методики кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену проводили на модельних розчинах препарату.

Приготування випробуваних розчинів. Приготували 100 г препарату (плацебо), який не містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен. Наважки плацебо близько 1,0 г помістили у мірні колби з темного скла місткістю 100 мл, додали 50 мл метанолу, додали точно відомий обсяг *вихідного розчину*, колби помістили у водяну баню з температурою (50 ± 5) °З перемішали до розплавлення плаце. Суміші охолодили до кімнатної температури, довели об'єм розчинів до мітки метанолом і перемішали. Мірні колби помістили в морозильну камеру з температурою від -10 до -15 °С і витримали протягом однієї години. Суміші відфільтрували через попередньо охолоджені до тієї ж температури фільтри "синя стрічка", відкинувши перші 2 мл фільтратів. Фільтрати нагріли до кімнатної температури, після чого відфільтрували через фторопластові мембранні фільтри з діаметром пір 0,45 мкм, відкинувши перші 2 мл фільтратів.

Вихідний розчин готували наступним чином: 56,15 мг ЗІ гідрокортизону ацетату USP RS (вміст основної речовини 99,3 %) помістили в мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, додали 100,05 мг ЗІ 0%), додали 99,92 мг СО бутамбену USP RS (вміст основної речовини 99,9 %), розчинили в 80 мл метанолу, після чого довели об'єм розчину до мітки тим же розчинником і перемішали (0,5576 мг/мл гідрокортизону ацетату, 1,005 мг/мл бензокаїну, 0,9982 мг/мл бутамбену).

Розчин СО гідрокортизону ацетату готували наступним чином: 56,12 мг СО гідрокортизону ацетату USP RS (вміст основної речовини 99,3 %) помістили в мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, розчинили в 80 мл метанолу, після чого довели об'єм розчину до мітки тим же розчином. перемішали (0,5573 мг/мл гідрокортизону ацетату).

Розчин СО бензокаїну готували наступним чином: 99,80 мг СО бензокаїну USP RS (вміст основної речовини 100,0 %) помістили в мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, розчинили в 80 мл метанолу, після чого довели об'єм розчину розчинником і перемішали (0,9980 мг/мл бензокаїну).

Розчин СО бутамбену готували наступним чином: 100,08 мг СО бутамбену USP RS (вміст основної речовини 99,9 %) помістили в мірну колбу з темного скла місткістю

100 мл, розчинили в 80 мл метанолу, після чого довели об'єм розчину до розчинником і перемішали (0,9998 мг/мл бутамбену).

Розчин порівняння 10,0 мл розчину СО гідрокортизону ацетату помістили в мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, додали 10,0 мл розчину СО бензокаїну додали 10,0 мл розчину бутамбену, довели об'єм розчину до мітки метанолом і перемішали (55,73 мкг/мл гідрокортизону ацетату, 99,80 мкг/мл бензокаїну, 99,98 мкг/мл бутамбену).

Дані щодо приготування та результатів аналізу модельних розчинів представлені в таблицях 2.4 – 2.6.

Таблиця 2.4 Приготування модельних розчинів та результати кількісного визначення гідрокортизону ацетату

№	Об'єм вихідного розчину, що використовується для приготування модельних розчинів, мл	Концентрація гідрокортизону ацетату модельному розчині, мкг/мл	Площа піка гідрокортизону ацетату (Sst = 1319185)	Введено, % норм.	Знайдено, % норм.
1	8,00	44,61	1038160	79,94	78,59
2	8,50	47,39	1129383	84,93	85,50
3	9,00	50,18	1185402	89,93	89,74
4	9,50	52,97	1255280	94,93	95,03
5	10,00	55,76	1315699	99,92	99,61
6	10,50	58,54	1380705	104,92	104,53
7	11,00	61,33	1422879	109,92	107,72
8	11,50	64,12	1540365	114,91	116,61
9	12,00	66,91	1600753	119,91	121,19

Таблиця 2.5 Приготування модельних розчинів та результати кількісного визначення бензокаїну

№	Об'єм вихідного розчину, що використовується для приготування модельних розчинів, мл	Концентрація бензокаїну в модельному розчині, мкг/мл	Площа піку бензокаїну (Sst = 6813430)	Закладено, % норм.	Знайдено, % норм.
1	8,00	80,04	5422658	80,04	79,43
2	8,50	85,04	5824400	85,04	85,31

3	9,00	90,05	6156104	90,05	90,17
4	9,50	95,05	6535847	95,05	95,73
5	10,00	100,05	6840423	100,05	100,20
6	10,50	105,05	7049415	105,05	103,26
7	11,00	110,06	7407527	110,06	108,50
8	11,50	115,06	7930437	115,06	116,16
9	12,00	120,06	8261286	120,06	121,01

Таблиця 2.6 Приготування модельних розчинів та результати кількісного визначення бутамбену

№	Об'єм вихідного розчину, що використовується для приготування модельних розчинів, мл	Концентрація бутамбену в модельному розчині, мкг/мл	Площа піку бутамбену (Sst = 5906712)	Зкладено, % норм.	Знайдено, % норм.
1	8,00	79,86	4712294	79,86	79,76
2	8,50	84,85	5067388	84,85	85,77
3	9,00	89,84	5347975	89,84	90,52
4	9,50	94,83	5578148	94,83	94,42
5	10,00	99,82	5936684	99,82	100,49
6	10,50	104,81	6118108	104,81	103,56
7	11,00	109,80	6425288	109,80	108,76
8	11,50	114,79	6890944	114,79	116,64
9	12,00	119,78	7025378	119,78	118,92

Правильність та збіжність

Правильність та збіжність методики була перевірена методом «введено-знайдено». Результати кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену в модельних розчинах у галузі аналітичних концентрацій, результати розрахунків метрологічних характеристик та їх оцінка представлені у таблицях 2.7 – 2.9.

З даних, наведених у табл. 7, 8 і 9, слід, що методика кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену характеризується достатньою правильною та збіжністю (прецизійністю) у всьому діапазоні концентрацій (від 80% до 120%) і є коректною.

Таблиця 2.7 Результати аналізу модельних розчинів препарату, що містять гідрокортизону ацетат у концентрації від 80 % до 120 % від номінального вмісту у випробуваному розчині препарату, їх статистична обробка та оцінка

№	Введено % від номінальної концентрації (Xi, факт., %)	Знайдено у % від номінальної концентрації (Yi, %)	Знайдено у % до введеного Zi = 100 • (Yi/Xi)
1	79,94	78,59	98,32
2	84,93	85,50	100,67
3	89,93	89,74	99,79
4	94,93	95,03	100,11
5	99,92	99,61	99,68
6	104,92	104,53	99,63
7	109,92	107,72	98,00
8	114,91	116,61	101,48
9	119,91	121,19	101,07
Середнє (Zcp)			99,86%
Відносне стандартне відхилення (RSDz)			1,1589%
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 9 - 1) \times RSDz = 1,8595 \times 1,1589\% =$			2,1549%
Критичне значення для збіжності результатів (As)			3,20%
Оцінка збіжності:			2,15% < 3,20%
Оцінка правильності:			
Систематична похибка TM = Zcp - 100 =			0,14%
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) статистична незначимість: $TM < \Delta z : \sqrt{9} = 2,1549\% : \sqrt{9} = 0,72\%$ Якщо не виконується 1), то $TM \leq \max TM$: 2) практична незначущість: $\delta \leq 0,32 \cdot 3,20\% = 1,02\%$			0,14% < 0,72% 0,14% < 1,02%
Загальний висновок про методику			КОРЕКТНА

Таблиця 2.8 Результати аналізу модельних розчинів препарату, що містять бензокаїн у концентрації від 80 % до 120 % від номінального вмісту у випробуваному розчині препарату, їх статистична обробка та оцінка

№	Введено % від номінальної концентрації (Xi, факт., %)	Знайдено у % від номінальної концентрації (Yi, %)	Знайдено у % до введеного Zi = 100 • (Yi/Xi)
1	80,04	79,43	99,24
2	85,04	85,31	100,32
3	90,05	90,17	100,14
4	95,05	95,73	100,72
5	100,05	100,20	100,15
6	105,05	103,26	98,29
7	110,06	108,50	98,59
8	115,06	116,16	100,96
9	120,06	121,01	100,79
Середнє (Zcp)			99,91%
Відносне стандартне відхилення (RSDz)			0,9776%
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 9 - 1) \times RSDz = 1,8595 \times 0,9776\% =$			1,8178%
Критичне значення для збіжності результатів (As)			3,20%
Оцінка збіжності:			1,82% < 3,20%
Оцінка правильності:			
Систематична похибка TM = Zcp - 100 =			0,09%
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) статистична незначимість: $t^{TM} < \Delta z : \sqrt{9} = 1,8178\% : \sqrt{9} = 0,61\%$ Якщо не виконується 1), то $t^{TM} \leq \max t^{TM}$: 2) практична незначущість: $\delta \leq 0,32 \cdot 3,20\% = 1,02\%$			0,09% < 0,61% 0,09% < 1,02%
Загальний висновок про методику			КОРЕКТНА

Таблиця 2.9 Результати аналізу модельних розчинів препарату, що містять бутамбен у концентрації від 80 % до 120 % від номінального вмісту у випробуваному розчині препарату, їх статистична обробка та оцінка

№	Введено % від номінальної концентрації (X _i , факт., %)	Знайдено у % від номінальної концентрації (Y _i , %)	Знайдено у % до введеного Z _i = 100 • (Y _i /X _i)
1	79,86	79,76	99,88
2	84,85	85,77	101,09
3	89,84	90,52	100,76
4	94,83	94,42	99,57
5	99,82	100,49	100,67
6	104,81	103,56	98,80
7	109,80	108,76	99,05
8	114,79	116,64	101,61
9	119,78	118,92	99,27
Середнє (Z_{ср})			100,08%
Відносне стандартне відхилення (RSDz)			0,9874%
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 9 - 1) \times RSDz = 1,8595 \times 0,9874\% =$			1,8360%
Критичне значення для збіжності результатів (A _s)			3,20%
Оцінка збіжності:			1,84% < 3,20%
Оцінка правильності:			
Систематична похибка TM = Z _{ср} - 100 =			0,08%
Критерій незначущості систематичної похибки:			
1) статистична незначимість: $TM < \Delta z : \sqrt{9} = 1,8360\% : \sqrt{9} = 0,61\%$			0,08% < 0,61%
Якщо не виконується 1), то $TM \leq \max TM$:			
2) практична незначущість: $\delta \leq 0,32 \cdot 3,20\% = 1,02\%$			0,08% < 1,02%
Загальний висновок про методику			КОРЕКТНА

Лінійність

Характеристику «Лінійність» досліджували в діапазоні концентрацій гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену від 80 до 120% по відношенню до номінальної концентрації.

Графіки лінійної залежності представлені на рисунку. 22, 23 та 24, а результати розрахунку параметрів лінійної залежності – у таблицях 10, 11 та 12.

Як впливає з представлених у таблицях 2.10 – 2.12 даних, вимоги до параметрів лінійної залежності виконуються, тобто, лінійність методики кількісного визначення ацетату, бензокаїну та бутамбену підтверджується в діапазоні концентрацій від 80% до 120% від їх номінальної концентрації у випробуваному.

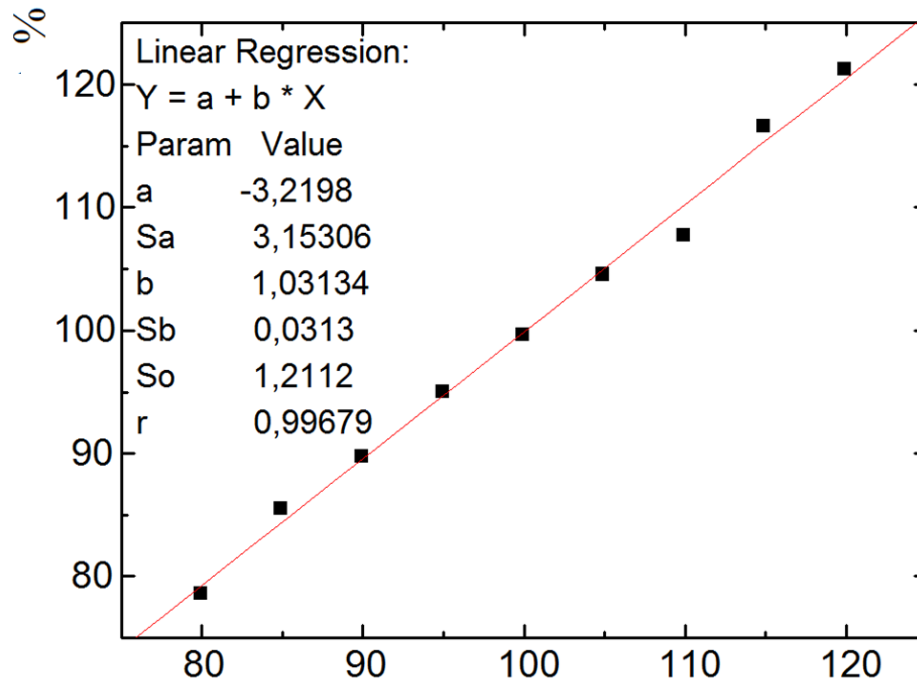


Рисунок 2.1 Лінійна залежність знайденої концентрації гідрокортизону ацетату від його введеної концентрації у нормалізованих координатах(за вісью оХ – введено, за оУ – знайдено).

Таблиця 2.10 Метрологічні характеристики лінійної залежності знайденої концентрації гідрокортизону ацетату від його введеної концентрації

Параметри	Значення	Критерій 1	Критерій 2	Висновок
b	1,03134			
Sb	0,0313			
α	- 3,2198	$\leq S\alpha \times 1,8946 = 5,97 $	$\leq 5,12 $	Витримується за 1 та 2 критеріями
S α	3,15306			
SD0	1,2112			
SD0/b	1,1744	$\leq 1,69 $		Виконується
r	0,99679	$> 0,99236 $		Виконується

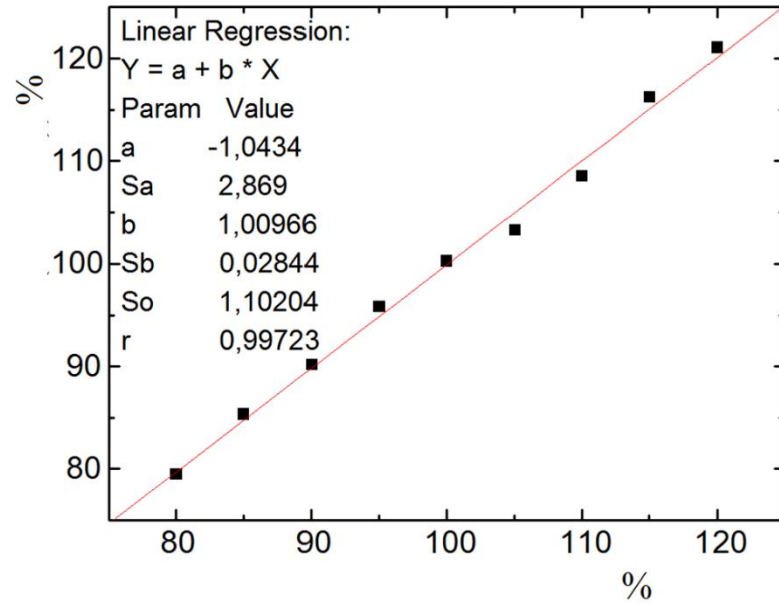


Рисунок 2.2 Лінійна залежність знайденої концентрації бензокаїну від його введеної концентрації у нормалізованих координатах(за вісю оХ – введено, за оУ – знайдено).

Таблиця 2.11 Метрологічні характеристики лінійної залежності знайденої концентрації бензокаїну від його введеної концентрації

Параметри	Значення	Критерій 1	Критерій 2	Висновок
b	1,00966			
Sb	0,02844			
α	- 1,0434	$\leq S\alpha \times 1,8946 = 5,54 $	$\leq 5,12 $	Витримується за 1 та 2 критеріями
S α	2,869			
SD0	1,10204			
SD0/b	1,09150	$\leq 1,69 $		Виконується
r	0,99723	$> 0,99236 $		Виконується

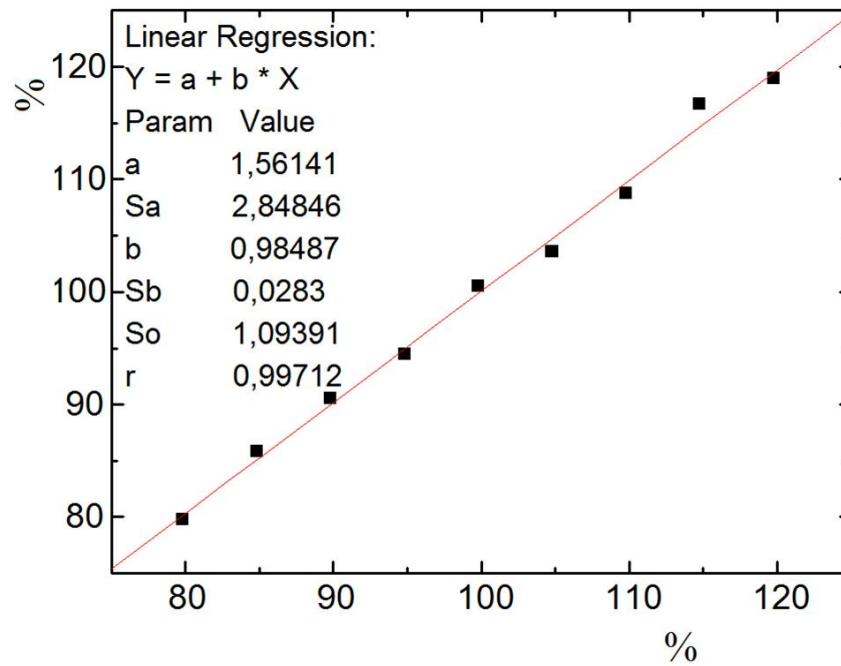


Рисунок 2.3 Лінійна залежність знайденої концентрації бутамбену від його введеної концентрації у нормалізованих координатах(за вісью оХ – введено, за оУ – знайдено).

Таблиця 2.12 Метрологічні характеристики лінійної залежності знайденої концентрації бутамбену від його введеної концентрації

Параметри	Значення	Критерій 1	Критерій 2	Висновок
b	0,98487			
Sb	0,0283			
α	1,56141	$\leq S\alpha \times 1,8946 = 5,40 $	$\leq 5,12 $	Витримується за 1 та 2 критеріями
S α	2,84846			
SD0	1,09391			
SD0/b	1,11072	$\leq 1,69 $		Виконується
r	0,99712	$> 0,99236 $		Виконується

Для підтвердження внутрішньолабораторної прецизійності серія модельних розчинів, приготовлена іншого дня іншим аналітиком, була прохроматографована на іншому хроматографі з використанням іншої хроматографічної колонки.

Отримані дані представлені у табл. 12-20.

Як видно з даних, представлених у таблицях 12-20, вимоги до внутрішньолабораторної прецизійності для методики кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену виконуються.

Приготування випробуваних розчинів. Приготували 100 г препарату (плацебо), який не містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен. Наважки плацебо близько 1,0 г помістили у мірні колби з темного скла місткістю 100 мл, додали 50 мл метанолу, додали точно відомий обсяг *вихідного розчину*, колби помістили у водяну баню з температурою (50 ± 5) °З перемішали до розплавлення плаце. Суміші охолодили до кімнатної температури, довели об'єм розчинів до мітки метанолом і перемішали. Мірні колби помістили в морозильну камеру з температурою від -10 до -15 °С і витримали протягом однієї години. Суміші відфільтрували через попередньо охолоджені до тієї ж температури фільтри "синя стрічка", відкинувши перші 2 мл фільтратів. Фільтрати нагріли до кімнатної температури, після чого відфільтрували через фторопластові мембранні фільтри з діаметром пір 0,45 мкм, відкинувши перші 2 мл фільтрату.

Вихідний розчин готували наступним чином: 55,80 мг СО гідрокортизону ацетату USP RS 0%), додали 99,15 мг СО бутамбену USP RS (вміст основної речовини 99,9 %), розчинили в 80 мл метанолу, після чого довели об'єм розчину до мітки тим же розчинником і перемішали (0,5541 мг/мл гідрокортизону ацетату, 1,0150 мг/мл бензокаїну, 0,9905 мг/мл бутамбену).

Розчин СО гідрокортизону ацетату готували наступним чином: 55,57 мг СО гідрокортизону ацетату USP RS (вміст основної речовини 99,3 %) помістили в мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, розчинили в 80 мл метанолу, після чого довели об'єм розчину до мітки тим же розчином. перемішали (0,5518 мг/мл гідрокортизону ацетату).

Розчин СО бензокаїну готували наступним чином: 100,40 мг СО бензокаїну USP RS (вміст основної речовини 100,0 %) помістили в мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, розчинили в 80 мл метанолу, після чого довели об'єм розчину розчинником і перемішали (1,0040 мг/мл бензокаїну).

Розчин СО бутамбену готували наступним чином: 98,90 мг СО бутамбену USP RS (вміст основної речовини 99,9 %) помістили в мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, розчинили в 80 мл метанолу, після чого довели об'єм розчину до розчинником і перемішали (0,9880 мг/мл бутамбену).

Розчин порівняння 10,0 мл *розчину СО гідрокортизону ацетату* помістили в мірну колбу з темного скла місткістю 100 мл, додали 10,0 мл *розчину СО бензокаїну* додали 10,0 мл *розчину бутамбену*, довели об'єм розчину до мітки метанолом і перемішали (55,18 мкг/мл гідрокортизону ацетату, 100,40 мкг/мл бензокаїну, 98,80 мкг/мл бутамбену).

Таблиця 2.13 Приготування модельних розчинів та результати кількісного визначення гідрокортизону ацетату, отримані при вивченні внутрішньолабораторної прецизійності та їх статистична обробка

№	Об'єм вихідного розчину, що використовується для приготування модельних розчинів, мл	Концентрація гідрокортизону ацетату в модельному розчині, мкг/мл	Площа піка гідрокортизону ацетату (Sst = 1221734)	Введено зміст, % норм.	Знайдено зміст, % норм.
1	8,00	44,33	989597	79,44	80,10
2	8,50	47,10	1046302	84,41	84,69
3	9,00	49,87	1094284	89,37	88,57
4	9,50	52,64	1148320	94,34	92,95
5	10,00	55,41	1204422	99,30	97,49
6	10,50	58,18	1299776	104,27	105,21
7	11,00	60,95	1327032	109,23	107,41
8	11,50	63,72	1409886	114,20	114,12
9	12,00	66,49	1497102	119,16	121,18

Таблиця 2.14 Приготування модельних розчинів та результати кількісного визначення бензокаїну, отримані щодо внутрішньолабораторної прецизійності та їх статистична обробка

№	Об'єм вихідного розчину, що використовується для приготування модельних розчинів, мл	Концентрація бензокаїну в модельному розчині, мкг/мл	Площа піку бензокаїну (Sst = 6331416)	Закладено зміст, % норм.	Знайдено зміст, % норм.
1	8,00	81,20	5205772	81,20	82,55
2	8,50	86,28	5474147	86,28	86,81
3	9,00	91,35	5746213	91,35	91,12
4	9,50	96,43	6054138	96,43	96,00
5	10,00	101,50	6330730	101,50	100,39
6	10,50	106,58	6817357	106,58	108,11
7	11,00	111,65	6889175	111,65	109,24
8	11,50	116,73	7393431	116,73	117,24

9	12,00	121,80	7839115	121,80	124,31
---	-------	--------	---------	--------	--------

Таблиця 2.15 Приготування модельних розчинів та результати кількісного визначення бутамбену, отримані щодо внутрішньолабораторної прецизійності та їх статистична обробка

№	Об'єм вихідного розчину, що використовується для приготування модельних розчинів, мл	Концентрація бутамбену в модельному розчині, мкг/мл	Площа піку бутамбену (Sst = 5470961)	Закладено зміст, % норм.	Знайдено зміст, % норм.
1	8,00	79,24	4318662	79,24	77,99
2	8,50	84,19	4753847	84,19	85,85
3	9,00	89,15	4917526	89,15	88,81
4	9,50	94,10	5197183	94,10	93,86
5	10,00	99,05	5504740	99,05	99,41
6	10,50	104,00	5927964	104,00	107,05
7	11,00	108,96	5985480	108,96	108,09
8	11,50	113,91	6257781	113,91	113,01
9	12,00	118,86	6569131	118,86	118,63

Таблиця 2.16 Результати аналізу модельних розчинів препарату, що містять гідрокортизону ацетат у концентрації від 80 % до 120 % від номінального вмісту у випробуваному розчині препарату, отримані при вивченні внутрішньолабораторної прецизійності, їх статистична обробка та оцінка

№	Введено % від номінальної концентрації (Xi, факт., %)	Знайдено у % від номінальної концентрації (Yi, %)	Знайдено у % до введеного Zi = 100 • (Yi/Xi)
1	79,44	80,10	100,83
2	84,41	84,69	100,34
3	89,37	88,57	99,11
4	94,34	92,95	98,53
5	99,30	97,49	98,18
6	104,27	105,21	100,90
7	109,23	107,41	98,34
8	114,20	114,12	99,93

9	119,16	121,18	101,70
Середнє (Z_{ср})			99,76%
Відносне стандартне відхилення (RSDz)			1,2795%
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 9 - 1) \times RSDz = 1,8595 \times 1,2795\% =$			2,3791%
Критичне значення для збіжності результатів (A _s)			3,20%
Оцінка збіжності:			2,38% < 3,20%
Оцінка правильності:			
Систематична похибка TM = Z _{ср} - 100 =			0,24%
Критерій незначущості систематичної похибки:			
1) статистична незначимість: $t^{TM} < \Delta z : \sqrt{9} = 2,3791\% : \sqrt{9} = 0,79\%$			0,24% < 0,79%
Якщо не виконується 1), то $t^{TM} \leq \max t^{TM}$:			
2) практична незначущість: $\delta \leq 0,32 \cdot 3,20\% = 1,02\%$			0,24% < 1,02%
Загальний висновок про методику			КОРЕКТНА

Таблиця 2.17 Результати аналізу модельних розчинів препарату, що містять бензокаїн у концентрації від 80 % до 120 % від номінального вмісту у випробуваному розчині препарату, отримані при вивченні внутрішньолабораторної прецизійності, їх статистична обробка та оцінка

№	Введено % від номінальної концентрації (X _i , факт., %)	Знайдено у % від номінальної концентрації (Y _i , %)	Знайдено у % до введеного Z _i = 100 • (Y _i /X _i)
1	81,20	82,55	101,66
2	86,28	86,81	100,62
3	91,35	91,12	99,75
4	96,43	96,00	99,56
5	101,50	100,39	98,91
6	106,58	108,11	101,44
7	111,65	109,24	97,85
8	116,73	117,24	100,44
9	121,80	124,31	102,06
Середнє (Z_{ср})			100,25%
Відносне стандартне відхилення (RSDz)			1,3731%

Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 9 - 1) \times RSDz = 1,8595 \times 1,3731\% =$	2,5533%
Критичне значення для збіжності результатів (A_s)	3,20%
Оцінка збіжності:	2,55% < 3,20%
Оцінка правильності:	
Систематична похибка TM = $ Z_{cp} - 100 =$	0,25%
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) статистична незначимість: $TM < \Delta z : \sqrt{9} = 2,5533\% : \sqrt{9} = 0,85\%$ Якщо не виконується 1), то $TM \leq \max TM$:	0,25% < 0,85%
2) практична незначущість: $\delta \leq 0,32 \cdot 3,20\% = 1,02\%$	0,25% < 1,02%
Загальний висновок про методику	КОРЕКТНА

Таблиця 2.18 Результати аналізу модельних розчинів препарату, що містять бутамбен у концентрації від 80 % до 120 % від номінального вмісту у випробуваному розчині препарату, отримані при вивченні внутрішньолабораторної прецизійності, їх статистична обробка та оцінка

№	Введено % від номінальної концентрації (Xi, факт., %)	Знайдено у % від номінальної концентрації (Yi, %)	Знайдено у % до введеного Zi = 100 • (Yi/Xi)
1	79,24	77,99	98,42
2	84,19	85,85	101,97
3	89,15	88,81	99,62
4	94,10	93,86	99,74
5	99,05	99,41	100,36
6	104,00	107,05	102,93
7	108,96	108,09	99,21
8	113,91	113,01	99,21
9	118,86	118,63	99,81
Середнє (Zcp)			100,14%
Відносне стандартне відхилення (RSDz)			1,4303%
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 9 - 1) \times RSDz = 1,8595 \times 1,4303\% =$			2,6596%

Критичне значення для збіжності результатів (A_s)	3,20%
Оцінка збіжності:	2,66% < 3,20%
Оцінка правильності:	
Систематична похибка TM = $ Z_{cp} - 100 =$	0,14%
Критерій незначущості систематичної похибки: 1) статистична незначимість: $TM < \Delta z : \sqrt{9} = 2,6596\% : \sqrt{9} = 0,89\%$ Якщо не виконується 1), то $TM \leq \max TM$: 2) практична незначущість: $\delta \leq 0,32 \cdot 3,20\% = 1,02\%$	0,14% < 0,89% 0,14% < 1,02%
Загальний висновок про методику	КОРЕКТНА

З даних, наведених у таблицях 2.19 – 2.21, випливає, що методика кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену характеризується достатньою внутрішньолабораторною прецизійністю у всьому діапазоні концентрацій (від 80 % до 120 %) та є коректною.

Таблиця 2.19 Розрахунок та оцінка параметрів внутрішньолабораторної прецизійності для методики кількісного визначення гідрокортизону ацетату

№ модельного розчину	Величини Z_i	
	Досвід №1	Досвід №2
1	98,32	100,83
2	100,67	100,34
3	99,79	99,11
4	100,11	98,53
5	99,68	98,18
6	99,63	100,90
7	98,00	98,34
8	101,48	99,93
9	101,07	101,70
Середнє	99,86%	99,76%
Об'єднане середнє \bar{Z}_{intra}	99,81%	
SDz	1,1853%	
Δ_{intra}	1,7396 × 1,1853 % = 2,06 % ≤ 3,20 %	

Таблиця 2.20 Розрахунок та оцінка параметрів внутрішньолабораторної прецизійності для методики кількісного визначення бензокаїну

№ модельного розчину	Величини Z_i	
	Досвід №1	Досвід №2
1	99,24	101,66
2	100,32	100,62
3	100,14	99,75
4	100,72	99,56
5	100,15	98,91
6	98,29	101,44
7	98,59	97,85
8	100,96	100,44
9	100,79	102,06
Середнє	99,91%	100,25%
Об'єднане середнє \bar{Z}_{intra}	100,09%	
SDz	1,1696%	
Δ_{intra}	$1,7396 \times 1,1696 \% = 2,03 \% \leq 3,20 \%$	

Таблиця 2.21 Розрахунок та оцінка параметрів внутрішньолабораторної прецизійності для методики кількісного визначення бутамбену

№ модельного розчину	Величини Z_i	
	Досвід №1	Досвід №2
1	99,88	98,42
2	101,09	101,97
3	100,76	99,62
4	99,57	99,74
5	100,67	100,36
6	98,80	102,93
7	99,05	99,21
8	101,61	99,21
9	99,27	99,81
Середнє	100,08%	100,14%
Об'єднане середнє \bar{Z}_{intra}	100,11%	

SDz	1,1931%
Δ_{intra}	$1,7396 \times 1,1931 \% = 2,08 \% \leq 3,20 \%$

Результати дослідження робітності

Підтвердженням робітності методики є виконання умов придатності хроматографічної системи. У таблиці 2.21 наведено хроматографічні умови, які досліджували щодо їхнього впливу на виконання умов придатності хроматографічної системи.

Таблиця 2.21 – Хроматографічні умови, що використовуються при дослідженні робастності аналітичної методики кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену

№	склад ПФ, % (Ацетонітрил для хроматографії – вода для хроматографії)	t, °C	V, мл/хв
1	45:55	40	1,0
2	43:57	40	1,0
3	47:53	40	1,0
4	45:55	35	1,0
5	45:55	45	1,0
6	45:55	40	0,9
7	45:55	40	1,1
10	Інша хроматографічна колонка (внутрішньолабораторна прецизійність)		

Відповідність умовам придатності хроматографічної системи при використанні іншої хроматографічної колонки, що застосовується при вивченні внутрішньолабораторної прецизійності, є додатковим параметром робастності методики. Для розрахунку придатності хроматографічної системи щодо робастності був використаний розчин порівняння.

Результати досліджень, що характеризують робастність методики визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену, представлені в таблицях 2.23 – 2.25. Таблиця 2.23 Умови, що характеризують придатність хроматографічної системи (ХС) при дослідженні робастності аналітичної методики кількісного визначення гідрокортизону ацетату

№	Ефективність ХС для піка гідрокортизону ацетату	Коефіцієнт симетрії піка гідрокортизону ацетату (від 0,8 до 1,5)	RSD площ піку гідрокортизону ацетату, % ($\leq 1,34\%$ для трьох хроматограм; $\leq 2,37\%$ для п'яти хроматограм)
---	--	---	--

	(Не менше 10000 ТТ)		
1	16312	1,102	0,359
2	16255	1,087	0,251
3	14018	1,132	0,071
4	15884	1,099	0,417
5	16591	1,095	0,524
6	17094	1,091	0,546
7	15593	1,098	0,882
8	16563	0,932	1,216

Таблиця 2.24 Умови, що характеризують придатність хроматографічної системи (ХС) при дослідженні робастності аналітичної методики кількісного визначення бензокаїну

№	Ефективність ХС для піка бензокаїну (Не менше 8000 ТТ)	Коефіцієнт симетрії піку бензокаїну (від 0,8 до 1,5)	RSD площ піку бензокаїну , % ($\leq 1,34$ % для трьох хроматограм; $\leq 2,37$ % для п'яти хроматограм)
1	14778	1,154	0,355
2	14563	1,138	0,252
3	13045	1,181	0,106
4	14671	1,153	0,481
5	14466	1,168	0,558
6	15096	1,148	0,217
7	14035	1,163	0,332
8	16903	0,984	1,248

Таблиця 2.25 Умови, що характеризують придатність хроматографічної системи при дослідженні робастності аналітичної методики кількісного визначення бутамбену

№	Ефективність ХС для піка бутамбена (Не менше 12000 ТТ)	Коефіцієнт симетрії піку бутамбену (від 0,8 до 1,5)	RSD площ піку бутамбену , % ($\leq 1,34$ % для трьох хроматограм; $\leq 2,37$ % для п'яти хроматограм)
1	20302	1,041	0,358
2	19832	1,038	0,270
3	18712	1,060	0,042
4	19970	1,047	0,481
5	19948	1,047	0,555

6	20310	1,043	0,165
7	19670	1,047	0,409
8	19089	0,905	1,231

При невеликих змінах хроматографічних умов вимоги до придатності дотримуються (таблиця 2.22-2.24), тобто методика є робастною.

Стабільність розчин

Розрахунок параметрів стабільності модельних розчинів представлений у таблиці 2.26.

Таблиця 2.26 Розрахунок параметрів стабільності модельних розчинів

	Zfirst	Zlast	\Delta Zi	$\leq \sqrt{2} \times \max \Delta A_s$	Висновок
Гідрокортизону ацетат	98,32%	101,07%	2,75%	$\leq 4,53\%$	Виконується
Гідрокортизону ацетат (внутрішньолабораторна прецизійність – ВЛП)	100,83%	101,70%	0,87%	$\leq 4,53\%$	Виконується
Бензокаїн	99,24%	100,79%	1,55%	$\leq 4,53\%$	Виконується
Бензокаїн (ВЛП)	101,66%	102,06%	0,40%	$\leq 4,53\%$	Виконується
Бутамбен	99,88%	99,27%	0,61%	$\leq 4,53\%$	Виконується
Бутамбен (ВЛП)	98,42%	99,81%	1,39%	$\leq 4,53\%$	Виконується

Як очевидно з даних таблиці 2.26, розчини стабільні протягом всього часу аналізу, оскільки ΔZ для гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену не перевищують критичне значення $\leq \sqrt{2} \times \max \Delta A_s = 4,53\%$.

Для підтвердження стабільності розчинів розчин порівняння і випробуваний розчин хроматографували відразу після приготування через 6 годин, 12 годин і 24 години. У таблиці 2.27 наведені площі піку гідрокортизону ацетату, піку бензокаїну та піку бутамбену на отриманих хроматограмах.

Таблиця 2.27 Середні значення площ піку гідрокортизону ацетату, піку бензокаїну та піку бутамбену, отримані у процесі вивчення стабільності розчинів

Час, година	Вихідно	Через 12 год	Через 24 год	Середнє	RSDt, %	RSDmax, %
Гідрокортизону ацетат						
Розчин порівняння	1379774	1385368	1384910	1383351	0,225	1,34

Випробуваний розчин	1327752	1332802	1338637	1333064	0,409	1,34
Бензокаїн						
Розчин порівняння	7094644	7116188	7111693	7107508	0,160	1,34
Випробуваний розчин	7208930	7212204	7224881	7215338	0,117	1,34
Бутамбен						
Розчин порівняння	6141868	6155696	6148376	6148647	0,113	1,34
Випробуваний розчин	6385089	6385344	6391277	6387237	0,055	1,34

Як очевидно з даних таблиці 2.27 площі піків гідрокортизону ацетату, бензокаїну і бутамбену через 12 год і 24 год змінилися незначно, що свідчить про стабільність розчинів. Відносні стандартні відхилення площ піків гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену на хроматограмах розчину порівняння та випробуваного розчину не перевищують максимально допустимі відносні стандартні відхилення для трьох хроматограм (1,34 %). Отже, можна зробити висновок, що розчини залишаються стабільними протягом 24 годин після приготування.

Оцінка результатів

Методика характеризується достатньою збіжністю, так як знайдене значення відносного довірчого інтервалу 2,15% для гідрокортизону ацетату, 1,82% для бензокаїну та 1,84% для бутамбену менше критичного значення для збіжності результатів 3,20% (табл. 8, 9 та 10).

Методика характеризується достатньою правильністю, оскільки виконується критерій статистичної незначущості систематичної похибки методики. Систематична похибка методики визначення гідрокортизону ацетату дорівнює 0,14 %, бензокаїну 0,09 %, а бутамбену 0,08 %, що менше за критерії прийнятності 0,72 %, 0,61 % та 0,61 % відповідно (табл. 8, 9 та 10).

Високі значення коефіцієнтів кореляції ($r = 0,99679$ для гідрокортизону ацетату, $r = 0,99723$ для бензокаїну і $r = 0,99712$ для бутамбену задовольняє вимогам критерію прийнятності $r = 0,99236$, що підтверджує в області концентрацій від 80% до 120% щодо їх номінального вмісту у випробуваному розчині препарату.

Виконуються вимоги до інших параметрів лінійної залежності:

- для гідрокортизону ацетату:
 - a за 1 та 2 критеріями: $a = |-3,22| < 1,8946 \times Sa = |5,97|$; $a = |-3,22| < |5,12|$;
 - $SD0/b$: $SD0/b = 1,174 < |1,69|$;
- для бензокаїну:

- a за 1 та 2 критеріями: $a = |-1,04| < 1,8946 \times Sa = |5,54|$; $a = |-1,04| < |5,12|$;
- $SD0/b$: $SD0/b = 1,092 < |1,69|$;

• для бутамбену:

- a за 1 та 2 критеріями: $a = |1,56| < 1,8946 \times Sa = |5,40|$; $a = |1,56| < |5,12|$;
- $SD0/b$: $SD0/b = 1,111 < |1,69|$.

Виконуються вимоги до внутрішньолабораторної прецизійності, оскільки об'єднані довірчі інтервали двох вибірок 2,06 % для гідрокортизону ацетату, 2,03 % для бензокаїну та 2,08 % для бутамбену не перевищують максимально допустимі значення: 3,20 % (табл. 1 та 21).

Виконуються вимоги до робастності методики (табл. 22-25), а також до стабільності розчинів (табл. 26 та 27).

Прогноз повної невизначеності методики

Повна невизначеність результатів аналізу (Δ_{AS}) включає невизначеність пробопідготовки (Δ_{SP}) і невизначеність кінцевої аналітичної операції (Δ_{FAO}):

$$\Delta_{AS} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2}$$

Сумарна невизначеність пробопідготовки Δ_{SP} для гідрокортизону ацетату дорівнює:

$$\Delta_{SP} = [0,362 + 0,122 + 0,252 + 0,122 + 0,022 + 0,122]^{1/2} = 0,49\% \leq 1,02\%$$

Сумарна невизначеність пробопідготовки Δ_{SP} для бензокаїну та бутамбену дорівнює:

$$\Delta_{SP} = [0,202 + 0,122 + 0,252 + 0,122 + 0,022 + 0,122]^{1/2} = 0,38\% \leq 1,02\%$$

Невизначеність пробопідготовки незначна порівняно з повною невизначеністю результатів аналізу, тобто виконується співвідношення $\Delta_{SP} = 0,64\% < 1,02\%$ для гідрокортизону ацетату; $0,57\% < 1,02\%$ для бензокаїну та бутамбену в готовому препараті.

Вимоги до максимально допустимого відносного стандартного відхилення для серії паралельних інжекцій RSD_{max} (%) Виконуються. Відносні стандартні відхилення, розраховані для площ піку гідрокортизону ацетату, площ піку бензокаїну та площ піку бутамбену, отримані за трьома хроматограмами при хроматографуванні модельних розчинів і розчину порівняння, не перевищують 1,34 %.

Невизначеність кінцевої аналітичної операції з кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену розраховували для *випробуваного розчину* і *розчину порівняння* за даними, наведеними в таблицях 28, 29 і 30 Відносні стандартні відхилення (RSD) розраховували для середнього з 5 результатів.

Таблиця 2.28 Відносні стандартні відхилення площ піку гідрокортизону ацетату (S)

	<i>S0</i> *	<i>SI</i> **
	1323234	1285886
	1318367	1290147
	1324769	1292224
	1315913	1288430
	1313641	1286341
RSD , %	0,359	0,205
RSDmax , % (n = 5, B = 10%)	2,37	
<p>* <i>S0</i> – площі піку гідрокортизону ацетату, отримані за хроматограмами розчину порівняння .</p> <p>** <i>SI</i> – площі піку гідрокортизону ацетату, отримані за хроматограмами випробуваного розчину .</p>		

Таблиця 2.29 - Відносні стандартні відхилення площ піку бензокаїну (S)

	<i>S0</i> *	<i>SI</i> **
	6835604	7024033
	6810318	7040572
	6840104	7025871
	6796744	7036457
	6784382	7020872
RSD , %	0,355	0,121
RSDmax , % (n = 5, B = 10%)	2,37	
<p>* <i>S0</i> – площі піку бензокаїну, отримані за хроматограмами розчину порівняння .</p> <p>** <i>SI</i> – площі піку бензокаїну, отримані за хроматограмами випробуваного розчину .</p>		

Таблиця 2.30 - Відносні стандартні відхилення площ піку бутамбену (S)

	<i>S0</i> *	<i>SI</i> **
	5927224	6234066
	5904699	6249970
	5928895	6232523
	5891026	6238676
	5881716	6232610
RSD , %	0,358	0,118

RSDmax % (n = 5, B = 10%)	2,37
* <i>S0</i> – площі піку бутамбену, одержані за хроматограмами розчину порівняння .	
** <i>SI</i> – площі піку бутамбену, отримані за хроматограмами випробуваного розчину .	

Невизначеність кінцевої аналітичної операції розраховували за формулами:
для гідрокортизону ацетату:

$$\Delta_{FAO}^{st} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(95\%, n_0 - 1) \times RSD = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2,1318 \times 0,359 = 0,342 \%$$

$$\Delta_{FAO}^{smp} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(95\%, n_0 - 1) \times RSD = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2,1318 \times 0,205 = 0,195\%$$

для бензокаїну:

$$\Delta_{FAO}^{st} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(95\%, n_0 - 1) \times RSD = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2,1318 \times 0,355 = 0,338 \%$$

$$\Delta_{FAO}^{smp} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(95\%, n_0 - 1) \times RSD = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2,1318 \times 0,121 = 0,115\%$$

для бутамбену:

$$\Delta_{FAO}^{st} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(95\%, n_0 - 1) \times RSD = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2,1318 \times 0,358 = 0,341 \%$$

$$\Delta_{FAO}^{smp} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(95\%, n_0 - 1) \times RSD = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2,1318 \times 0,118 = 0,112\%$$

Сумарна невизначеність кінцевої аналітичної операції при кількісному визначенні гідрокортизону ацетату дорівнює:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{(\Delta_{FAO}^{st})^2 + (\Delta_{FAO}^{smp})^2} = \sqrt{0,342^2 + 0,195^2} = 0,39 \%$$

Сумарна невизначеність кінцевої аналітичної операції при кількісному визначенні бензокаїну дорівнює:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{(\Delta_{FAO}^{st})^2 + (\Delta_{FAO}^{smp})^2} = \sqrt{0,338^2 + 0,115^2} = 0,36 \%$$

Сумарна невизначеність кінцевої аналітичної операції при кількісному визначенні бутамбену дорівнює:

$$\Delta_{FAO} = \sqrt{(\Delta_{FAO}^{st})^2 + (\Delta_{FAO}^{smp})^2} = \sqrt{0,341^2 + 0,112^2} = 0,36 \%$$

Сумарна невизначеність аналізу при кількісному визначенні гідрокортизону ацетату дорівнює:

$$\Delta_{As}, \% = \sqrt{0,49^2 + 0,39^2} = 0,63\% \leq \Delta_{Asmax} = 3,20\%$$

Сумарна невизначеність аналізу при кількісному визначенні бензокаїну дорівнює:

$$\Delta_{As}, \% = \sqrt{0,38^2 + 0,36^2} = 0,54\% \leq \Delta_{Asmax} = 3,20\%$$

Сумарна невизначеність аналізу при кількісному визначенні бутамбену дорівнює:

$$\Delta_{As}, \% = \sqrt{0,38^2 + 0,36^2} = 0,54\% \leq \Delta_{Asmax} = 3,20\%$$

Величина повної невизначеності методики кількісного визначення не перевищує критичних значень:

- для гідрокортизону ацетату: $0,63\% < \max \Delta As = 3,20\%$
- для бензокаїну: $0,54\% < \max \Delta As = 3,20\%$
- для бутамбену: $0,54\% < \max \Delta As = 3,20\%$.

Оцінка результатів

Повна прогнозована невизначеність результатів для тесту «Кількісне визначення. Гідрокортизону ацетат, бензокаїн, бутамбен» не перевищує критичні значення $\Delta Asmax = 3,20\%$, тобто методика даватиме коректні результати в інших лабораторіях.

ВИСНОВКИ

1. Вибір методу вискоєфективної рідинної хроматографії як основного аналітичного методу було обґрунтовано:

- Оптимізовано хроматографічні параметри для розділення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену: використано колонку C18 та градієнтну елюцію.
- Для кожного компонента встановлено час утримання, що забезпечує їхнє ефективне розділення.
- Використання УФ-детектора при специфічній довжині хвилі дозволило досягти високої чутливості аналізу.

2. Розроблена методика кількісного визначення активних речовин пройшла валідацію, яка підтвердила її відповідність сучасним фармацевтичним стандартам:

- Специфічність: методика дозволяє розділяти активні компоненти у присутності допоміжних речовин маzewої основи.
- Точність: середнє відхилення результатів не перевищує 2%, що відповідає вимогам Державної фармакопеї України.
- Лінійність: встановлено, що методика забезпечує лінійність результатів у концентраційному діапазоні 0,1–2,0 мг/мл для кожного компонента.
- Відтворюваність: проведені дослідження показали, що розроблена методика забезпечує стабільні результати як у межах однієї лабораторії, так і при міжлабораторних перевірках.
- Робастність: незначні зміни параметрів (температури, швидкості елюції) не впливають на результати аналізу.

3. Запропонована методика кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену має практичну цінність для фармацевтичної промисловості. Зокрема:

- Вона може використовуватися на етапах контролю якості готової продукції, що включає перевірку відповідності концентрації активних речовин заданим нормам.
- Методика дозволяє аналізувати багатокомпонентні мазі зі складною основою без додаткового очищення проби, що спрощує процес.
- Результати досліджень доводять її придатність для стандартизації комбінованих мазей у лабораторіях контролю якості.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Державна Фармакопея України. 3-тє вид. Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. 1120 с.
2. Акіменко, А. Розробка методик контролю якості діючих інгредієнтів в багатокомпонентній м'якій лікарській формі. 2022.
3. Белей, В. А.; Мелешко, Р. А. Дослідження методом ВЕРХ діючої речовини декстрометорфану гідроброміду на присутність домішки гідрокортизону. 2023.
4. Білай, І. М. Взаємодія лікарських засобів. 2016.
5. Вракін, В. О. Розробка та валідація методик контролю якості комбінованих мазей з тетрацикліном та гідрокортизоном. 2017.
6. Гураль, О.; Змійовський, Н.; Кіцак, І. Спектрофотометрія та її застосування. Збірник тез Х Всеукраїнської студентської науково-технічної конференції «Природничі та гуманітарні науки. Актуальні питання», 2017, 1: 202-202.
7. Єренко, О. К.; Берест, Г. Г. Фармацевтичний аналіз лікарських засобів: практикум. 2019.
8. Зарівна, Н. О. Розробка проєктів методик контролю якості на готові лікарські засоби залежно від виду лікарської форми при вивченні дисципліни «Стандартизація лікарських засобів». Медична освіта, 1: 29-34.
9. Зелений, А. Л. Фармакологічні властивості, клінічна ефективність та токсичні ефекти гідрокортизону ацетату. актуальні проблеми профілактичної медицини, 2.
10. Коваленко Л. В., Гончар О. І. «Оптимізація екстракційних методів для кількісного аналізу гідрокортизону в мазях», Вісник фармацевтичних наук України, 2019.
11. Мокійчук, В. М.; Самойліченко, О. В. Валідація аналітичних методик як невідємна частина забезпечення якості результатів випробувань. *Electrotechnic and Computer Systems*, 2012, 6 (82): 228-234.
12. Неведомська, Є. А., Вахненко, О. В., «Методи валідації аналітичних методик у фармацевтичній практиці», *Фармацевтичний журнал*, 2021, № 1, с. 24–30.
13. Ніженковська, І. В.; Вельчинська, О. В.; Манченко, О. В. Стандартизація лікарських засобів. 2024.
14. Петрус, В. В. Організація трансферу аналітичної методики на фармацевтичному підприємстві. 2020. PhD Thesis. Національний фармацевтичний університет.
15. Пушкарьова, Я. М. Методичні рекомендації до лекцій з дисципліни «Основи хімічної метрології» для студентів 2 курсу фармацевтичного факультету. 2023.

16. Сінельников, В. Хромато-мас-спектрометрія–характеристика та основні задачі. «Запорізький національний університет» міністерства освіти і науки України, 2018, 143.
17. Ярмоленко, С. П.; Квасніков, В. П. Газова хроматографія у сучасному світі.
18. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2019. 4320 p.
19. Allen, L. V., Popovich, N. G., Ansel, H. C. Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 720 p.
20. Bartle, K. D., Myers, P. Capillary Electrophoresis for Food Analysis. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001. 236 p. ISBN 9780854045791.
21. Breadmore, M. C., Thabano, J. R., Dawod, M., Quirino, J. P. Capillary electrophoresis in pharmaceutical and biomedical analysis. *Analytical Chemistry*. 2011, 83(16), 6264–6271. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac2010986.
22. Brittain, H. G., Rubinstein, M. H. «Assay Methods for Drug Substances». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 98, no. 7, 2009, pp. 1177–1191.
23. Dolan, J. W. «Method Development and Validation for HPLC Analysis of Pharmaceutical Drugs». *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, 2011, pp. 1338–1350.
24. Dorsey, J. G., Dill, K. A. Retention mechanisms of reversed-phase chromatography: A molecular perspective. *Analytical Chemistry*. 1989, 61(7), 655–665. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac00181a002.
25. Elzanfaly, E. S., Nebsen, M., Sabry, S. M. «Simultaneous Determination of Lidocaine and Corticosteroids in Pharmaceutical Preparations Using HPLC with UV Detection». *Acta Pharmaceutica*, vol. 68, no. 1, 2018, pp. 63–70.
26. Emami, J., Ahmadiani, A., Hassanpour, M. «Optimization and Validation of a HPLC-UV Method for Quantification of Active Components in Complex Topical Preparations». *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 44, no. 10, 2018, pp. 1657–1664.
27. Emami, J., Ghassami, N., Talari, R. «HPLC Determination of Benzocaine in Different Dosage Forms». *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 2, 2013, pp. 265–270.
28. Jansen, K. *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals*. 3rd ed. CRC Press, 2016. 408 p.
29. Kazakevich, Y., LoBrutto, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007. 544 p. ISBN 9780470087947.
30. Liang, Y., Wang, Y., Zhang, H. «Simultaneous Quantification of Multiple Components in Topical Ointments by HPLC-UV». *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 9, no. 1, 2019, pp. 58–64.

31. Niazi, S. K. Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations: Semisolid Products. Informa Healthcare, 2004. 560 p.
32. Poole, C. F. Gas Chromatography. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2012. 940 p. ISBN 9780123855404.
33. Sabry E., «Validation of Analytical Methods for Multi-Component Ointments», Acta Pharmaceutica, 2019.
34. Smith, J., Williams, A. R. «Quantitative Analysis of Corticosteroids in Multi-Component Ointments by HPLC». Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 60, no. 5, 2018, pp. 43–51.
35. Smith, R. M. Understanding Mass Spectra: A Basic Approach. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004. 371 p. ISBN 9780471123439.
36. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3rd ed. New York: Wiley, 2010. 912 p.
37. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011. 912 p. ISBN 9780470167540.
38. Turner, J. V., Maddalena, D. J. «Application of HPLC-UV Detection in Quality Control of Multicomponent Pharmaceutical Formulations». Journal of Chromatography B, vol. 857, no. 2, 2007, pp. 190–196.
39. Williams D., «Precision of Quantitative Methods in Topical Preparations», Journal of Pharmaceutical Analysis, 2020.
40. Zhang, R. «Multi-Day Precision in Multi-Component Topical Analysis». Analytical Chemistry, vol. 90, no. 4, 2018, pp. 2105–2112.

ДОДАТОК А
Хроматограми досліджуваних розчинів

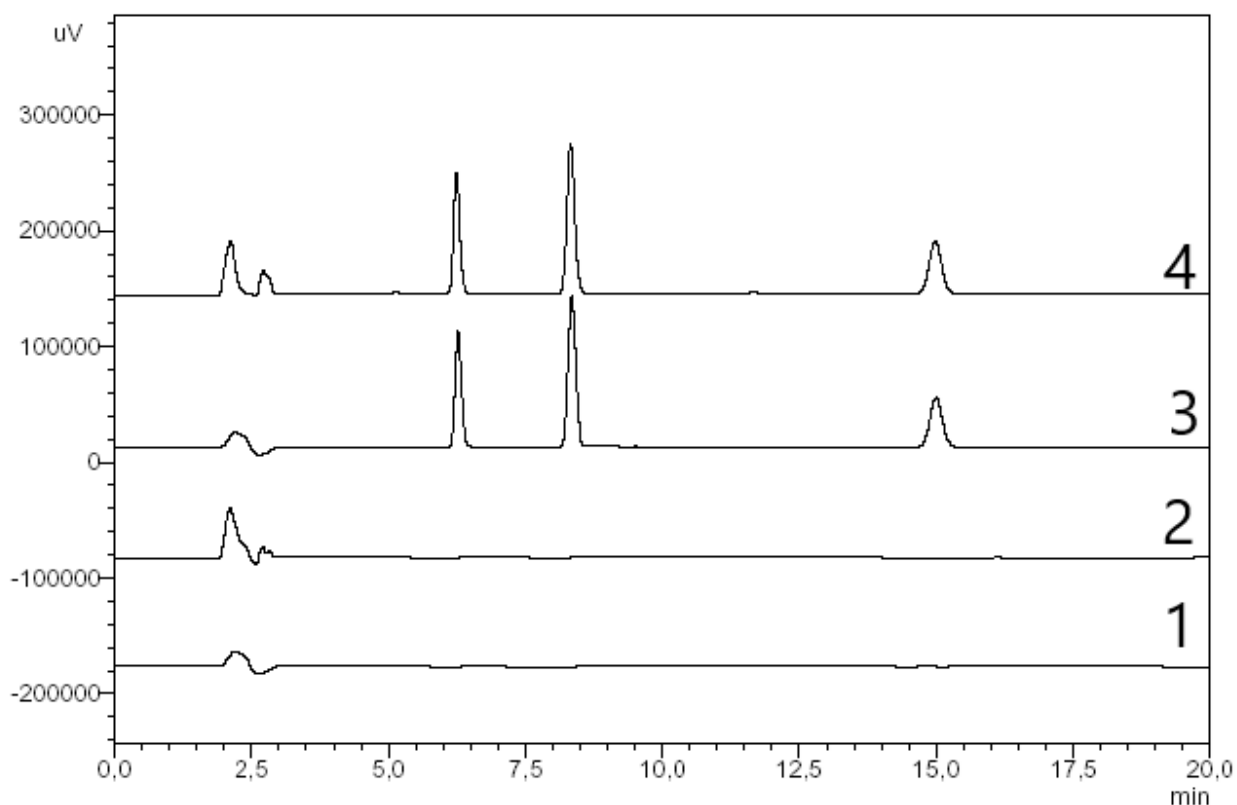


Рисунок 1 – Хроматограми, отримані в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену при довжині хвилі детектування 245 нм:

- 1 – бланка;
- 2 – розчину плацебо, який не містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен;
- 3 – розчину порівняння;
- 4 – випробуваного розчину

Примітка. Пік з часом утримання $R_t \approx 6,2$ хв відповідає бензокаїну; пік з часом утримання $R_t \approx 8,3$ хв відповідає гідрокортизону ацетату; пік з часом утримання $R_t \approx 15,0$ хв відповідає бутамбену

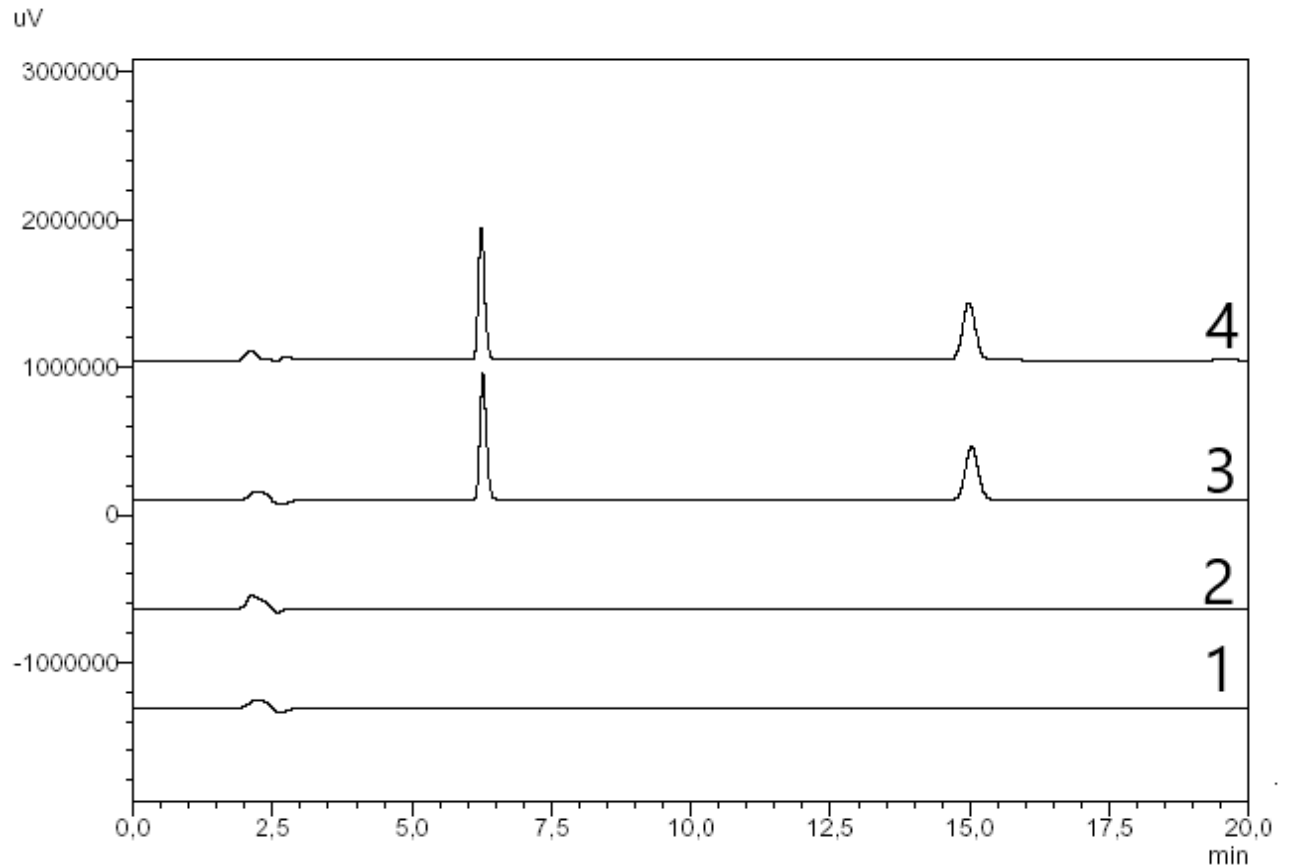


Рисунок 2 – Хроматограми, отримані в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену при довжині хвилі детектування 288 нм:

1 – бланка;
 2 – розчину плацебо, який не містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен;

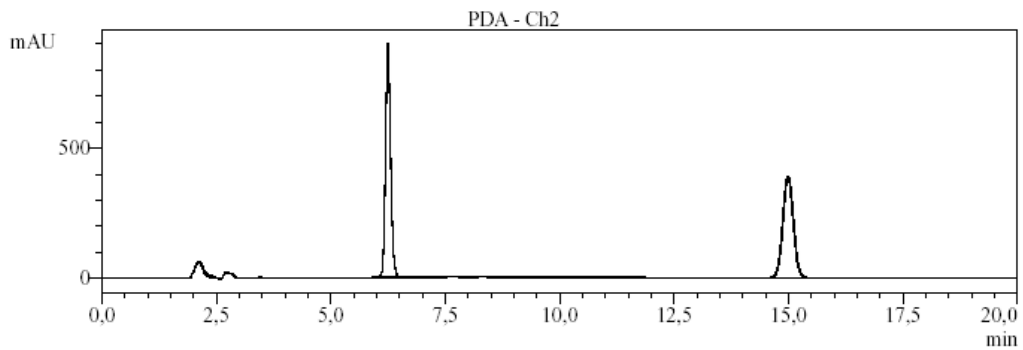
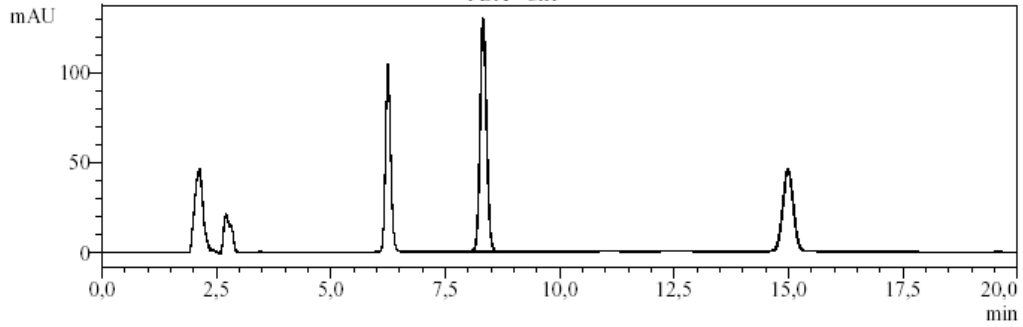
3 – розчину порівняння;

4 – випробуваного розчину

Примітка . Пік з часом утримання $R_t \approx 6,2$ хв відповідає бензокаїну; пік з часом утримання $R_t \approx 15,0$ хв відповідає бутамбену

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

Summary(Compound)
PDA - Ch1



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Hydrocortisone acetate

Title	Ret. Time	Area	Theoretical	Tailing Factor	Peak Purity Index	Angle Point Threshd
Sample Test 006	8.334	1285886	16374	1.092	1.000000	0.999999
Sample Test 003	8.321	1290147	16422	1.091	1.000000	0.999934
Sample Test 004	8.326	1292224	16382	1.092	1.000000	0.999996
Sample Test 005	8.334	1288430	16367	1.093	1.000000	0.999999
Sample Test 002	8.318	1286341	16473	1.090	1.000000	0.999997
Average	8.327	1288606	16404	1.091	1.000000	0.999985
%RSD	0.088	0.205	0.269	0.115	0.000	0.003

ID#2 Compound Name: Benzocain

Title	Ret. Time	Area	Theoretical	Tailing Factor	Peak Purity Index	Angle Point Threshd
Sample Test 006	6.247	7024033	14831	1.145	1.000000	0.996823
Sample Test 003	6.242	7040572	14900	1.143	1.000000	0.999977
Sample Test 004	6.243	7025871	14953	1.143	1.000000	0.991774
Sample Test 005	6.247	7036457	14827	1.146	1.000000	0.997204
Sample Test 002	6.243	7020872	14958	1.143	1.000000	0.990935
Average	6.244	7029561	14894	1.144	1.000000	0.995343
%RSD	0.035	0.121	0.426	0.132	0.000	0.387

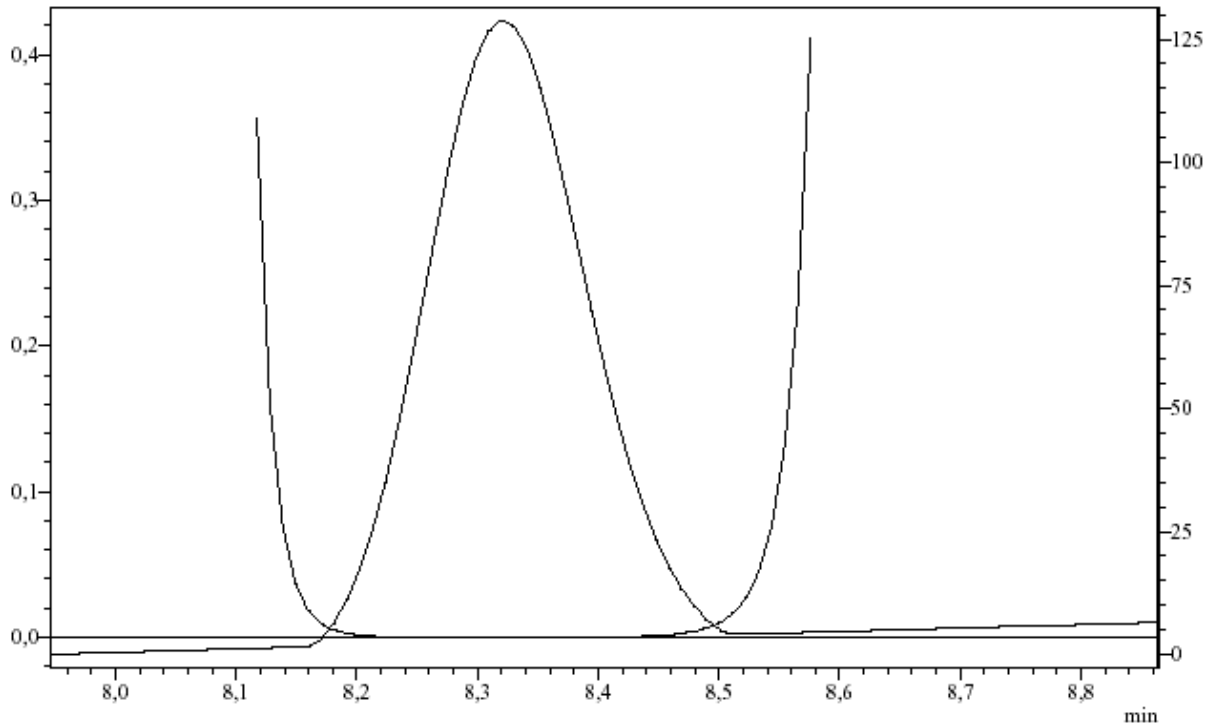
ID#3 Compound Name: Butamben

Title	Ret. Time	Area	Theoretical	Tailing Factor	Peak Purity Index	Angle Point Threshd
Sample Test 006	14.997	6234066	20286	1.039	1.000000	1.000000
Sample Test 003	14.975	6249970	20297	1.039	1.000000	0.999976
Sample Test 004	14.983	6232523	20294	1.038	1.000000	0.999998
Sample Test 005	14.997	6238676	20281	1.039	1.000000	1.000000
Sample Test 002	14.972	6232610	20304	1.038	1.000000	0.999999
Average	14.985	6237569	20292	1.038	1.000000	0.999995
%RSD	0.079	0.118	0.046	0.059	0.000	0.001

Рисунок 3 – Хроматограми *випробуваного розчину* препарату, отримані в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену, де:

- пік із середнім $R_t = 8,327$ хв відповідає гідрокортизону ацетату;
- пік із середнім $R_t = 6,244$ хв відповідає бензокаїну;
- пік із середнім $R_t = 14,985$ хв відповідає бутамбену

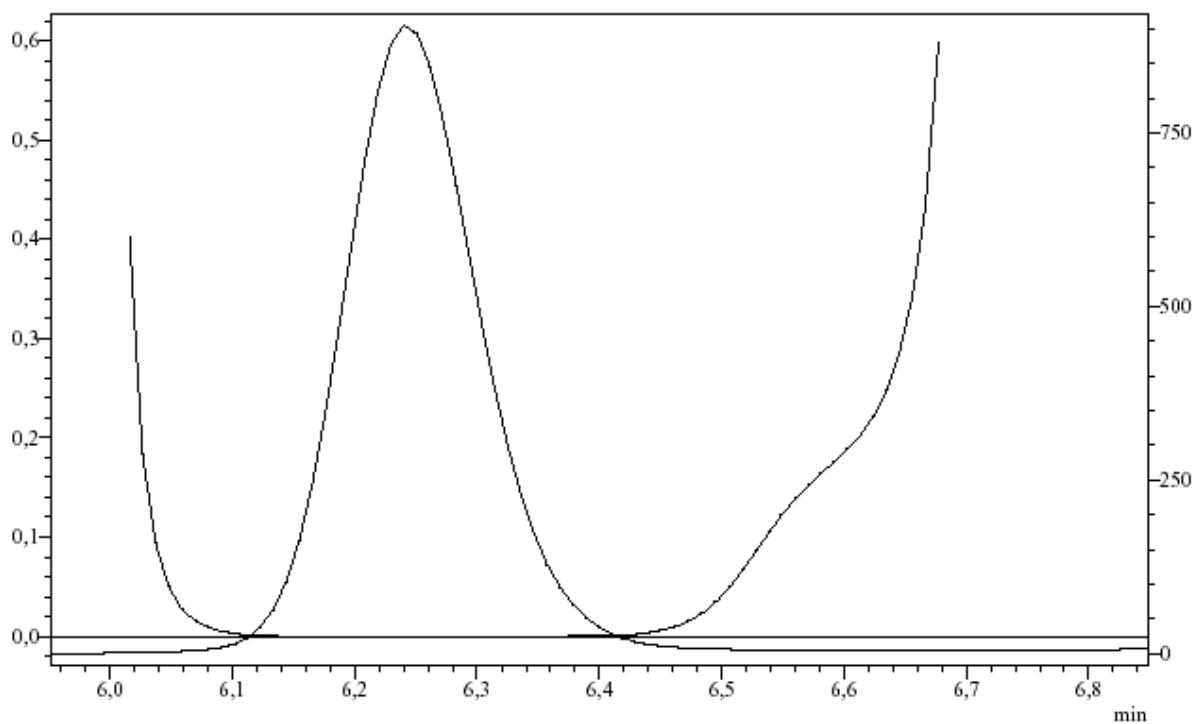
ID# : 1
Retention Time : 8,321 min
Compound Name : Hydrocortisone acetate



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 1,000000
Single point threshold : 0,999934
Minimum peak purity index : 65

Рисунок 4 – Діаграма хроматографічної чистоти піку **гідрокортизону ацетату** (час утримування 8,321 хв), отриманого на хроматограмах *випробуваного розчину* в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену

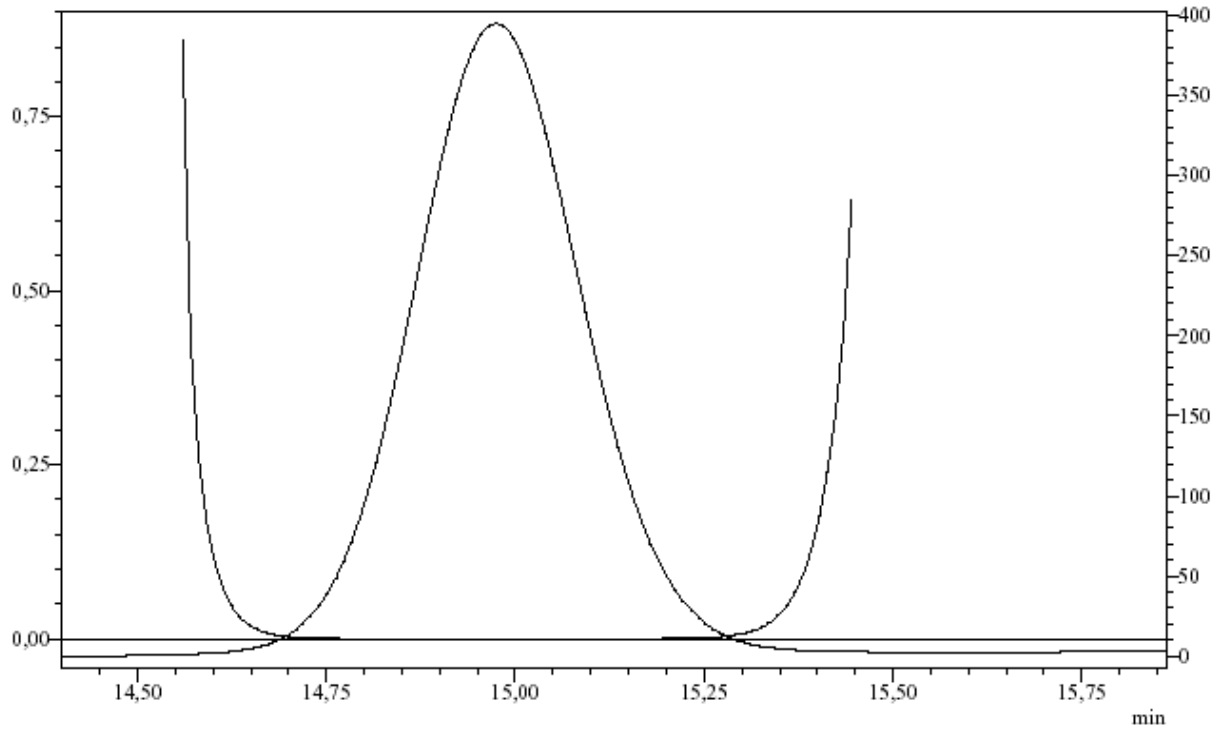
ID# : 2
Retention Time : 6,242 min
Compound Name : Benzocain



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 1,000000
Single point threshold : 0,999977
Minimum peak purity index : 22

Рисунок 5 – Діаграма хроматографічної чистоти піку **бензокаїну** (час утримування 6,242 хв), отриманого на хроматограмах *випробуваного розчину* в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену

ID# : 3
Retention Time : 14,975 min
Compound Name : Butamben

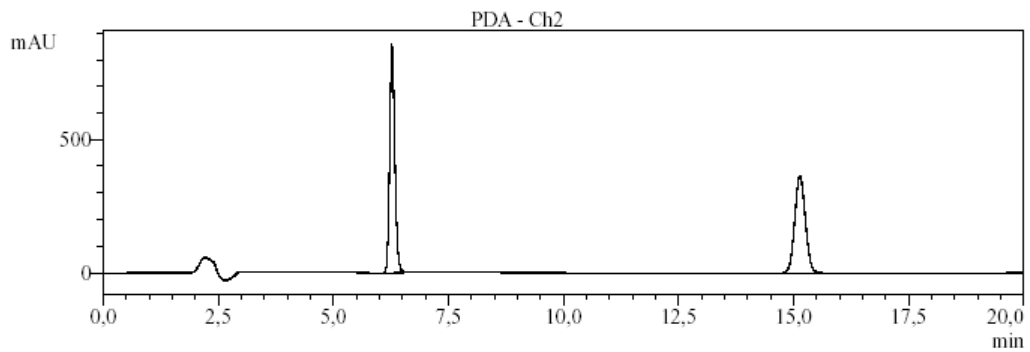
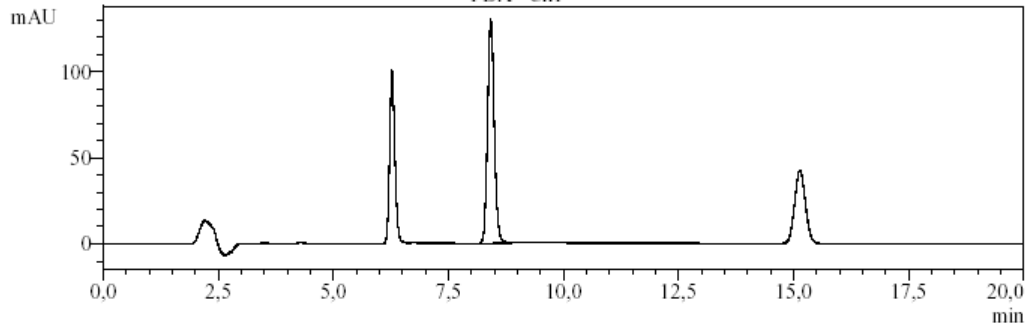


Impurity : Not Detected
Peak purity index : 1,000000
Single point threshold : 0,999976
Minimum peak purity index : 24

Рисунок 6 – Діаграма хроматографічної чистоти піку **бутамбену** (час утримування 14,975 хв), отриманого на хроматограмах *випробуваного розчину* в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену

SHIMADZU LabSolutions Analysis Report

Summary(Compound)
PDA - Ch1



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Hydrocortisone acetate

Title	Ret. Time	Area	Theoretical	Tailing Factor	Peak Purity Index	Angle Point Thresh
Sample RS 033.1	8.417	1323234	16314	1.102	1.000000	0.999992
Sample RS 034.1	8.419	1318367	16298	1.102	1.000000	0.999999
Sample RS 035.1	8.418	1324769	16292	1.102	1.000000	0.999998
Sample RS 036.1	8.422	1315913	16299	1.102	1.000000	0.999990
Sample RS 037.1	8.417	1313641	16359	1.102	1.000000	0.999972
Average	8.419	1319185	16312	1.102	1.000000	0.999990
%RSD	0.023	0.359	0.168	0.027	0.000	0.001

ID#2 Compound Name: Benzocain

Title	Ret. Time	Area	Theoretical	Tailing Factor	Peak Purity Index	Angle Point Thresh
Sample RS 033.1	6.274	6835604	14714	1.154	1.000000	0.999997
Sample RS 034.1	6.273	6810318	14773	1.153	1.000000	0.992582
Sample RS 035.1	6.271	6840104	14722	1.156	1.000000	0.989800
Sample RS 036.1	6.275	6796744	14817	1.154	1.000000	0.999997
Sample RS 037.1	6.271	6784382	14864	1.154	1.000000	0.999991
Average	6.273	6813430	14778	1.154	1.000000	0.996473
%RSD	0.027	0.355	0.431	0.077	0.000	0.494

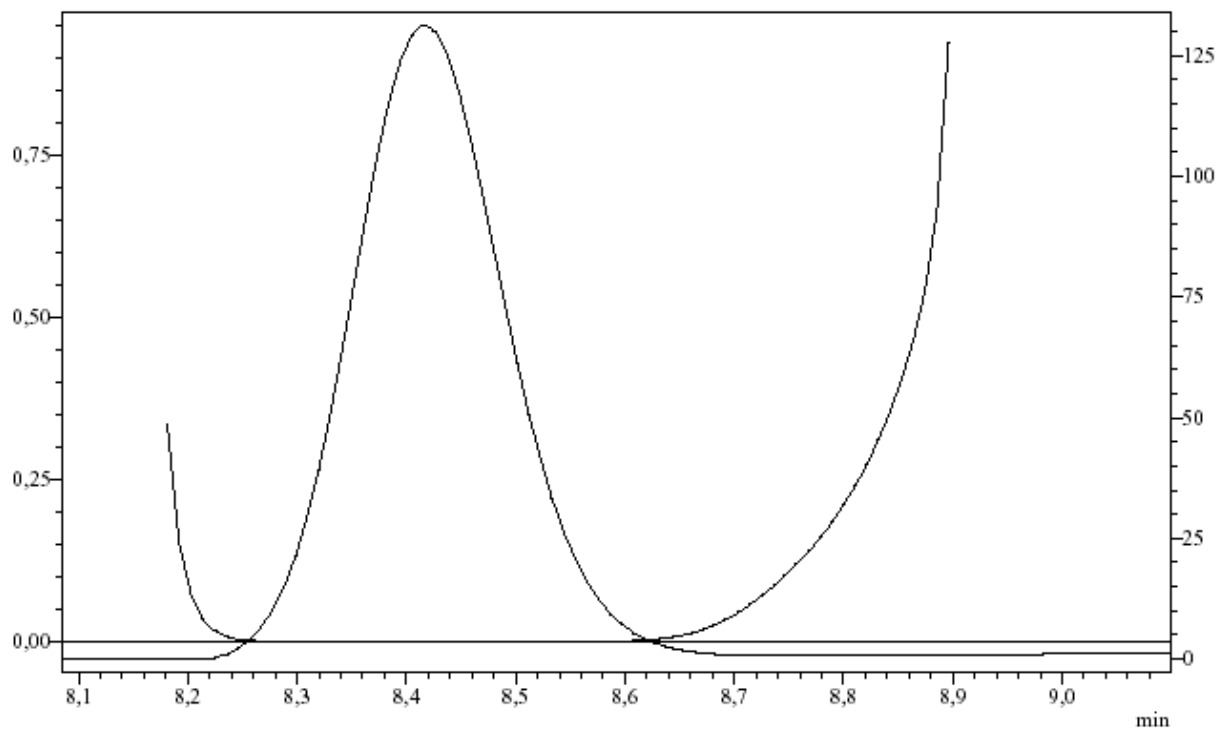
ID#3 Compound Name: Butamben

Title	Ret. Time	Area	Theoretical	Tailing Factor	Peak Purity Index	Angle Point Thresh
Sample RS 033.1	15.134	5927224	20284	1.041	1.000000	0.999997
Sample RS 034.1	15.139	5904699	20284	1.041	1.000000	1.000000
Sample RS 035.1	15.139	5928895	20282	1.042	1.000000	0.999999
Sample RS 036.1	15.140	5891026	20324	1.041	1.000000	0.999997
Sample RS 037.1	15.134	5881716	20334	1.041	1.000000	0.999990
Average	15.137	5906712	20302	1.041	1.000000	0.999996
%RSD	0.020	0.358	0.125	0.018	0.000	0.000

Рисунок 7 – Хроматограми розчину порівняння, отримані в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену, де:

- пік із середнім Rt = 8,419 хв відповідає гідрокортизону ацетату;
- пік із середнім Rt = 6,273 хв відповідає бензокаїну;
- пік із середнім Rt = 15,137 хв відповідає бутамбену

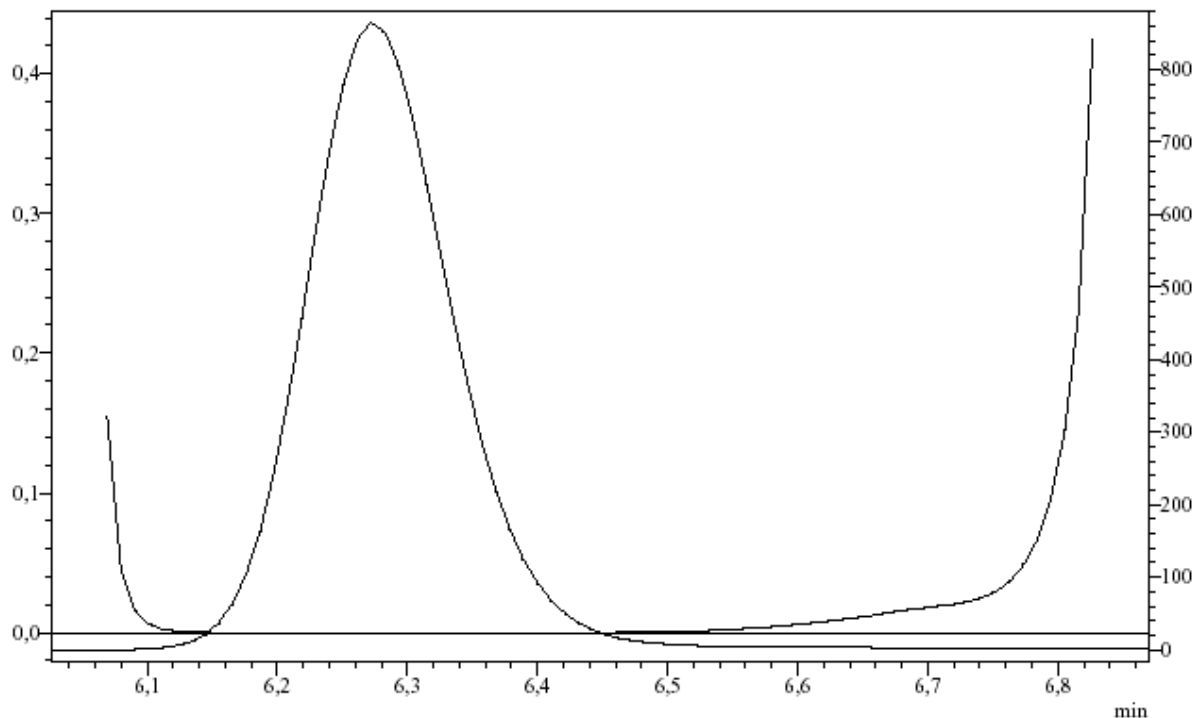
ID# : 1
Retention Time : 8,417 min
Compound Name : Hydrocortisone acetate



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 1,000000
Single point threshold : 0,999992
Minimum peak purity index : 8

Рисунок 8 – Діаграма хроматографічної чистоти піку **гідрокортизону ацетату** (час утримування 8,417 хв), отриманого на хроматограмах *розчину порівняння* в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену

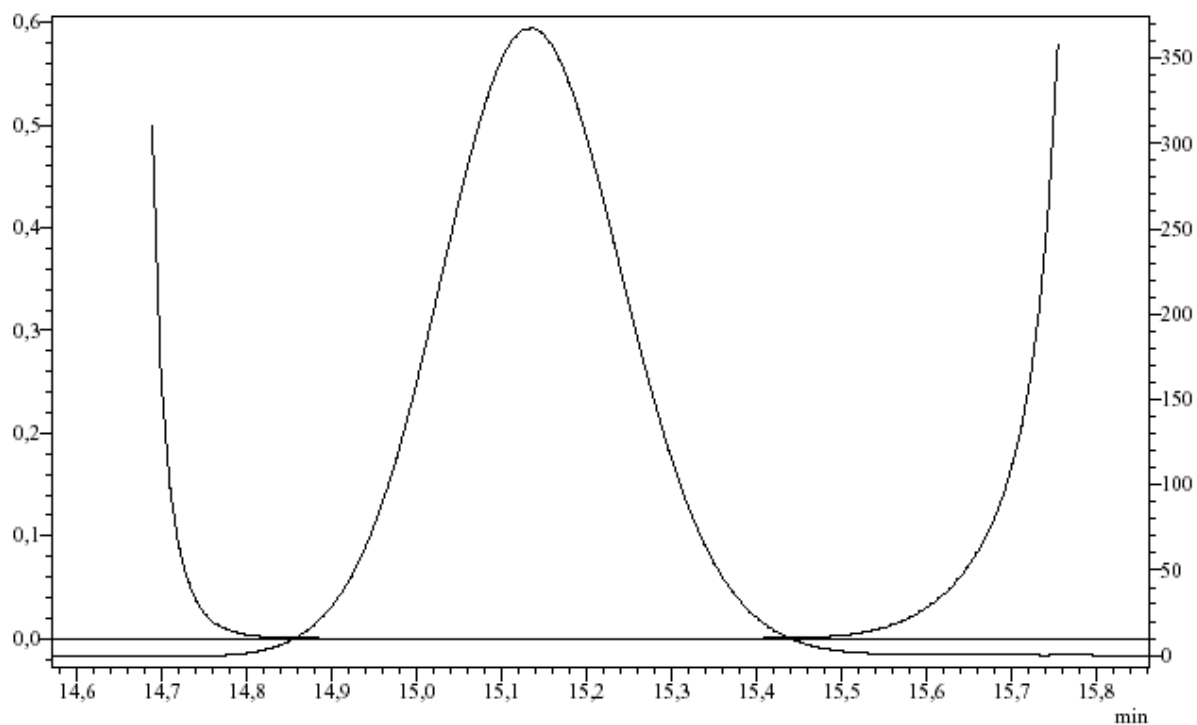
ID# : 2
Retention Time : 6,274 min
Compound Name : Benzocain



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 1,000000
Single point threshold : 0,999997
Minimum peak purity index : 2

Рисунок 9 – Діаграма хроматографічної чистоти піку **бензокаїну** (час утримування 6274 хв), отриманого на хроматограмах *розчину порівняння* в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену

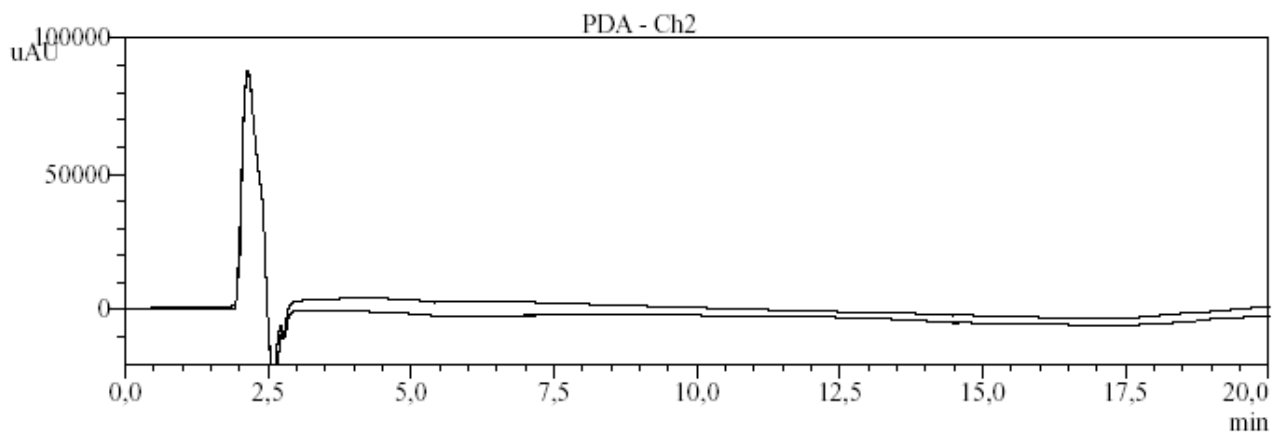
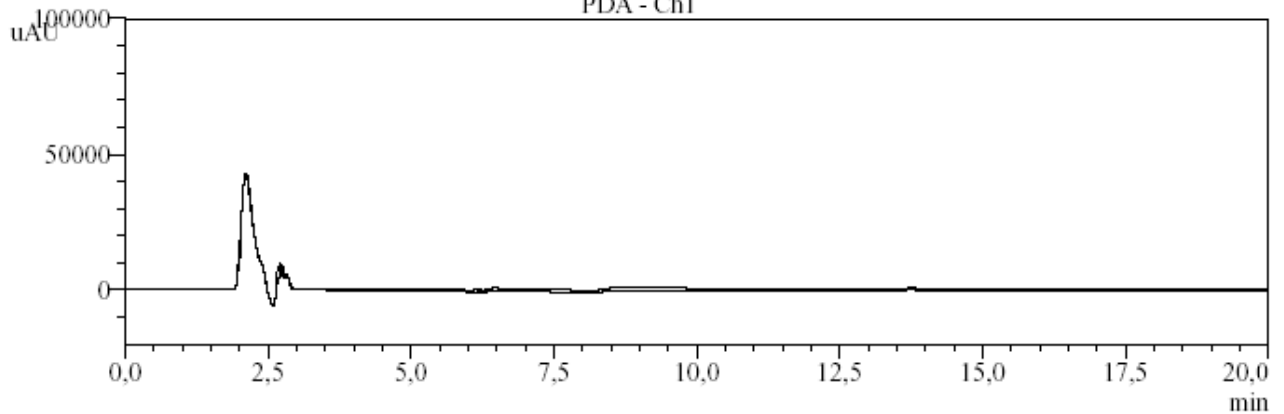
ID# : 3
Retention Time : 15,134 min
Compound Name : Бутамбен



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 1,000000
Single point threshold : 0,999997
Minimum peak purity index : 3

Рисунок 10 – Діаграма хроматографічної чистоти піку **бутамбену** (час утримування 15,134 хв), отриманого на хроматограмах *розчину порівняння* в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену

Summary(Compound)
PDA - Ch1



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Hydrocortisone acetate

Title	Ret. Time	Area	Theoretical	Tailing Factor	Peak Purity Index	Angle Point Threshc
Sample Plac 039	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
Sample Plac 038	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
Average	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
%RSD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

ID#2 Compound Name: Benzocain

Title	Ret. Time	Area	Theoretical	Tailing Factor	Peak Purity Index	ngle Point Threshc
Sample Plac 039	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
Sample Plac 038	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
Average	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
%RSD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

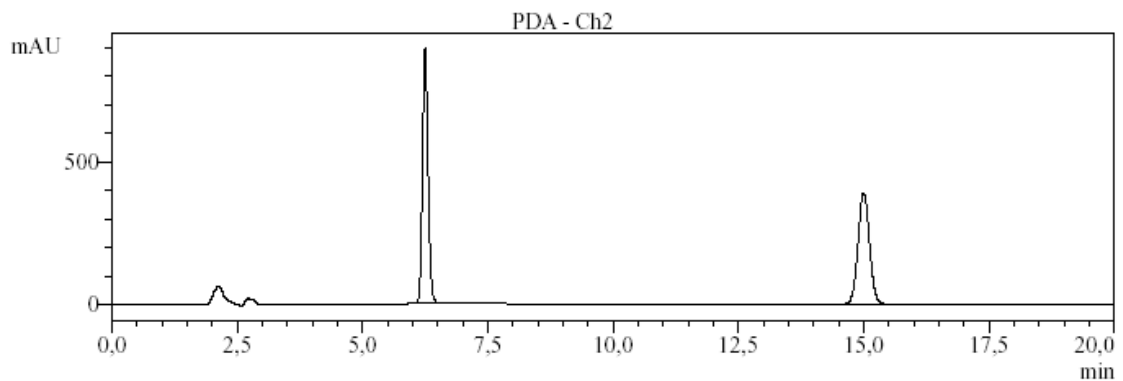
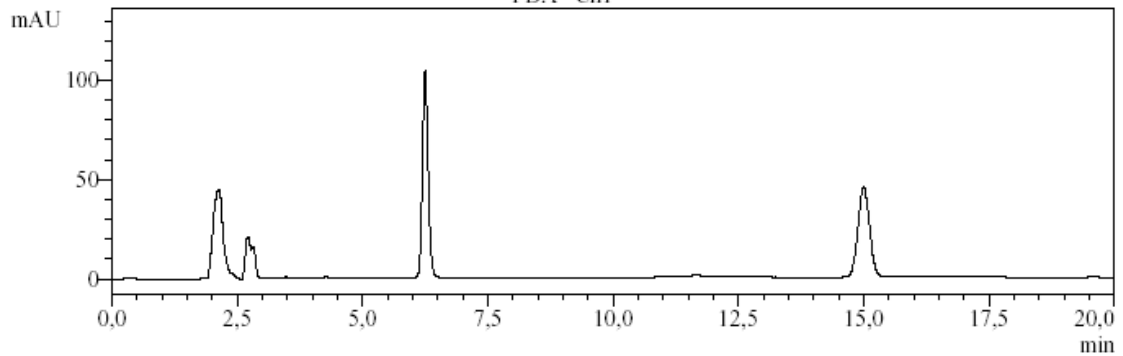
ID#3 Compound Name: Butamben

Title	Ret. Time	Area	Theoretical	Tailing Factor	Peak Purity Index	ngle Point Threshc
Sample Plac 039	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
Sample Plac 038	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
Average	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
%RSD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Рисунок 11 – Хроматограми розчину плацебо, що не містить гідрокортизону ацетат, бензокаїн та бутамбен, отримані в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену

SHIMADZU
LabSolutions Analysis Report

Summary(Compound)
PDA - Ch1



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Hydrocortisone acetate

Title	Ret. Time	Area	of Theoretical	Resolution(EP)	Tailing Factor
Sample Plac HA_002.lcd	0.000	0	--	--	--
Sample Plac HA_001.lcd	0.000	0	--	--	--
Average	0.000	0	--	--	--
%RSD	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

ID#2 Compound Name: Benzocain

Title	Ret. Time	Area	of Theoretical	Resolution(EP)	Tailing Factor
Sample Plac HA_002.lcd	6.247	7010740	14839	--	1.145
Sample Plac HA_001.lcd	6.247	6997738	14847	--	1.144
Average	6.247	7004239	14843	--	1.144
%RSD	0.000	0.131	0.039	0.000	0.052

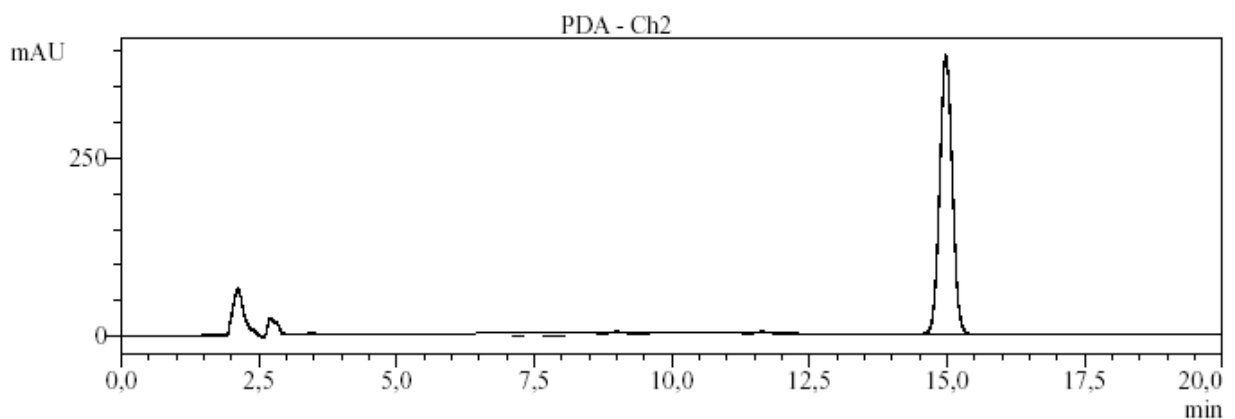
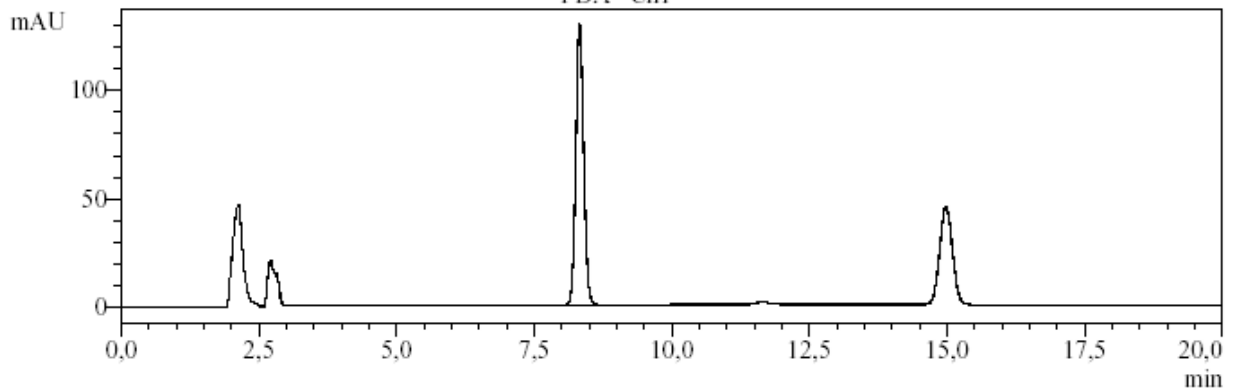
ID#3 Compound Name: Butamben

Title	Ret. Time	Area	of Theoretical	Resolution(EP)	Tailing Factor
Sample Plac HA_002.lcd	14.997	6226280	20294	28.021	1.038
Sample Plac HA_001.lcd	14.997	6222936	20297	28.025	1.038
Average	14.997	6224608	20296	28.023	1.038
%RSD	0.000	0.038	0.010	0.010	0.015

Рисунок 12 – Хроматограми розчину плацебо, що не містить гідрокортизону ацетат, отримані в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену, де:

- пік із середнім $R_t = 6,247$ хв відповідає бензокаїну;
- пік із середнім $R_t = 14,997$ хв відповідає бутамбену

Summary(Compound)
PDA - Ch1



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Hydrocortisone acetate

Title	Ret. Time	Area	of Theoretical	Resolution(EP)	Tailing Factor
Sample Plac benzocain 003.lcd	8.326	1290283	16389	--	1.092
Sample Plac benzocain 004.lcd	8.321	1286521	16436	--	1.090
Average	8.324	1288402	16413	--	1.091
%RSD	0.045	0.206	0.203	0.000	0.110

ID#2 Compound Name: Benzocain

Title	Ret. Time	Area	of Theoretical	Resolution(EP)	Tailing Factor
Sample Plac benzocain 003.lcd	0.000	0	--	--	--
Sample Plac benzocain 004.lcd	0.000	0	--	--	--
Average	0.000	0	--	--	--
%RSD	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

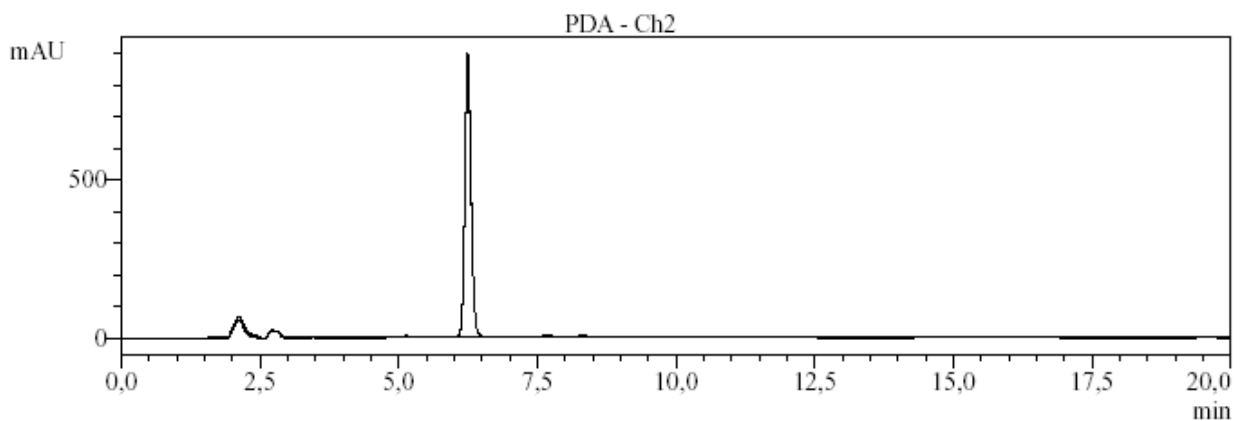
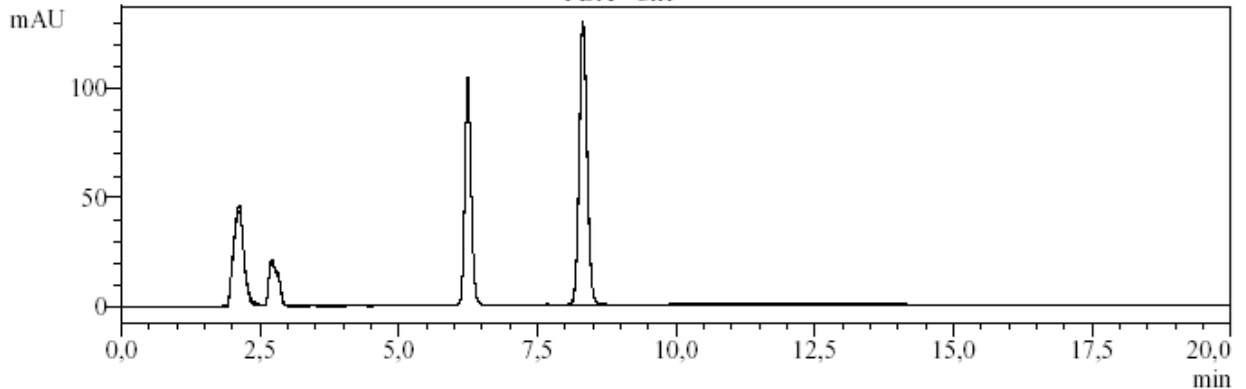
ID#3 Compound Name: Butamben

Title	Ret. Time	Area	of Theoretical	Resolution(EP)	Tailing Factor
Sample Plac benzocain 003.lcd	14.983	6224286	20302	--	1.038
Sample Plac benzocain 004.lcd	14.975	6239907	20308	--	1.038
Average	14.979	6232097	20305	--	1.038
%RSD	0.037	0.177	0.022	0.000	0.039

Рисунок 13 – Хроматограми розчину плацебо, що не містить бензокаїн, отримані в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену, де:

- пік із середнім $R_t = 8,324$ хв відповідає гідрокортизону ацетату;
- пік із середнім $R_t = 14,979$ хв відповідає бутамбену

Summary(Compound)
PDA - Ch1



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Hydrocortisone acetate

Title	Ret. Time	Area	σf Theoretical	Resolution(EP)	Tailing Factor
Sample Plac butamben 006.lcd	8.321	1281464	16465	--	1.093
Sample Plac butamben 005.lcd	8.318	1282147	16487	--	1.088
Average	8.320	1281805	16476	--	1.090
%RSD	0.021	0.038	0.096	0.000	0.272

ID#2 Compound Name: Benzocain

Title	Ret. Time	Area	σf Theoretical	Resolution(EP)	Tailing Factor
Sample Plac butamben 006.lcd	6.242	7046968	14896	--	1.143
Sample Plac butamben 005.lcd	6.243	6998079	14966	--	1.142
Average	6.243	7022524	14931	--	1.142
%RSD	0.009	0.492	0.331	0.000	0.082

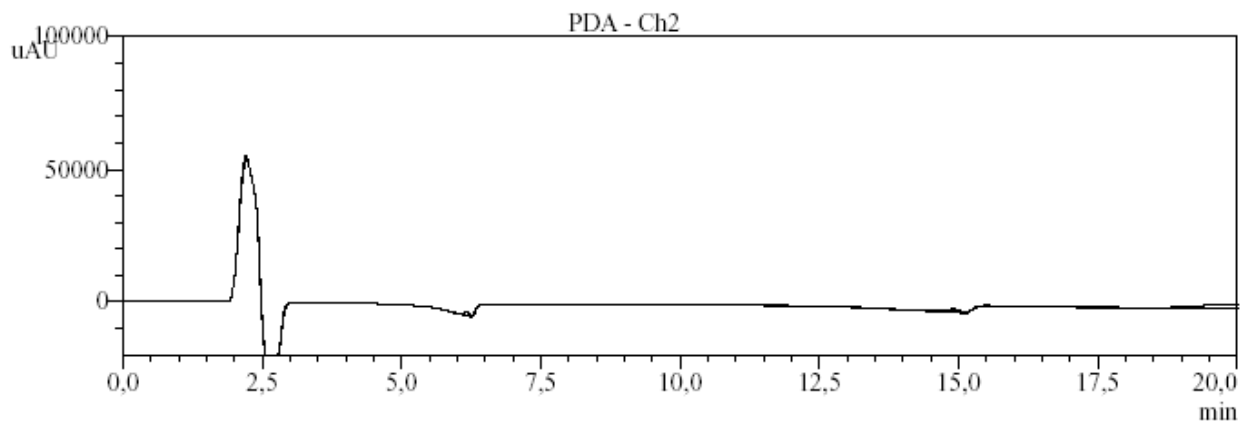
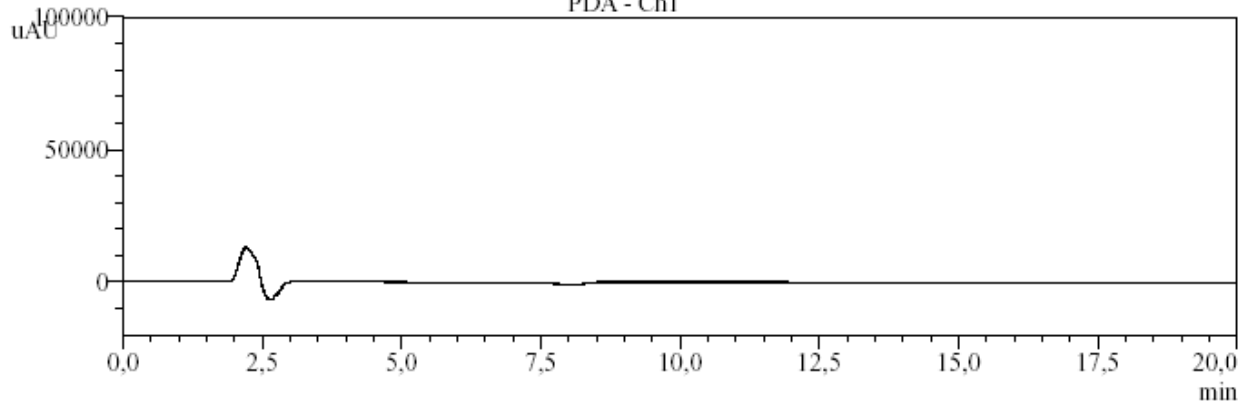
ID#3 Compound Name: Butamben

Title	Ret. Time	Area	σf Theoretical	Resolution(EP)	Tailing Factor
Sample Plac butamben 006.lcd	0.000	0	--	--	--
Sample Plac butamben 005.lcd	0.000	0	--	--	--
Average	0.000	0	--	--	--
%RSD	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Рисунок 14 – Хроматограми розчину плацебо, що не містить бутамбен, отримані в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену, де:

- пік із середнім $R_t = 8,320$ хв відповідає гідрокортизону ацетату;
- пік із середнім $R_t = 6,243$ хв відповідає бензокаїну

Summary(Compound)
PDA - Ch1



<< PDA >>

ID#1 Compound Name: Hydrocortisone acetate

Title	Ret. Time	Area	Theoretical	Tailing Factor	Peak Purity Index	Angle Point Thresho
Sample blanc 04	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
Sample blanc 04	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
Average	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
%RSD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

ID#2 Compound Name: Benzocain

Title	Ret. Time	Area	Theoretical	Tailing Factor	Peak Purity Index	Angle Point Thresho
Sample blanc 04	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
Sample blanc 04	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
Average	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
%RSD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

ID#3 Compound Name: Butamben

Title	Ret. Time	Area	Theoretical	Tailing Factor	Peak Purity Index	Angle Point Thresho
Sample blanc 04	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
Sample blanc 04	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
Average	0,000	0	--	--	0,000000	0,000000
%RSD	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Рисунок 15 – Хроматограми *бланка*, отримані в умовах кількісного визначення гідрокортизону ацетату, бензокаїну та бутамбену

ДОДАТОК Б

УФ-спектри активних фармацевтичних компонентів

 **Analysis Report**

UV Spectrum

ID# : 1
Retention Time : 8,418 min
Compound Name : Hydrocortisone acetate
Spectrum Operation : None

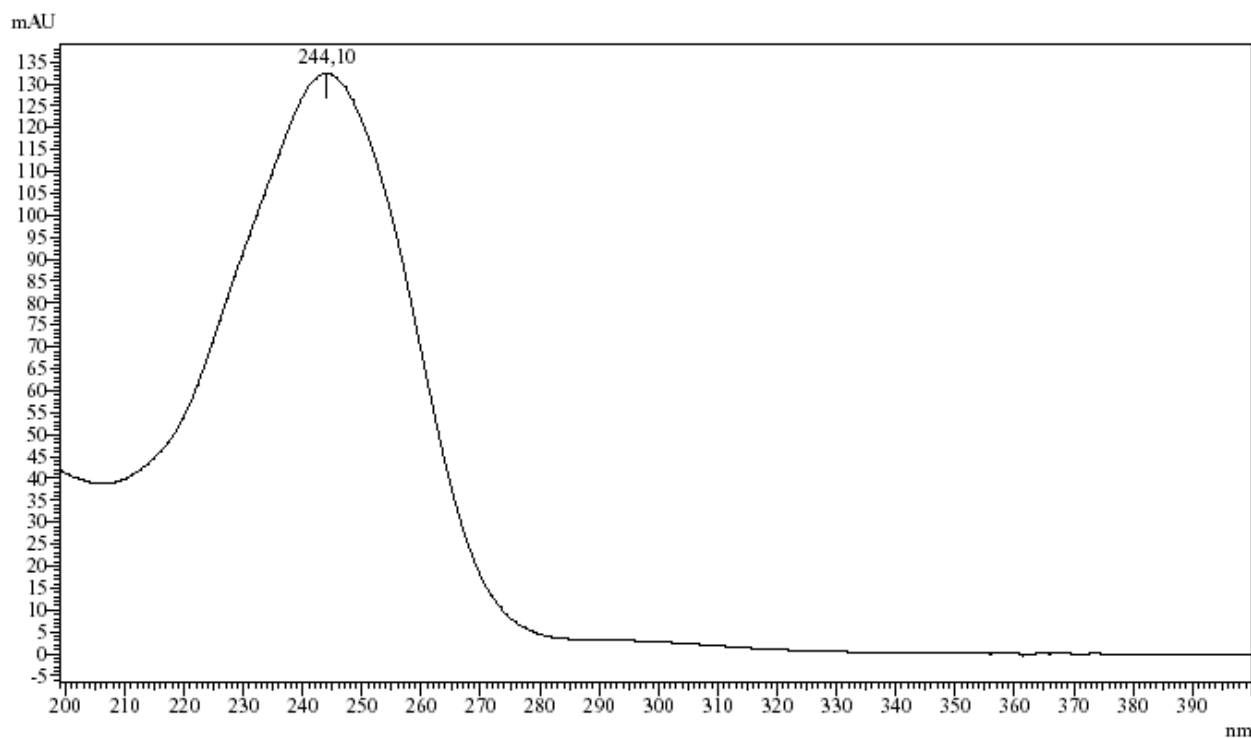


Рисунок 16 – УФ-спектр гідрокортизону ацетату , отриманий у максимумі піку відповідної речовини, отриманої на хроматограмах розчину порівняння

UV Spectrum

ID# : 1
Retention Time : 8,334 min
Compound Name : Hydrocortisone acetate
Spectrum Operation : None

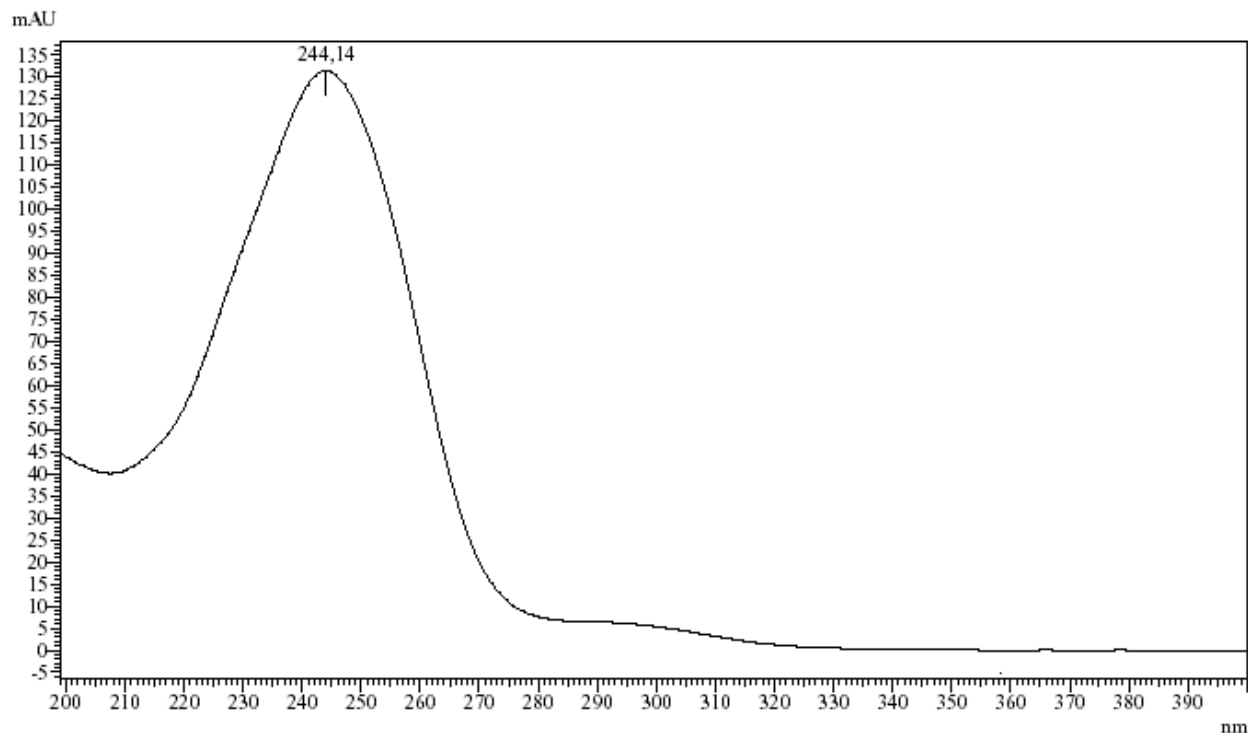


Рисунок 17 – УФ-спектр піка **гідрокортизону ацетату** , отриманий у максимумі піку відповідної речовини, отриманої на хроматограмах *випробуваного розчину*

ID# : 2
Retention Time : 6,271 min
Compound Name : Benzocain
Spectrum Operation : None

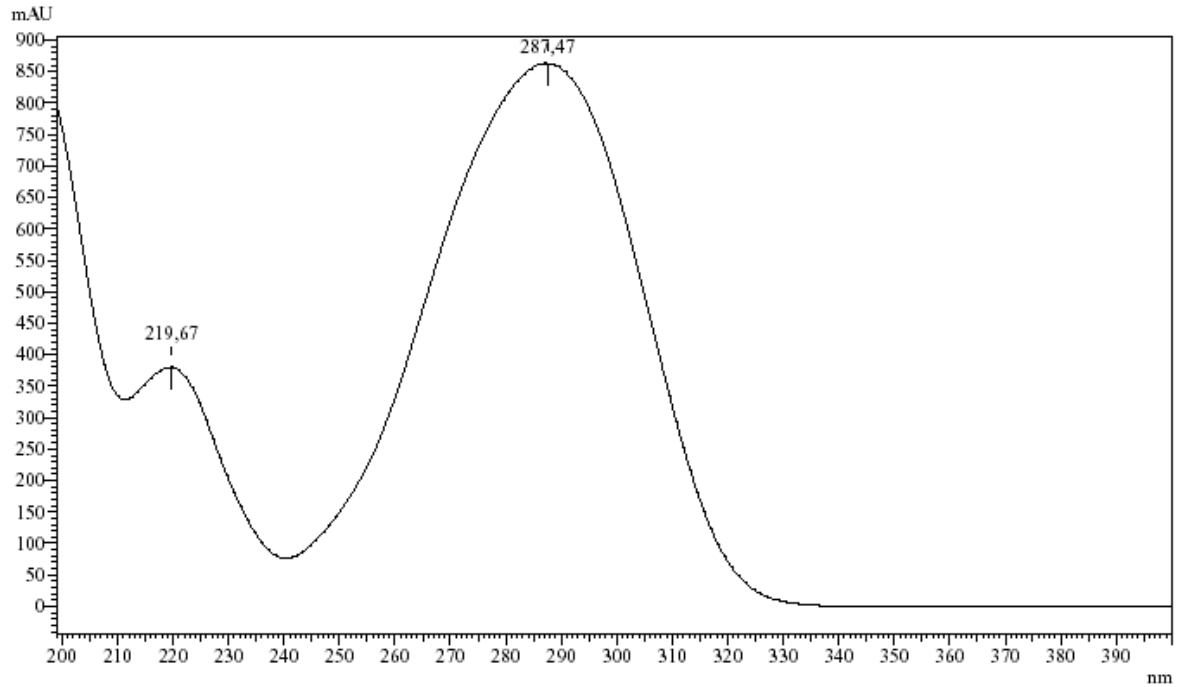


Рисунок 18 – УФ-спектр піку бензокаїну , отриманий у максимумі піку відповідної

речовини, отриманої на хроматограмах розчину порівняння



Analysis Report

UV Spectrum

ID# : 2
Retention Time : 6,247 min
Compound Name : Benzocain
Spectrum Operation : None

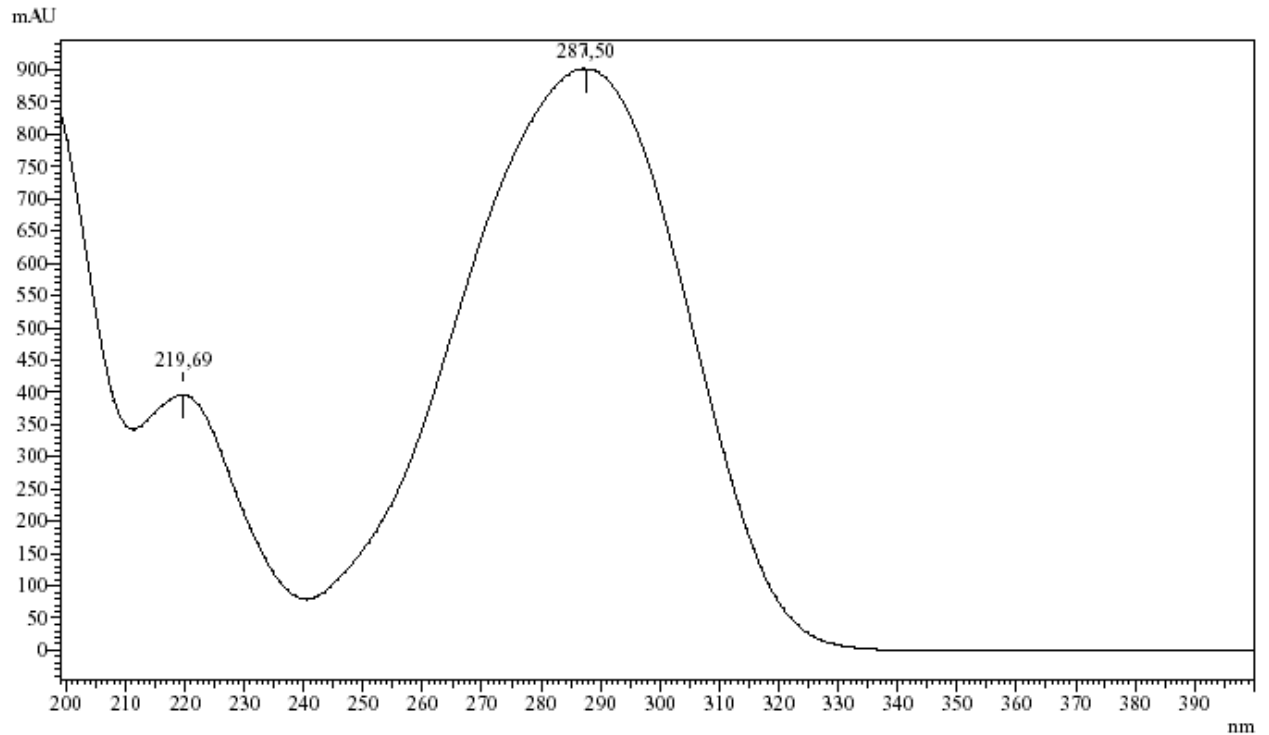


Рисунок 19 – УФ-спектр піку **бензокаїну** , отриманий у максимумі піку відповідної речовини, отриманої на хроматограмах *випробуваного розчину*

ID# : 3
Retention Time : 15,139 min
Compound Name : Butamben
Spectrum Operation : None

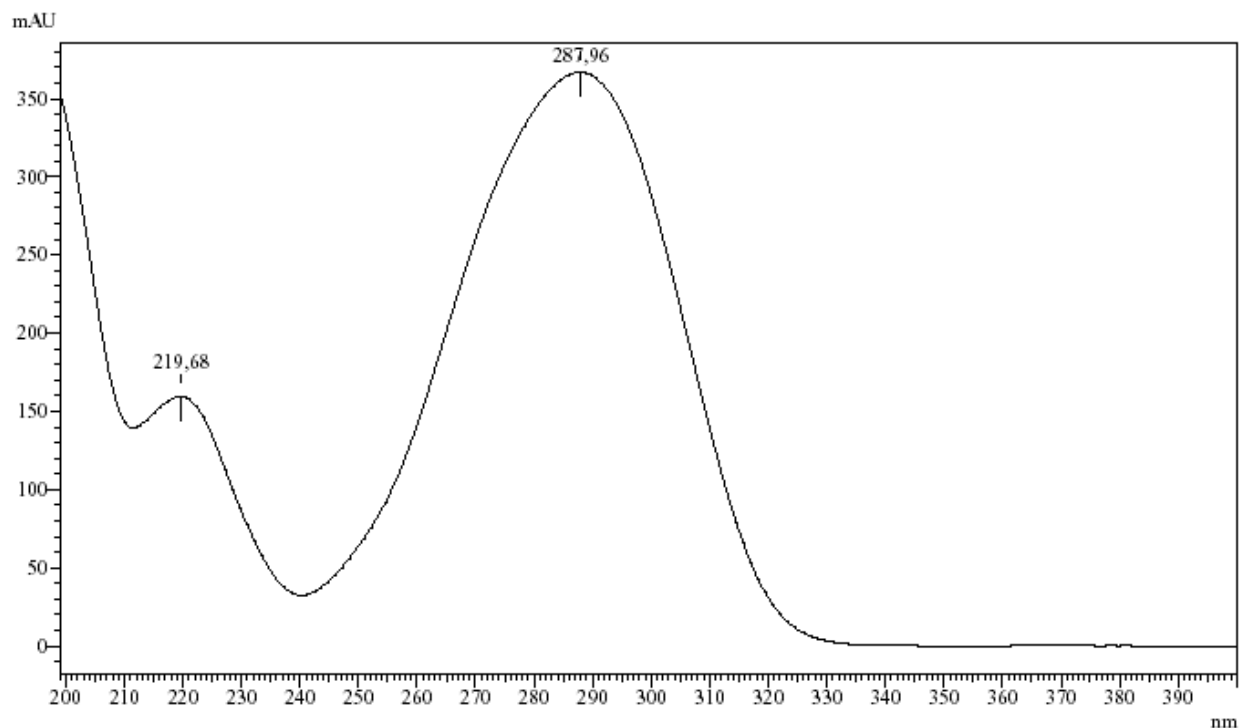


Рисунок 20 – УФ-спектр піку **бугамбену** , отриманий у максимумі піку відповідної речовини, отриманої на хроматограмах *розчину порівняння*

ID# : 3
Retention Time : 14,997 min
Compound Name : Butamben
Spectrum Operation : None

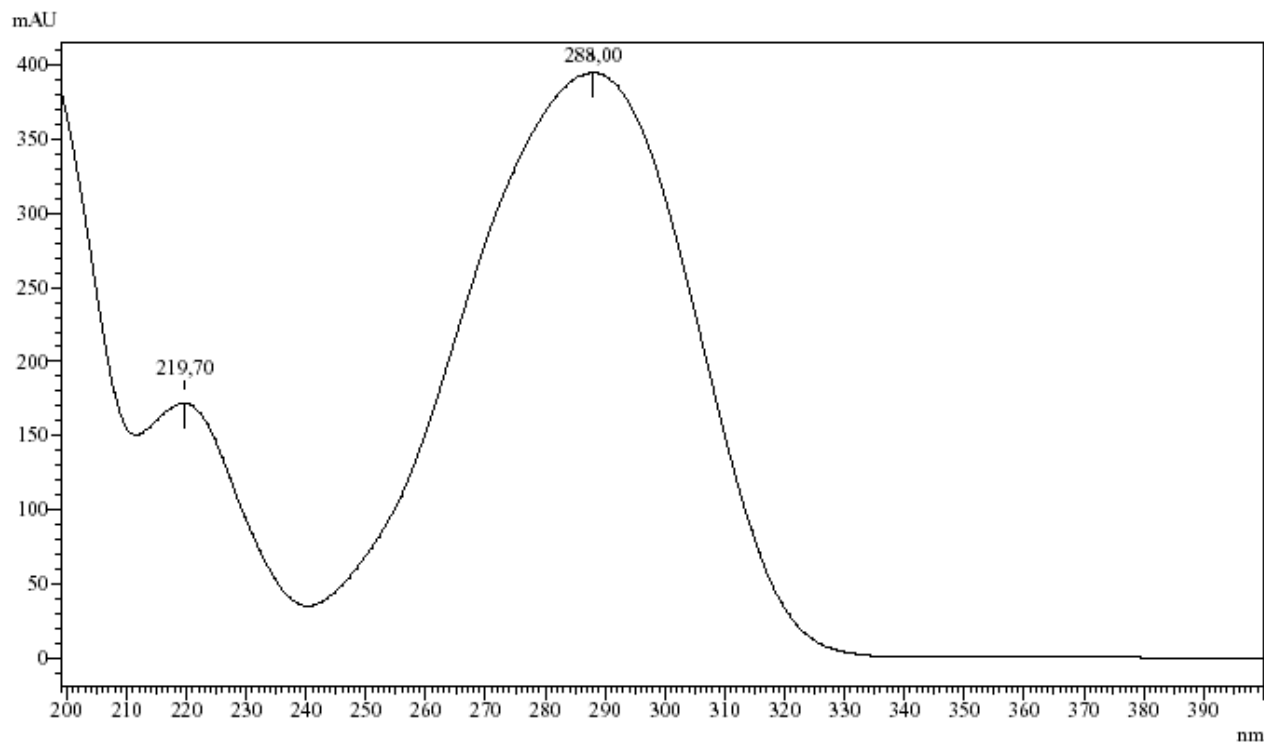


Рисунок 21 – УФ-спектр піку **бугамбену** , отриманий у максимумі піку відповідної речовини, отриманої на хроматограмах *випробуваного розчину*