

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. Каразіна

Кафедра хімічної метрології

УДК 543.544.5

Д о з а х и с т у д о п у с к а ю

_____ Завідувач кафедри

«___» _____ 2023 р. д.х.н., проф. Олег ЮРЧЕНКО

**КВАЛІФІКАЦІЯ ВТОРИННОГО СТАНДАРТУ ПАРАЦЕТАМОЛУ, ЩО
ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ У КІЛЬКІСНІЙ ВЕРХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ
ПРЕПАРАТІВ**

Кваліфікаційна робота магістра

II курсу хімічного факультету

ЄРЬОМЕНКО МАРІЇ ВІКТОРІВНИ

Науковий керівник:

к.х.н., доцент

Наталія ЛЕОНОВА

ХАРКІВ 2023

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота складається з 40 сторінок, 2 розділів, 6 рисунків, 5 таблиць, 42 формул, 1 графіка та 40 літературних посилань.

Мета роботи: проведення кваліфікації вторинного стандарту парацетамолу з використанням процедури порівняння з фармакопейним стандартним зразком та можливість застосування для аналізів кількісного визначення у рутинному аналізі в лабораторіях контролю якості.

Об'єкт дослідження: вміст діючої речовини парацетамолу у вторинному стандартному зразку.

Методи дослідження: високоефективна рідинна хроматографія.

Результати: розроблений оптимальний метод пробопідготовки з метою зменшення невизначеності атестації стандарту, отримані результати кількісного визначення вторинного стандартного зразку – вміст парацетамолу 99,8%, розраховані критерії прийнятності загальної невизначеності методики аналізу робочого стандартного зразку – однорідність та рівноточність вибірок була підтверджена, невизначеність пробопідготовки дорівнює 0,1581 та 0,1597, невизначеність кінцевої аналітичної операції склала 0,2583 та 0,2767, а невизначеність атестації робочого стандартного зразку склала 0,3029 та 0,3195 для двох вибірок відповідно.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ПАРАЦЕТАМОЛ, СТАНДАРТНИЙ ЗРАЗОК, КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ, АНАЛІЗ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ, ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ.

ABSTRACT

The qualification paper consists of 40 pages, 2 chapters, 6 figures, 5 tables, 42 formulas, 1 chart and 40 references.

The purpose of the work: qualification of the secondary standard of paracetamol using the procedure of comparison with the pharmacopoeial standard sample and the possibility of application for quantitative determination analyzes in routine analysis in quality control laboratories.

The object of the study: the content of the active ingredient paracetamol in the secondary standard sample.

Research methods: high performance liquid chromatography.

Results: the optimal method of sample preparation was developed in order to reduce the uncertainty of standard attestation, the results of the quantitative determination of the secondary standard sample were obtained – the content of paracetamol was 99,8%, the acceptance criteria of the general uncertainty of the method of analysis of the working standard sample were calculated – the homogeneity and equiaccuracy of the samples were confirmed, the uncertainty of sample preparation is 0,1581 and 0,1597, the uncertainty of the final analytical operation was 0,2583 and 0,2767, and the uncertainty of the attestation of the working standard sample was 0,3029 and 0,3195 for the two samples, respectively.

KEY WORDS: PARACETAMOL, STANDARD SAMPLE, QUALITY CONTROL, ANALYSIS OF MEDICINAL PRODUCTS, HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ ТА	
ТЕРМІНІВ.....	5
ВСТУП.....	6
1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	7
1.1 Загальна характеристика парацетамолу.....	7
1.2 Методи ідентифікації та кількісного визначення парацетамолу.....	8
1.3 Класифікація стандартних зразків.....	11
1.4 Атестація вторинних стандартних зразків.....	13
1.4.1 Загальні положення.....	15
1.4.2 Вимоги до обладнання.....	16
1.4.3 Процедура.....	17
1.4.4 Область застосування робочих стандартних зразків.....	18
1.4.5 Методика атестації робочих стандартних зразків.....	19
1.4.6 Розрахунок однорідності та невизначеності.....	21
1.4.7 Фасування та етикетування робочих стандартних зразків.....	24
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	26
2.1 Реактиви та обладнання.....	26
2.2 Попередні розрахунки невизначеності атестації.....	26
2.3 Контроль лінійності методики.....	27
2.4 Методика проведення аналізу.....	28
2.5 Результати та їх обговорення.....	29
2.5.1 Невизначеність атестації робочого стандартного зразка.....	29
2.5.2 Статистична обробка результатів.....	30
2.6 Охорона праці.....	32
ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ДЖЕРЕЛ.....	35
ДОДАТКИ.....	39

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

АНД – аналітична нормативна документація

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ГЛЗ – готовий лікарський засіб

КАО – кінцева аналітична операція

ЛЗ – лікарський засіб

МО – міжнародні одиниці

НФ – нерухома фаза

РСЗ – робочий стандартний зразок

РФ – рухома фаза

СЗ – стандартний зразок

ФСЗ ДФУ – фармакопейний стандартний зразок Державної фармакопеї України

Δ – невизначеність зважування

Δ_{FAO} – невизначеність кінцевої аналітичної операції

Δ_{SP} – невизначеність пробопідготовки

$\Delta_{\text{РСЗ}}$ – невизначеність атестованого значення робочого стандартного зразку

A – вимірювана величина

a – вільний член лінійної залежності

b – кутовий коефіцієнт лінійної залежності

f – ступені свободи

F – критерій Фішера

ICH – Міжнародна конференція з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських засобів для використання людиною

$\max \Delta_{\text{As}}$ – гранична невизначеність результату фармацевтичного аналізу

n – об'єм вибірки

P – довірна ймовірність

R – розмах варіювання

s – стандартне відхилення

s^2 – дисперсія

t – критерій Стюдента

RSD – відносне стандартне відхилення

Q_1 , Q_n – контрольні критерії для ідентифікації грубих похибок

ВСТУП

Пошук нових лікарських препаратів, розробка нових та удосконалення існуючих методів контролю якості лікарських речовин для забезпечення їхньої ефективності, безпеки і стабільності є тими напрямками, на які орієнтується сучасна фармацевтична хімія. Все більш чіткі вимоги висуваються до методів та методик, що використовуються при оцінці якості лікарських засобів.

Використання сучасних та перспективних фізико-хімічних методів набуває все більшого розвитку у зв'язку зі збільшенням чисельності та різноманітності органічних сполук у фармацевтичному аналізі, які треба аналізувати, завдяки своїй точності та чутливості. Тому відбувається перехід від традиційних хімічних методів до складних з використанням приладів, що супроводжується зсувом від абсолютних методів аналізу до порівняльних, в яких ключовим аспектом є порівняння з якимось стандартом, що застосовується як 100% речовина або, якщо застосовуються міжнародні одиниці, як її стандарт. Така постановка завдання вимагає створення стандартів та передбачає наявність єдиного міжнародного зразка (первинного стандарту), з яким проводиться порівняння будь-якого національного стандарту. Лише в такому разі можна забезпечити єдність вимірювання та сумісність одержуваних результатів (простежуваність).

Використання лише фармакопейних стандартних зразків (ФСЗ) для рутинних аналізів дуже затратне для фармацевтичних підприємств. З іншого боку, можна стверджувати, що фармакопеї, ФСЗ яких використовують виробники лікарських засобів, просто не мають запасів відповідних ФСЗ для забезпечення рутинного аналізу. Таким чином, для фармацевтичної галузі гостро постає проблема оптимізації використання офіційних стандартних зразків – вторинних (робочих) стандартних зразків.

Оскільки парацетамол широко використовується для багатоаспектних застосувань, надзвичайно важливо забезпечити правильний відсоток парацетамолу у ліках на рівні виробництва, оскільки завищене відсоткове маркування може призвести до надмірного накопичення парацетамолу в організмі людини. Знову ж таки, занижене відсоткове маркування може призвести до неефективної дози проти цільових хвороб [1].

Таким чином, необхідно розробити простий, швидкий, відтворюваний і точний метод кількісного визначення вторинного стандарту парацетамолу, щоб аналіз парацетамолу у фармацевтичних препаратах проводився надійно, оскільки це безпосередньо вплине на якість лікарських засобів, які містять парацетамол.

1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Загальна характеристика парацетамолу

Парацетамол (N-ацетил-p-амінофенол, хімічна формула $C_8H_9NO_2$, $HO-C_6H_4-NHCOCH_3$) – це один із найчастіше використовуваних фармацевтичних препаратів, який відомий як нестероїдний протизапальний засіб і використовується в лікуванні полегшення болю та для зниження температури [2]. Парацетамол входить до списку найважливіших лікарських засобів Всесвітньої організації охорони здоров'я. За фармакологічною групою відноситься до N02B E01 — ненаркотичні анальгетики–антипіретики [3].

Цей препарат знімає лихоманку, легкий або гострий біль, головний біль, мігрень, хронічний кашель і застуду, невралгію, м'язові болі, болі в спині та суглобах [2, 3]. Оскільки парацетамол легко та повністю метаболізується, очікується, що він не матиме жодних шкідливих побічних ефектів, якщо його приймати в обмеженій дозі. Однак споживання вищих доз парацетамолу може спричинити накопичення токсичних метаболітів, що може спричинити висипання на шкірі, ураження нирок, розлади печінки та запалення підшлункової залози [4].

За хімічною будовою парацетамол є ацильованим ароматичним амідом (Рис. 1.1).

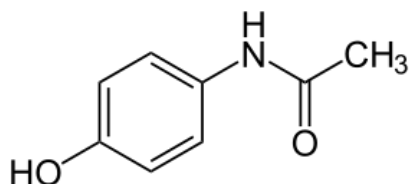


Рис. 1.1 Структурна формула парацетамолу

Вихідною сполукою при синтезі парацетамолу є фенол (Рис. 1.2).

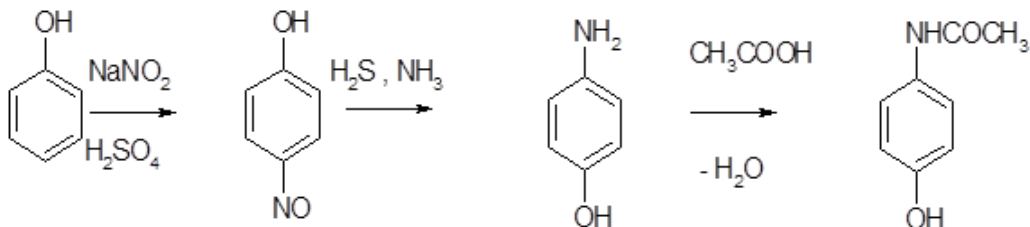


Рис. 1.2 Схема синтезу парацетамолу

За походженням парацетамол є синтетичним АФІ – активним фармацевтичним інгредієнтом. За агрегатним станом парацетамол є безбарвними кристалами або дрібнокристалічним порошком білого або білого з кремовим або рожевим відтінком без запаху. Зберігають в захищеному від світла місці у герметично закупореній тарі [4].

1.2 Методи ідентифікації та кількісного визначення парацетамолу

Ідентифікацію парацетамолу проводять за температурю плавлення та поглинанням світла в УФ-області. Крім того, проводять порівняння ІЧ-спектру зі спектром стандартного зразку парацетамолу [5].

Дійсність парацетамолу можна підтвердити якісною реакцією з калію дихроматом (Рис. 1.3) [6]. Для цього попередньо проводять кислотний гідроліз парацетамолу при кип'ятінні розчину, що містить 0,1 г парацетамолу в 1 мл HCl , протягом 3 хвилин. Розчин охолоджують та додають 0,05 мл 0,0167 моль/л калію дихромату. 4-амінофенол окислюється в хінонімін, який вступає в реакцію із залишком 4-амінофенолу. В результаті реакції утворюється індофеноловий барвник фіолетового кольору.

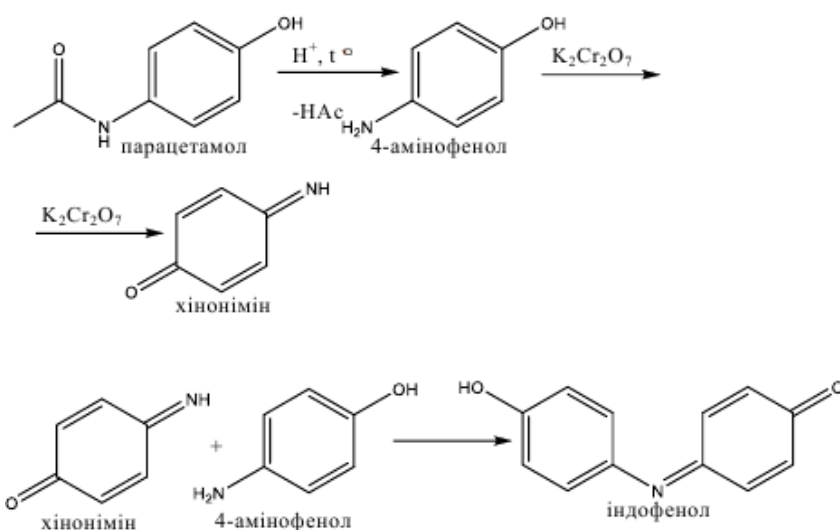


Рис. 1.3 Реакція парацетамолу з калію дихроматом

З ферум (III) хлоридом утворюється комплексна сполука синьо-фіолетового забарвлення (Рис. 1.4).

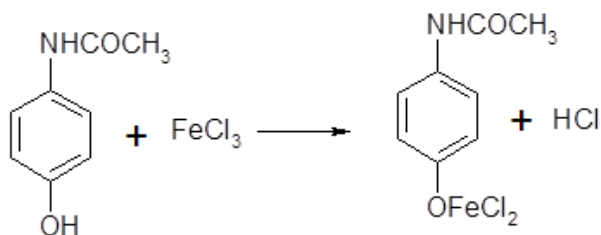


Рис. 1.4 Реакція парацетамолу з ферум (III) хлоридом

Також однією з реакцій ідентифікації парацетамолу є реакція нагрівання субстанції у відкритій чашці з розведеною сульфатною кислотою – з'являється запах оцтової кислоти.

За ДФУ [7] парацетамол кількісно визначають після кип'ятіння з розбавленою хлоридною кислотою. Продукт кислотного гідролізу – п-амінофенол визначають

кількісно, додавши калій бромід, методом нітритометрії, точку еквівалентності встановлюють потенціометрично або за йодкрохмальним папером (Рис. 1.5).

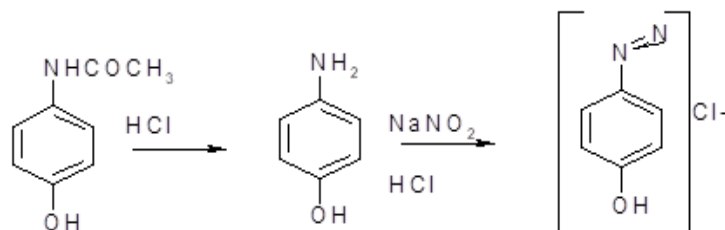


Рис. 1.5 Реакція гідролізу парацетамолу з подальшим визначенням п-амінофенолу

Кількісне визначення парацетамолу проводиться також методом електрохімічного окислення у роботі [8] виключно з використанням полікристалічного золотого електрода, модифікованого йодним адсорбуючим шаром [I_(ads)|Au(pc)] у лужному середовищі. Експерименти із зондування показали, що електрод [I_(ads)|Au(pc)] досяг лінійного динамічного діапазону від 4,5 до 1600 мкМ парацетамолу.

Одночасне розділення компонентів у багатокомпонентному препараті неможливе методом спектрофотометрії через накладання спектрів. У роботі [9] спектрофотометрія УФ–видимого діапазону разом із безперервним вейвлет–перетворенням (CWT) і методом багатовимірної калібрування методом часткових найменших квадратів (PLS) був представлений для одночасного визначення парацетамолу, дифенгідраміну і фенілефрину у таблетованій лікарській формі як швидкий, простий, недорогий і точний метод, без використання трудомісткої стадії екстракції. Перевірку цих методів проводили шляхом аналізу різноманітних синтетичних сумішей із певними концентраціями.

Легка стратегія електрофоретичного осадження була використана у роботі [10] для виготовлення тонкоплівкового фотоелектрохімічного (ПЕС) сенсора з функціоналізованих N–легованих графенових квантових точок (F–NGQD), вбудованих у нанопласти BiOBr, які були підготовлені за допомогою двоетапного гідротермального методу, завантаженого на скляну підкладку, покриту оксидом індію–олова (F–NGQDs/BiOBr/ITO). Вимірювання продуктивності зондування показали, що фотоелектрод F–NGQDs/BiOBr/ITO має вищий струм фотоелектричного відгуку на парацетамол, його використовували для виявлення слідів парацетамолу під опроміненням видимого світла. Датчик продемонстрував широкий лінійний діапазон, низьку межу виявлення та хорошу чутливість, враховуючи фотоактивність гетеропереходу NGQD/BiOBr. Розроблений датчик ПЕС демонстрував достатню реакцію на парацетамол у лінійному діапазоні 0,01–20,0 мкМ з межею виявлення 3,33 нМ за оптимальних умов.

Одночасне вольтамперометричне визначення пентоксифіліну і парацетамолу було досліджено в роботі [11] за допомогою модифікованого графеновими нанопластівцями

скловугільного електрода (GrNF/GCE) у лікарських і біологічних зразках. Синтезовані пластівці були охарактеризовані за допомогою різних аналітичних методів, а поведінка переносу електронів GrNF була підтверджена методами CV та EIS. Електрокаталітичне окислення пентоксифіліну і парацетамолу в GrNF/GCE відбувалося при потенціалах +1,220 В і + 0,190 В. Ця система забезпечує високий рівень чутливості в присутності надлишкової концентрації легко окислюваних заважаючих біологічних молекул і демонструє кращу відтворюваність і повторюваність. Ця система була ефективно застосована для визначення пентоксифіліну і парацетамолу в реальних зразках.

Методи кількісного визначення парацетамолу на основі ВЕРХ більше поширені, ніж методи газової хроматографії, оскільки парацетамол є нелеткою речовиною. ВЕРХ забезпечує високу точність та чутливість визначення, але застосування цих методів обмежують високі вартості приладів та трудомісткість аналізу. Крім того, проведення аналізів цим методом потребує висококваліфікованого персоналу.

Для кількісного визначення парацетамолу в роботі [12] було розроблено та перевірено метод високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою/діодною матрицею в культуральній рідині клітин з моделі гематоенцефалічного бар'єру *in vitro*. Хроматографічний метод і підготовка зразків були розроблені з використанням тільки водних розчинників. Використовувалася колонка XTerra RP18 150 × 4,6 мм, 3,5 мкм із предколонкою XTerra RP18 20 × 4,6 мм, 3,5 мкм при 35 °С, а рухома фаза складалася з 100% форміатного буфера 20 мМ при рН 4. Швидкість потоку була встановлена на 1 мл/хв. Виявлення відбувалося методом ВЕРХ з УФ детектором при 242 нм. Об'єм інжекції становив 10 мкл. Аналітичну процедуру перевірено з допустимими межами ±10% у діапазоні концентрацій від 1 до 58 мг/л. Потім цю процедуру використовували в звичайних умовах для визначення концентрації парацетамолу в мозковій гематобар'єрній моделі *in vitro*.

Спектри ¹H ЯМР, отримані з 56 різних таблеток парацетамолу, були ретельно досліджені для аналізу та кількісного визначення в роботі [13] не тільки парацетамолу, але й допоміжних речовин і можливих незначних компонентів, присутніх у композиціях. У спектрах ЯМР спостерігалася амідно-імінольна таутомерія парацетамолу, причому імінольна форма була присутня в кількості лише 0,80% від амідної форми. Крім того, було ідентифіковано сімнадцять різних компонентів таблеток, починаючи від основних допоміжних речовин, таких як крохмаль і полівінілпіролідон, до другорядних компонентів, таких як різні парабени, сорбат і триацетин. Подібність усіх спектрів по відношенню до кожного з інших спектрів була розрахована, і на основі таблиці подібності був виконаний ієрархічний кластерний аналіз (HCA). Кожен із компонентів екстрактів

ДМСО таблеток було визначено кількісно, забезпечивши таблицю компонентів, яку також використовували для НСА. Визначено, що кількісний аналіз парацетамолу має точність 0,2% з використанням сигналів залишкового розчинника як внутрішнього стандарту.

1.3 Класифікація стандартних зразків

У відповідності до ДФУ [7] стандартний зразок – це засіб вимірювань у вигляді певної кількості речовини або матеріалу, призначене для відтворення і зберігання розмірів величин, що характеризують склад і властивості цієї речовини (матеріалу), значення яких встановлені в результаті метрологічної атестації, що використовується для передачі розміру одиниці при повірки, калібрування, градуюванні засобів вимірювань, атестації методик виконання вимірювань, затверджене в якості стандартного зразка в установленому порядку.

Стандартні зразки мають декілька класифікацій:

- за природою нормованої речовини:
 - СЗ складу;
 - СЗ властивостей;
- за призначенням:
 - для якісного аналізу;
 - для кількісного аналізу;
- класифікація за ISO Guide 30 [14]:
 - стандартні зразки (Reference material; RM);
 - сертифіковані (атестовані) стандартні зразки (Certified reference material; CRM);

Сертифікований стандартний зразок на відміну від стандартного зразку має точно установлене атестоване значення, атестоване значення встановлене в лабораторії, акредитованій по ISO 17025, значення приведене з невизначеністю, значення має метрологічну простежуваність до еталонів та обов'язково супроводжується паспортом [7].

- класифікація за ISO Guide 30 [14]:
 - первинні СЗ;
 - вторинні СЗ;

Первинний стандартний зразок – це речовина, характеристики якої атестовані без порівняння з іншою хімічною речовиною. Фармакопейний СЗ зазвичай є первинним; вторинний – речовина, характеристики якої атестовані та/чи розраховані шляхом порівняння з іншим СЗ. Зазвичай обсяг атестації для вторинного СЗ менший, ніж для первинного. Усі робочі СЗ є вторинними [15].

У СРСР у фармацевтичній галузі існувала система СЗ, яку можна назвати однорівневою. Нині у країнах, де діють правила Належної виробничої практики (GMP),

діє система СЗ, яку можна назвати «дворівневою». Робочий СЗ (РСЗ): використовується для поточкових аналізів замість офіційного СЗ за умови, що він відкалібрований за офіційним СЗ. Він має статус СЗ підприємства [16].

У дворівневій системі вторинний СЗ атестують в умовах методики, в якій використовується відповідний первинний СЗ/ФСЗ. Тому методологічно атестувати вторинний СЗ просто. Калібрування вторинного СЗ за загальновизнаним СЗ автоматично забезпечує простежуваність результатів аналізу і таким чином взаємовизнання висновку про якість. У дворівневій системі вторинні СЗ можуть використовуватись замість будь-якого ФСЗ за дотримання зазначених вище умов. Призначення такої «дворівневої» системи – зменшити витрати дорогих ФСЗ у рутинних аналізах [17].

- за галузевою належністю:
 - фармацевтичні СЗ;
 - фітостандарти;
 - стандарти для екологічного контролю;
 - тощо;

Фармацевтичні СЗ – стандартні зразки, які призначені для аналізу лікарських засобів (фарм. субстанцій та лікарських препаратів). Фармацевтичний СЗ розробляє виробник ЛП для контролю його якості відповідно до реєстраційного досьє [18]. Далі вводять у дію аналогічний Фармакопейний СЗ, що атестують і підтримують фармакопейним органом; він має статус офіційного галузевого СЗ і використовується в арбітражних аналізах і в будь-яких сумнівних випадках [16].

Якщо для фармацевтичного СЗ не наводяться будь-які додаткові вимоги, його використовують у такому вигляді, в якому він отриманий, без додаткових перерахунків. Більшість СЗ постачають у вигляді порошку, але деякі – у вигляді розчинів. СЗ переважно постачають у контейнері для одноразового використання. Фармацевтичні СЗ зберігаються при температурі 2–8 °С. Однак деякі нестабільні субстанції/препарати можуть вимагати зберігання при температурі –20 °С, а вакцини – при –80 °С [19].

Фармакопейні стандартні зразки імпортного виробництва мають свої недоліки: малий об'єм: 10–100 мг, якого вистачає на 1–2 аналізу; висока ціна; строк постачання від 90 днів; для деяких сполук ФСЗ взагалі відсутні.

- за «областю використання»:
 - міжнародні СЗ;
 - національні (державні) СЗ;
 - галузеві СЗ;
 - СЗ підприємства.

За ДФУ [7] міжнародний стандартний зразок – це первинний стандартний зразок, активність якого виражена в Міжнародних одиницях (МО). Еквівалентність МО міжнародного СЗ затверджена Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ).

При випробуваннях готових лікарських засобів можна використовувати для порівняння не стандартні зразки, а інші речовини порівняння, наприклад [20]:

- для показників якості «ідентифікація», «сторонні домішки» — саму субстанцію, реактив чи сам препарат у розведенні;
- для показників «однорідність дозування» і «розчинення» — субстанцію, якщо піврізниця верхнього і нижнього значень допустимого вмісту основної речовини в субстанції менше 1,4%.
- для показника «кількісне визначення» — субстанцію, якщо піврізниця верхнього і нижнього значень допустимого вмісту основної речовини в субстанції менше 1,0%, а допустиме відхилення значення вмісту основної речовини в готовому лікарському засобі, відповідно до методики випробування, не менше 10%.

В останніх випадках вміст основної речовини в субстанції приймається за 100%.

1.4 Атестація вторинних стандартних зразків

Вторинні стандарти необхідні для багатьох методів аналізу, наприклад, для кількісного ЯМР (qNMR) аналізу, що показано в роботі [21], для отримання точних і точних результатів. У цьому дослідженні ацетанілід був створений і використаний як основний стандарт. В якості вторинних стандартів було обрано шість інших хімічних речовин: 3,4,5–трихлорпіридин, диметилтерефталат, малеїнова кислота, 3–сульфолон, 1,4–біс(триметилсиліл)бензол і 1,3,5–триметоксибензол. Вторинні стандарти кількісно визначали за допомогою первинного стандарту ацетаніліду. Було розроблено протокол для кваліфікації та періодичних перевірок цих вторинних стандартів і використано для оцінки стабільності сполук. Чистота була вищою за 99% для всіх вторинних стандартів. Було показано, що обрані вторинні стандарти є придатними стандартами qNMR і що періодична перекваліфікація стандартів за допомогою qNMR забезпечує надійні аналітичні результати. Ці стандарти використовувалися в лабораторії для перевірки відповідності фармацевтичних активних речовин і схвалених лікарських засобів, а також для аналізу ймовірних нелегальних ліків. Загалом було випробувано понад 1000 зразків із використанням внутрішньої та зовнішньої стандартизації та наведено приклади.

Фітостандарти також можна атестувати, що показано в роботі [22]. Хміль є добре відомим і вже часто використовуваним естрогенним фітотерапевтичним засобом, що містить цікаві пренілфлавоноїди, ксантогумол (XN), ізоксантогумол (IXN), 8– і 6– пренілнарінгенін (8–PN і 6–PN). Оскільки використання вторинних стандартів може

сформувати рішення кожного разу, коли потрібне визначення певних компонентів, комерційно недоступних або занадто дорогих, було вирішено розробити доступний метод HPLC–DAD для визначення цих пренілфлавоноїдів. Кількості визначали в екстракті хмелю та капсулах з використанням кверцетину та нарингеніну як вторинних стандартів. Після оптимізації підготовки зразка та умов ВЕРХ аналіз було підтверджено згідно з рекомендаціями ІСН. Функція відповіді XN, 8–PN, кверцетину та нарингеніну показала лінійну залежність. Для визначення XN необхідно побудувати лінію калібрування щонайменше трьох концентрацій кверцетину. Крім того, шляхом аналізу препаратів, що містять екстракти хмелю на бельгійському ринку, було показано, що метод придатний для його використання, а саме визначення XN, IXN, 8–PN та 6–PN в екстракті та капсулах хмелю з використанням кверцетину та нарингеніну як вторинні стандарти.

Вторинні стандарти активно використовуються в фармацевтичній промисловості, наприклад, як в роботі [23], яка в основному була спрямована на валідацію методики визначення вмісту саліцилової кислоти та окремих невідомих домішок у новому лікарському засобі — таблетках, що містять: 75, 100 або 150 мг ацетилсаліцилової кислоти та гліцин у кількості 40 мг на кожну дозу. Розділення компонентів проводили за допомогою ВЕРХ, використовуючи колонку Waters Symmetry C18 (4,6 × 250 мм, 5 мкм) як нерухому фазу. Рухома фаза складалася із суміші 85% ортофосфорної кислоти, ацетонітрилу та очищеної води (2:400:600 об/об/об). Детектування проводили при довжині хвилі 237 нм з постійною швидкістю потоку 1,0 мл/хв. Для перевірки методу були визначені лінійність, прецизійність (повторюваність і відтворюваність), точність, специфічність, діапазон, надійність, точність системи, стабільність тесту та стандартного розчину, межа кількісного визначення та примусова деградація. Тести валідації проводили відповідно до рекомендацій ІСН. Метод успішно перевірено. Було підтверджено, що метод у перевіреному діапазоні 0,005–0,40% саліцилової кислоти щодо вмісту ацетилсаліцилової кислоти є лінійним, точним і точним. У дослідженні використовувалися наступні матеріали: фармацевтичні вторинні стандарти (Certified Reference Material) ацетилсаліцилової кислоти, саліцилової кислоти та гліцину (Fluka).

Автори статей описують процес розробки та сертифікації стандартного зразку парацетамолу в людській сировотці [24, 28, 30] та фармацевтичних препаратів [25, 29]; провели необхідні випробування для підтвердження стабільності, гомогенності та сертифікували зразок у відповідності з міжнародними стандартами. Описані в роботі сертифіковані матриці можуть бути використані для калібровки та перевірки точності аналітичних методів визначення парацетамолу в людській сировотці та препаратах

відповідно, що дозволить забезпечити високу точність та порівнянність результатів між лабораторіями.

Також часто вторинні стандарти використовуються для створення калібрувальних кривих та контролю якості валідації методів визначення АФІ. Наприклад, в роботі [26] в якості вторинних стандартів використовувалися відомі концентрації беклометазону дипропіонату в плазмі людини методом рідинної хроматографії–мас–спектрометрії; в роботі [27] вторинні стандарти використовувалися для валідації методу рідинної хроматографії–мас–спектрометрії для кількісного визначення доксорубіцину та даунорубіцину в крові та тканинах щурів; використовувалися вторинні стандарти для калібровки мас–спектрометру при аналізі метформіну та ліналіптину в плазмі крові людини в роботі [31] та при аналізі івакафтору та його метаболітів в плазмі крові людини в роботі [32]. Автори використовували вторинні стандарти для перевірки лінійності, точності, відтворюваності та меж виявлення і визначення методу.

В роботі [33] описується метод високочутливої рідинної хроматографії з мас–спектрометрією для одночасного визначення гідрохлортіазиду та лізіноприлу в плазмі крові людини та його використання в клінічних дослідженнях.

1.4.1 Загальні положення

З [20] відомо, що матеріалом для атестації СЗ зазвичай служить відповідна фармацевтична субстанція (діюча або допоміжна речовина), яка є досить чистою для того, щоб її використовувати як СЗ. РСЗ повинен мати ті ж атестовані характеристики, що й офіційний СЗ, за яким був атестований даний РСЗ.

РСЗ атестуються підприємством для використання на території підприємства відповідно до затвердженої АНД, нарівні з відповідними офіційними СЗ, зазначеними в даній АНД. Для проведення арбітражних аналізів за участю будь-якої іншої сторони використовують тільки відповідні офіційні СЗ.

РСЗ атестують за офіційним СЗ, зазначеними у відповідній АНД (СЗ Європейської фармакопеї та ДФУ, фармакопеї Британії, фармакопеї США, ВООЗ) за тих же умов аналізу (тобто для кількісного визначення методом спектрофотометрії в умовах даної спектрофотометричної методики, для хроматографічного методу — у тих же хроматографічних умовах і т.д.).

Для атестації вторинних СЗ використовують такі методи аналізу, як:

- ІЧ–спектрофотометрія (для ідентифікації, у деяких випадках для кількісного визначення чи визначення чистоти);
- кількісні методики з використанням спектрофотометрії в УФ– чи видимій області; кількісні методики, що ґрунтуються на кольорових реакціях з наступним

вимірюванням інтенсивності поглинання (з використанням приладу або візуальна оцінка);

- методи розділення (хроматографія чи електрофорез) для кількісних чи якісних випробувань тощо [7].

РСЗ можуть використовуватися для аналізу лікарських субстанцій і готових лікарських засобів у таких випробуваннях:

- ідентифікація;
- випробування на чистоту;
- кількісне визначення та інші кількісні випробування («Однорідність вмісту», «Розчинення»).

Підтвердженням ідентифікації вторинного стандартного зразку є:

- в абсорбційній спектрофотометрії в ІЧ області: відповідність смуг поглинання за положенням та відносною величиною смугам поглинання первинному СЗ;
- в методах хроматографічного розділення: відстань міграції, час міграції, час утримування вторинного СЗ мають бути такими самими, як і первинного СЗ в тонкошаровій хроматографії, електрофорезі, капілярному електрофорезі, газовій або рідинній хроматографії, відповідно.

Для РСЗ, використовуваних у кількісних випробуваннях, характеристикою, що атестується, є кількісний вміст визначуваної речовини. Для даних РСЗ розраховують невизначеність вмісту, що має бути менше нормованого значення.

Атестація РСЗ проводиться з дотриманням принципів контролю якості і керування якістю. Атестовані РСЗ при виконанні аналізу необхідно використовувати з дотриманням принципу просліджуваності. Просліджуваність – якість результатів вимірювань або атестованого значення для СЗ, коли вони можуть бути віднесені до офіційного значення (зазвичай до національного або міжнародного стандарту) за допомогою нерозривного ланцюжка вимірювань, для кожної ланки якого відома невизначеність [34].

1.4.2 Вимоги до обладнання

Мірний посуд необхідно використовувати такий, що відповідає вимогам, тобто похибка об'ємів використовуваного мірного посуду має бути документально підтверджена постачальником посуду.

Похибка вимірювання для використовуваних приладів має бути така, щоб забезпечити виконання вимог щодо невизначеності вмісту РСЗ для зазначених у методиці атестації пробопідготовки і числа паралельних вимірювань. Усі вимірювальні прилади мають звірятися через визначений інтервал відповідно до інструкції, у якій мають бути

встановлені критичні значення для точності, правильності тощо. Мають вестися відповідні записи щодо проведення перевірки.

Спектрофотометри, використовувані для атестації РСЗ, мають відповідати вимогам ДФУ (2.2.25. Спектрофотометрія в УФ і видимій області). Хроматографи, використовувані для атестації РСЗ, мають забезпечувати виконання критеріїв, зазначених у методиці атестації РСЗ.

Необхідно використовувати ваги, що забезпечують похибку зважування не більш 0,2 мг. Проте для атестації деяких РСЗ може бути необхідне використання ваг із меншою похибкою зважування (першого класу точності).

1.4.3 Процедура

На підприємстві має бути призначена особа, відповідальна за атестацію, використання і зберігання усіх використовуваних РСЗ.

Процедура повинна виглядати так:

- визначити область застосування даного РСЗ;
- відібрати матеріал для атестації (субстанцію) у кількості, необхідній для виконання аналізів для атестації та подальшого використання РСЗ протягом його терміну придатності (зазвичай 2 роки);
- якщо не було виконано раніше, виконати аналіз вихідного матеріалу (субстанції) на відповідність АНД і оформити протокол аналізу вихідного матеріалу (аналітичний листок);
- для РСЗ, використовуваних для кількісних випробувань, провести атестацію на присвоєння кількісного вмісту;
- виходячи з АНД на випробуваний ЛЗ, розробити пояснювальну записку, в якій:
 - визначити вимоги до невизначеності РСЗ; якщо вимог декілька, використовувати найбільш жорсткі;
 - визначити можливість атестації РСЗ в однакових умовах (при необхідності); якщо потрібно, встановити додаткові вимоги до чистоти матеріалу для атестації (якщо це потрібно для запобігання атестації РСЗ в різних умовах);
 - обґрунтувати потрібність (або її відсутність) перевірки однорідності РСЗ;
 - розробити для атестації пробо підготовку (наважки та розведення), розрахувати її невизначеність та визначити вимоги до збіжності вимірювань в залежності від їх числа;
 - встановити термін придатності та умови зберігання або (якщо потрібно) описати процедуру моніторингу за терміном придатності;

- розробити методику атестації РСЗ, в якій при необхідності врахувати додаткові вимоги до чистоти матеріалу для атестації та перевірку однорідності РСЗ;
- провести атестацію РСЗ відповідно до розробленої методики атестації;
- оформити протокол атестації РСЗ на присвоєння кількісного вмісту;
- встановити фасування та етикетування РСЗ;
- оформити сертифікат на РСЗ, а також (якщо потрібно) інструкцію щодо використання і зберігання РСЗ.

Має бути підготовлений звіт, що містить результати випробувань для затвердження і інформацію про використання стандартного зразка. Звіт для хімічного СЗ, призначеного для кількісного визначення, включає присвоєне значення кількісного вмісту разом з обґрунтуванням присвоєння даного показника. Для присвоєного значення розраховують невизначеність. Для числового значення характеристики, що атестують, повинні бути заздалегідь установлені вимоги до невизначеності (оцінка фактичної невизначеності вказується в сертифікаті на дану серію РСЗ) – однобічний довірчий інтервал для ймовірності 95%.

Аналітична документація на РСЗ включає:

- пояснювальну записку;
- методику атестації РСЗ, якщо вони будуть використовуватися для кількісних випробувань;
- інструкцію щодо використання та зберігання РСЗ (при необхідності);
- протокол аналізу (аналітичний лист);
- протокол атестації РСЗ на присвоєння кількісного вмісту;
- сертифікат на РСЗ.

Після закінчення терміну придатності стандарту, його необхідно переатестувати або вилучити. Потрібно своєчасно переглядати АНД на РСЗ з урахуванням накопиченого досвіду, а також у зв'язку з переглядом/розробкою АНД, у якій використовується даний РСЗ.

1.4.4 Область застосування робочих стандартних зразків

Область застосування РСЗ не може бути ширше області застосування офіційного СЗ, використаного для його атестації, тобто РСЗ може використовуватися тільки в тих методиках, для яких застосовується офіційний СЗ. Визначити, для використання у відповідності до якої АНД призначений даний РСЗ, для яких показників якості і з використання яких методів аналізу. РСЗ може бути атестований для використання більш, ніж для однієї АНД.

Якщо РСЗ призначений для використання в різних кількісних випробуваннях, в пояснювальній записці обґрунтовують можливість атестації в одних умовах. Якщо це неможливо, в методику атестації включають декілька процедур атестації РСЗ в необхідних умовах. Якщо кількісний вміст для РСЗ у різних умовах атестації розрізняються більш, ніж на припустиму невизначеність РСЗ, оформлюють більш одного сертифікату РСЗ. У сертифікатах вказують різні області застосування РСЗ та різні кількісні вмісти. [35]

1.4.5 Методика атестації робочих стандартних зразків

Вміст діючої речовини встановлюють:

- з використанням офіційного СЗ;
- з використанням тих самих умов аналізу, що і у методиці, у якій передбачається використання даного РСЗ (наприклад, для хроматографічних методик – та сама рухома фаза, довжина хвилі детектування тощо);
- у тих самих одиницях, що і в АНД, в якій використовуватиметься даний РСЗ;
- з урахуванням вимог до невизначеності вмісту.

Для атестації РСЗ необхідно використовувати валідовані методики.

Методику атестації розробляють з урахуванням вимог до невизначеності вмісту РСЗ. Необхідне значення невизначеності вмісту досягають за рахунок використання коректної процедури пробопідготовки (вибір наважок і розведень) і забезпечення необхідної точності вимірювання при використанні кінцевої аналітичної операції (КАО).

Для випробуваного розчину та розчину порівняння виконують однакове число вимірювань у КАО. Відразу після одержання мінімальної кількості результатів вимірювань, вказаної в методиці атестації, розрахувати S_p та перевірити результати.

Вміст речовини, що атестується, в РСЗ розраховується за формулою:

$$X_{PC3} = \frac{\bar{R}_{PC3} \cdot X_{C3}}{\bar{R}_{C3}} \quad (1.1)$$

$$\bar{R}_{PC3} = \frac{1}{n_{PC3}} \cdot \sum_{i=n_{PC3}} \left(\frac{A_i^{PC3}}{C_i^{PC3}} \right) = \frac{1}{n_{PC3}} \cdot \sum_{i=n_{PC3}} R_i^{PC3} \quad (1.2)$$

$$\bar{R}_{C3} = \frac{1}{n_{C3}} \cdot \sum_{i=n_{C3}} \left(\frac{A_i^{C3}}{C_i^{C3}} \right) = \frac{1}{n_{C3}} \cdot \sum_{i=n_{C3}} R_i^{C3} \quad (1.3)$$

де A_i^{PC3} – середнє значення аналітичного сигналу для і-го розчину РСЗ;

A_i^{C3} – середнє значення аналітичного сигналу для і-го розчину СЗ;

C_i^{PC3} – концентрація аналізованої речовини в і-му розчині РСЗ;

C_i^{C3} – концентрація аналізованої речовини в і-му розчині СЗ;

n_{C3} – кількість розчинів СЗ;

n_{PC3} – кількість розчинів РСЗ;

R_i^{PC3} – нормалізоване значення для i -го розчину PC3;

R_i^{C3} – нормалізоване значення для i -го розчину C3;

X_{C3} – вміст аналізованої речовини у C3.

Для зменшення невизначеності пробопідготовки можуть використовуватися концентрація маса/об'єм або маса/маса (якщо вона пропорційна маса/об'єм).

У звіт атестації вносять:

- «покроковий» опис методики атестації – описати проведення аналізу, у тому числі відбір проб, взяття наважок або об'ємів, умови становлення рівноваги тощо; зазначити, на яких етапах методики виконувати калібрування/верифікацію, коли виконувати процедури з контролю якості, а також навести інші необхідні посилання на розділи методики;
- обробка (обчислення) результатів – описати процедури контролю якості отриманих результатів і критерії, черговість/частоту виконання процедур; описати дії, які розпочинають у випадку одержання негативних результатів; розрахункові формули з роз'ясненням усіх символів і чисельних множників, а також вимоги до точності обчислень і ступеня округлювання одержаних даних (або посилання на дані вимоги); оформлення результатів вимірювань – вираження остаточних результатів, розрахунок невизначеності вмісту для PC3, що атестується;
- нормативні посилання.

У протоколі атестації для PC3, використовуваних для кількісних випробувань, зазначають:

- посилання на методику атестації;
- вихідний матеріал для атестації (виробник, номер серії, АНД);
- кількість PC3, що атестується;
- область застосування PC3;
- офіційний C3 (виробник, номер серії, кількісний вміст), використаний для атестації;
- кількісний вміст, одержаний за методикою атестації PC3;
- результати розрахунку невизначеності вмісту та висновки.

Згідно вимог до внутрішньої документації методика атестації PC3 включає (але не обмежується цим) наступну інформацію:

- ♦ область застосування PC3;
- ♦ необхідні реактиви, матеріали і офіційні стандартні зразки;
 - подробиці, що стосуються техніки безпеки при поводженні з реактивами/матеріалами, інструкції щодо утилізації;

- кваліфікацію реактивів;
- необхідну інформацію щодо приготування розчинів/реактивів, у тому числі послідовність приготування реактивів, якщо потрібно; мають бути однозначно зазначені одиниці концентрації (м/м, м/об тощо);
- умови зберігання і терміни придатності розчинів і реагентів.
- ♦ використовуване обладнання;

Навести перелік використовуваного обладнання, описати підготовку обладнання до роботи і використовувані налаштування. Для ваг зазначити необхідні діапазони вимірювань. Зазначити критерії ефективності роботи обладнання і вимоги до його верифікації (у т.ч. норми похибки), дати необхідні посилання на виконання калібрування та інструкції з експлуатації обладнання. Для мірного посуду зазначити клас точності або максимально допустиму невизначеність (відповідно до НД або документації виробника мірного посуду).

- ♦ перевірка/калібрування обладнання;

Зазначити критичні стадії виконання аналізу. Дати посилання на відповідні розділи методики. Для обладнання описати/дати посилання на процедури перевірки/калібрування, з вказівкою часу і частоти проведення і критеріїв;

- ♦ пробопідготовка та пробовідбір.

Зазначити умови зберігання зразків, правила та умови роботи з ними і описати процедури щодо утилізації.

1.4.6 Розрахунок однорідності та невизначеності

Невизначеність результатів аналізу є найважливішим показником якості результатів аналізу. Без оцінки невизначеності отриманих результатів неможливо оцінити коректність результатів, тобто зробити висновок, чи була допущена лабораторна помилка (контроль «хибнопозитивних» й «хибнонегативних» результатів) [36].

Вимоги до невизначеності вмісту для РСЗ не повинні бути більш жорсткими, ніж 0,5%.

Вимоги до невизначеності вмісту для РСЗ визначаються такими факторами [37]:

- призначений РСЗ для аналізу субстанції або готового лікарського засобу (ГЛЗ);
- для якого випробування призначений РСЗ (ідентифікація, визначення чистоти, кількісне визначення, однорідність дозування, розчинення);
- допустимими за відповідною АНД межами вмісту для аналізованого ЛЗ.

Випробування «Кількісне визначення»:

Невизначеність пробопідготовки є незначущою, якщо для неї виконуються наступні вимоги:

- для ГЛЗ:
$$B = \frac{B_H - B_L}{B_H + B_L} \cdot 100 \quad (1.4)$$

$$\Delta_{As} \leq 0.32 \cdot B \quad (1.5)$$

$$\Delta_{SP} \leq 0.1 \cdot B, \quad (1.6)$$

де B – різниця між верхньою та нижньою межами вмісту, виражених у відсотках, ділених на 2.

- для субстанцій: $B = B_H - 100 \quad (1.7)$

$$\Delta_{As} \leq B \quad (1.8)$$

$$\Delta_{SP} \leq 0.32 \cdot B, \quad (1.9)$$

де B – перевищення верхньої межі вмісту над 100%.

Даний підхід застосовується до субстанцій, які можуть являтися потенційно 100%-ми речовинами, тобто практично до всіх субстанцій, які одержуються синтетичним шляхом.

Випробування «Розчинення» та «Однорідність дозованих одиниць»:

$$\Delta_{As} \leq 3 \quad (1.10)$$

$$\Delta_{SP} \leq 0,96 \quad (1.11)$$

$$\Delta_{SP} \leq 0,32 \cdot \Delta_{As} \quad (1.12)$$

Для РСЗ, використовуваних для кількісних випробувань (кількісне визначення, розчинення, однорідність вмісту): РСЗ, призначений для використання в декількох кількісних випробуваннях в різних умовах, можливо атестувати в однакових умовах, якщо теоретична різниця між атестованими значеннями РСЗ (X_{PCZ}), які будуть отримані в різних умовах, не перевищуватиме допустимого значення Δ_{PCZ} .

РСЗ, що використовуються в різних умовах для хроматографічних методів, можуть бути атестовані в однакових умовах, якщо всі методики, де використовуються РСЗ у відповідних АНД, селективні (тобто валідовані).

Для РСЗ, що використовуються в різних умовах для спектроскопічного методу (хоча б однієї методики АНД), потрібно оцінити потенціальний вплив домішок. Якщо немає додаткової інформації, вплив домішок може бути прийнятим рівню їх вмісту.

Для розфасованого РСЗ може бути перевірена його однорідність. Метою перевірки однорідності є підтвердження придатності розфасованих РСЗ своєму призначенню. Для хімічно стійких та негігроскопічних субстанцій вивчення однорідності може не проводитися. Атестація РСЗ може проводитися одночасно з перевіркою однорідності. У цьому випадку за $\overline{R_{PCZ}}$ приймають середнє значення для всіх випробуваних розчинів РСЗ. Однорідність РСЗ може перевірятися окремо від атестації з використанням іншого методу аналізу. У цьому випадку вибір методу перевірки однорідності має бути обґрунтованим.

Невизначеність вмісту РСЗ ($\Delta_{\text{PCЗ}}$) розраховують за формулою (1.13):

$$\Delta_{\text{PCЗ}} = \sqrt{\Delta_{\text{FAO}}^2 + \Delta_{\text{SP}}^2} \quad (1.13)$$

де Δ_{SP} – невизначеність пробопідготовки;

Δ_{FAO} – гранична невизначеність кінцевої аналітичної операції.

Невизначеність пробопідготовки (Δ_{FAO}) розраховують за формулою (1.14):

$$\Delta_{\text{SP}} = \sqrt{\sum_i \Delta_{\text{SP},i}^2} \quad (1.14)$$

де $\Delta_{\text{SP},i}$ – невизначеність пробопідготовки, пов'язана з i -тою операцією пробопідготовки, використовуваною при приготуванні розчину (РСЗ або СЗ).

Похибку в пробопідготовку вносять такі операції:

- зважування;
- доведення до об'єму;
- додавання об'єму (піпеткою або бюреткою).

Невизначеність зважування (у відсотках) розраховують за формулою:

$$\Delta = \frac{\Delta_{\text{ваг}} \cdot 100}{m} \quad (1.15)$$

де $\Delta_{\text{ваг}}$ – максимальна похибка зважування для даних ваг (в абсолютних одиницях – г, мг або мкг);

m – використовувана наважка, виражена в тих самих одиницях, що і похибка ваг.

$\Delta_{\text{ваг}}$ повинна бути не менша зазначеної в документації на ваги та не більшою 0,2 мг. Якщо використовуються великі наважки для розведення ваговим методом, $\Delta_{\text{ваг}}$ може бути більшою.

При розрахунку невизначеності для мірних колб використовують відповідні значення, зазначені в документації на мірний посуд. Для піпеток невизначеність (у відсотках) розраховують за формулою:

$$\Delta_{\text{V}} = \frac{\Delta_{\text{П}} \cdot 100}{V} \quad (1.16)$$

де $\Delta_{\text{П}}$ – похибка для піпетки, зазначена в документації (в абсолютних одиницях – мл);

V – використовуваний у методиці об'єм, що відбирається піпеткою, виражений в тих самих одиницях, що і похибка.

Невизначеність КАО (Δ_{FAO}) розраховують за формулою:

$$\Delta_{\text{FAO}} = \frac{S_p \cdot t(f; 95)}{\sqrt{n}} \quad (1.17)$$

$$f = m(n-1) \quad (1.18)$$

$$S_p^2 = \frac{1}{m} \cdot \sum_j^m S_j^2 \quad (1.19)$$

$$S_j = \frac{100}{A_j} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (A_{ij} - \bar{A}_j)^2}{n-1}} \quad (1.20)$$

де m – число розчинів;

n – число вимірювань (однакове для всіх розчинів);

S_p^2 – усереднена дисперсія для всіх розчинів;

S_j – відносне стандартне відхилення для j -го розчину, у відсотках;

$\bar{A}_j$ – середнє значення результатів вимірювання для j -го розчину;

A_{ij} – індивідуальне значення результатів вимірювання для j -го розчину;

t – односторонній коефіцієнт Стюдента для рівня довірчої ймовірності 95%.

Встановити вимоги до невизначеності КАО, виходячи з вимог до невизначеності вмісту РСЗ і невизначеності пробо підготовки, можна за формулою:

$$\Delta_{\text{FAO}} = \sqrt{(\Delta_{\text{PCЗ}}^2 - \Delta^2)} \quad (1.21)$$

Виходячи з отриманого значення для Δ_{FAO} , можна розрахувати об'єднане для всіх розчинів максимально допустиме значення для відносного стандартного відхилення для числа n паралельних вимірювань:

$$S_p = \frac{\Delta_{\text{FAO}} \cdot \sqrt{n}}{t(f; 95)} \quad (1.22)$$

В методиці атестації наводять знайдені максимально припустимі значення для S_p в залежності від числа вимірювань (не менше трьох).

1.4.7 Фасування та етикетування робочих стандартних зразків

Упродовж встановленого терміну придатності знайдене значення вмісту для РСЗ не має змінюватись на значення, що перевищує максимально допустиму невизначеність вмісту для даного РСЗ.

Як термін придатності може використовуватися такий, який відомий для відповідного ФСЗ ДФУ. За відсутності даних для ФСЗ ДФУ можуть використовуватися дані для субстанції:

Таблиця 1.1 Відповідність терміну придатності субстанції та РСЗ

Термін придатності для субстанції	Термін придатності для РСЗ
1 рік	3 місяці
2 роки	6 місяців
3 роки і більше	1 рік

У міру накопичення даних термін придатності може бути збільшено. Для РСЗ може використовуватися той самий термін придатності, що і для субстанції, без вивчення термінів придатності, якщо виконується наступне: сумарний максимально припустимий

вміст домішок відповідно до вимог специфікації на субстанцію не перевищує максимально припустиму невизначеність вмісту РСЗ ($\Delta_{\text{РСЗ}}$) [37].

Рекомендується зберігати РСЗ при низьких температурах. Для більшості РСЗ зберігання при температурі від +2 °C до +8 °C із застосуванням запобіжних заходів проти поглинання вологи (герметичність пакування) вважається задовільним [38].

СЗ фасують і закупорюють у відповідних умовах, що забезпечують придатність СЗ. Використовувані контейнери можуть бути призначені для багаторазового і одноразового використання, але останнє найбільш переважне з міркувань зменшення ризику розкладання СЗ, його забруднення або поглинання вологи.

Маркування включає назву СЗ, назву постачальника, номер серії, а також будь-яку іншу інформацію, необхідну для належного використання СЗ [39]. Для СЗ в маркуванні зазначають дату повторного випробування або закінчення терміну придатності. Якщо СЗ передбачається використовувати для кількісного визначення, також зазначають таку інформацію:

- присвоєне значення кількісного вмісту, у відсотках;
- або кількісний вміст у мг або мл хімічної речовини в контейнері;
- або присвоєне значення активності (для біологічних або мікробіологічних методів кількісного визначення) в одиницях на мг або на контейнер (віалу).

2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1 Реактиви та обладнання

Для проведення досліджень з даної теми використовувалися наступні реактиви: субстанція парацетамолу; стандартний зразок парацетамолу (ФСЗ ДФУ с. 4); вода очищена Р; ацетонітрил Р.

Використовували воду очищену, яку отримували шляхом дистиляції або іонного обміну із води, що відповідає вимогам нормативних документів щодо якості води.

Обладнання: рідинний хроматограф Agilent 1260 з УФ детектором; ваги аналітичні; лабораторний посуд класу А.

2.2 Попередні розрахунки невизначеності атестації

Метою попередніх досліджень є прогноз граничної невизначеності результату фармацевтичного аналізу.

Методика пробопідготовки: близько 20,0 мг (точна наважка) парацетамолу (ФСЗ ДФУ) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняють у 50 мл води, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки та перемішують.

З випробуванням розчином (РСЗ) здійснюється така ж процедура.

Спочатку проводиться прогноз невизначеності пробопідготовки Δ_{SP} . Невизначеність зважування розраховується за формулою (1.15):

$$\Delta = \frac{0,2 \cdot 100}{20} = 1,0\% \quad (2.1)$$

Також похибку вносить використання колб місткістю 100 мл (невизначеність 0,12% [40]).

Невизначеність пробопідготовки розраховуємо за формулою (1.14):

$$\Delta_{SP} = \sqrt{(1,0^2 + 1,0^2 + 0,12^2 + 0,12^2)} = 1,424\% \quad (2.2)$$

Далі розраховується гранична невизначеність кінцевої аналітичної операції Δ_{FAO} (1.17):

$$\Delta_{FAO} = \left(\frac{\sqrt{2}}{\sqrt{5}}\right) \cdot 2,13 \cdot 0,90 = 1,21\% \quad (2.3)$$

Розрахунок граничної невизначеності результату фармацевтичного аналізу проводиться за формулою (1.9):

$$\max \Delta_{As} \leq \frac{105-95}{2} \cdot 0,32 \quad (2.4)$$

$$\max \Delta_{As} \leq 1,6\% \quad (2.5)$$

Тоді гранична загальна невизначеність методики аналізу дорівнюватиме:

$$\Delta_{As} = \sqrt{(1,424^2 + 1,21^2)} = 1,869\% \quad (2.6)$$

Тобто методика аналізу не є метрологічно обґрунтованою, а невизначеність пробопідготовки не можна вважати незначущою порівняно із загальною невизначеністю методики аналізу.

З метою зменшення невизначеності атестації стандарту до пробопідготовки були внесені такі зміни і вона була здійснена таким чином: близько 200,0 мг (точна наважка) парацетамолу (ФСЗДФУ) поміщають у мірну колбу місткістю 1000,0 мл, розчиняють у 500 мл води, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки та перемішують.

З випробуванням розчином (РСЗ) здійснюється така ж процедура.

Проводиться прогноз невизначеності пробопідготовки Δ_{SP} . Невизначеність зважування:

$$\Delta = \frac{0,2 \cdot 100}{200} = 0,10\% \quad (2.7)$$

Також похибку вносить використання колб місткістю 1000 мл (невизначеність 0,05% [40]).

$$\Delta_{SP} = \sqrt{(0,10^2 + 0,10^2 + 0,05^2 + 0,05^2)} = 0,158\% \quad (2.8)$$

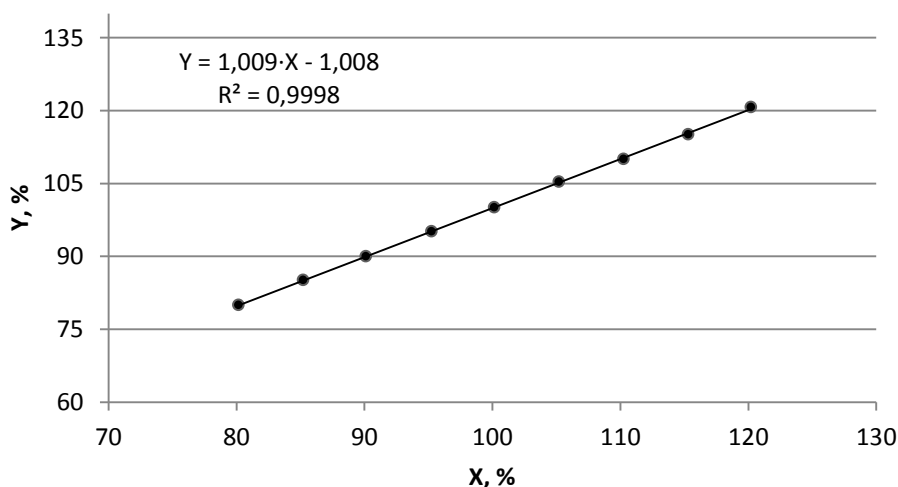
Тоді гранична загальна невизначеність методики аналізу дорівнюватиме:

$$\Delta_{As} = \sqrt{(0,158^2 + 1,21^2)} = 1,489\% \quad (2.9)$$

Тобто методика аналізу є метрологічно обґрунтованою, а невизначеність пробопідготовки можна вважати незначущою порівняно із загальною невизначеністю методики аналізу.

2.3 Контроль лінійності методики

Дослідження лінійності являються основними при валідації методик кількісного визначення, оскільки з отриманих даних можна розрахувати й інші метрологічні характеристики.



Графік 1. Залежність приведеного аналітичного сигналу від приведених концентрацій

При допуску вмісту $B = 1,0 \%$ для субстанції парацетамолу критеріями прийнятності будуть $|a| = 1,6\%$ [40]; $R_c \geq \min R_c$, де a – вільний член рівняння прямої, яка описує залежність Y від X (X – приведені концентрації, Y – приведений аналітичний сигнал, аналітичним сигналом є площа піку парацетамолу), R_c – коефіцієнт кореляції, $\min R_c$ – мінімальний коефіцієнт кореляції, який дорівнює для заданих умов 0,9993 [40].

Як видно з формули залежності, коефіцієнт кореляції більший, ніж заданий ($0,9998 > 0,9993$), а вільний член рівняння менший за заданий ($1,008 < 1,6$), тобто методика може вважатися лінійною.

2.4 Методика проведення аналізу

Атестацію проводять з використанням не менше двох наважок офіційного СЗ та двох наважок РСЗ, що атестується. Для випробуваного розчину (РСЗ) та розчину порівняння (ФСЗ) виконується однакове число вимірювань у кінцевій аналітичній операції.

Хроматографують розчин порівняння, отримуючи від 5 хроматограм. Для площ піків парацетамолу з отриманих хроматограм розраховують відносне стандартне відхилення (RSD) (2.10).

$$RSD = \frac{100}{\bar{X}} \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (2.10)$$

Граничне RSD, розраховане з 5 хроматограм розчину порівняння, має бути не більше 0,74% [7, табл. 2.2.46.–2].

Попеременно хроматографують розчин порівняння та випробуваний розчин (розчин ФСЗ1 – розчин РСЗ1 – розчин ФСЗ2 – розчин РСЗ2) на рідинному хроматографі з УФ–детектором за наступних умов:

- колонка Zorbax XDB C18 Agilent Tech розміром 250x4,6 мм з розміром часток 5 мкм або аналогічна, для якої виконуються вимоги придатності хроматографічної системи;
- рухома фаза – вода Р : ацетонітрил Р (85:15);
- об'єм інжекції – 20 мкл;
- швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв;
- температура колонки – 40 °С;
- детектування за довжини хвилі – 244 нм.

Вміст парацетамолу (X) в РСЗ, у міліграмах, розраховують за формулою:

$$X = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot m_1} \quad (2.11)$$

де: S_1 – середнє значення площ піків парацетамолу, обчислене з хроматограм випробуваного розчину;

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

m_0 – маса наважки стандартного зразку парацетамолу, у мг;

P – вміст основної речовини у стандартному зразку парацетамолу, у відсотках.

Перевірка придатності хроматографічної системи.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються наступні умови:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком парацетамолу на хроматограмі розчину порівняння, має бути не менше 2000 теоретичних тарілок;
- коефіцієнт симетрії піку парацетамолу на хроматограмі розчину порівняння (ФСЗ) має бути не більше 1,9.

2.5 Результати та їх обговорення

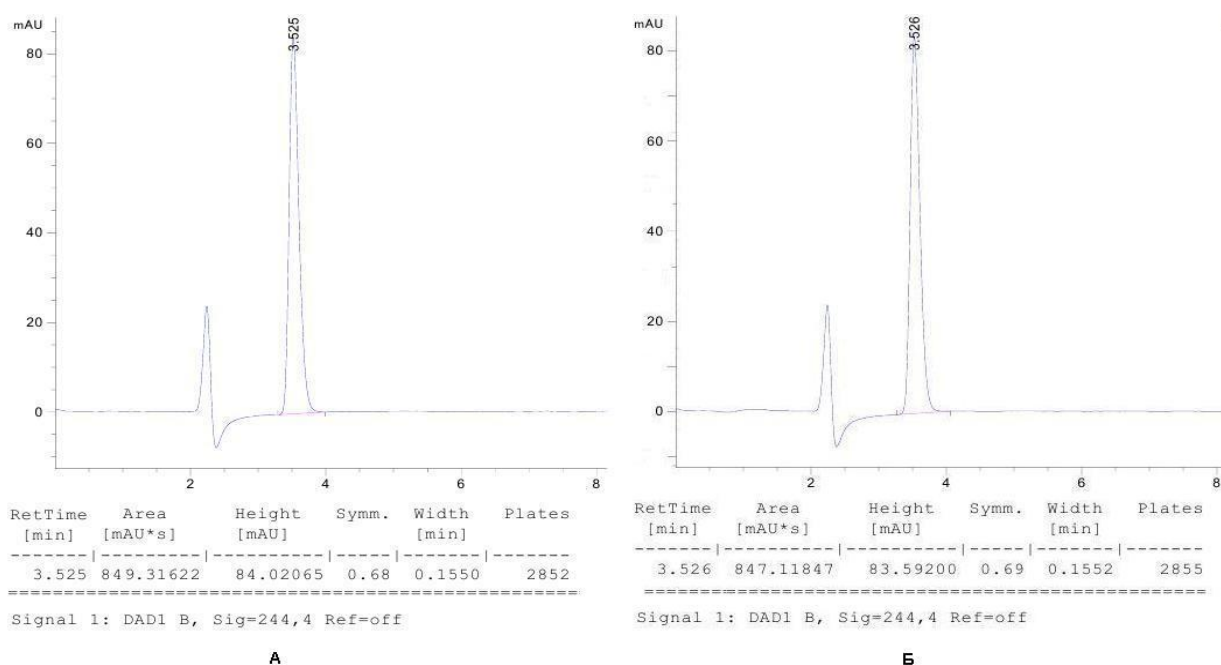


Рис. 2.1 Хроматограми розчину порівняння (ФСЗ (А)) та випробуваного розчину (РСЗ (Б))

За даними Рис. 2.1 видно, що хроматографічна система може вважатися придатною.

2.5.1 Невизначеність атестації робочого стандартного зразка

Невизначеність пробопідготовки складає:

Таблиця 2.1 Розрахунок невизначеності пробопідготовки

	ФСЗ ₁ ,	РСЗ ₁	ФСЗ ₂	РСЗ ₂
$m_{\text{нав}}$, мг	200,1	200,3	200,4	200,2
Δ , %	0,1000	0,0999	0,0998	0,0999
$\Delta_{\text{СП1}}$, %	0,1581		0,1597	

За результатами хроматографування розраховуємо невизначеність кінцевої аналітичної операції (Δ_{FAO}) та невизначеність атестації РСЗ для обох паралелей.

Невизначеність для атестованого значення фармацевтичного стандартного зразку ($\Delta_{\text{РСЗ}}$) повинна бути незначущою в порівнянні з максимально припустимою невизначеністю результатів аналізу методики. Для довірчої ймовірності 95 % отримаємо:

$$\Delta_{\text{РСЗ}} \leq \Delta_{\text{As}} \cdot 0,32 \quad (2.12)$$

$$\Delta_{\text{РСЗ}} \leq 0,512 \quad (2.13)$$

Таблиця 2.2 Результати хроматографування

	Площі піків			
	ФСЗ 1	РСЗ 1	ФСЗ 2	РСЗ 2
1	847,82	849,65	849,63	847,71
2	849,32	847,32	848,23	845,84
3	848,13	847,12	850,89	845,43
4	848,25	848,73	849,77	847,68
5	850,76	848,95	847,61	847,76
S_{ср}	848,86	847,75	849,23	846,71
s²	1,2050	1,0918	1,3069	1,1497
s₁²	1,1484		1,2283	
RSD	0,1420	0,1287	0,1539	0,1358
$\Delta_{\text{FAO}}, \%$	0,2583		0,2767	
$\Delta_{\text{РСЗ}}, \%$	0,3029		0,3195	

2.5.2 Статистична обробка результатів

Для виявлення грубих промахів, які можуть суттєво вплинути на однорідність результатів вимірювання та зрештою на результат розрахунку кількісного вмісту діючої речовини в стандартному зразку, використовується критерій Діксона (Q – критерій).

Перевірка на промах найменшого значення у вибірці Q_1 та найбільшого значення у вибірці Q_n проводиться за формулами (2.14) та (2.15) відповідно:

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R} \quad (2.14)$$

$$Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{R}, \quad (2.15)$$

де x_1 – найменше значення площі піку у вибірці

x_2 – сусіднє значення площі піку від найменшого у вибірці

x_n – найбільше значення площі піку у вибірці

x_{n-1} – сусіднє значення площі піку від найбільшого у вибірці

R – розмах значень (різниця найбільшого та найменшого значення)

Таблиця 2.3 Перевірка однорідності вибірки

	ФСЗ 1	РСЗ 1	ФСЗ 2	РСЗ 2
x₁	847,82	847,12	847,61	845,43
x₂	848,13	847,32	848,23	845,84
x_{n-1}	849,32	848,95	849,77	847,71
x_n	850,76	849,65	850,89	847,76
R	2,94	2,53	3,28	2,33
Q₁	0,11	0,08	0,19	0,18
Q_n	0,49	0,28	0,34	0,02

Значення контрольних критеріїв Q₁ (P=95 %, n=5) становить 0,64 та Q_n (P=95 %, n=5) становить 0,64. Отримані значення менші за контрольні (табличні), тобто вибірки є однорідними.

Отримавши результати перевірки вибірок на однорідність, можна опрацьовувати результати хроматографування та розраховувати вміст парацетамолу у вторинному (робочому) зразку.

Таблиця 2.4 Розрахунок кількісного визначення РСЗ

	Перша паралель	Друга паралель
1	100,12	99,87
2	99,66	99,82
3	99,78	99,46
4	99,96	99,85
5	99,69	100,12
s²	1,1484	1,2283
Середньозважене значення s²	1,1883	
Результат кількісного визначення	99,84	99,82
Середнє значення між двома паралелями	99,83	

Для статистичної обробки вибірок були вибрані критерій Фішера, критерій Стьюдента, та критерій Бартлета.

Табличне значення критерію Стьюдента 2,306 для ступенів свободи f=8 (об'єднане число ступенів свободи, розраховується як загальна кількість результатів – 2) та довірчої ймовірності P = 95 %. Розраховане значення t-критерію складає:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}} = \frac{(99,84 - 99,82)}{\sqrt{\left(\frac{1,1484}{5} + \frac{1,2283}{5}\right)}} = \frac{0,02}{0,4753} = 0,042 \quad (2.16)$$

Отримане значення менше за табличне, тобто різниця між середніми значеннями є статистично незначущою.

Для двох вибірок зі ступенями свободи $f=4$ (кількість вимірювань в кожній паралелі – 1) критерій Фішера дорівнює 6,388. Відношення дисперсій двох вибірок складає:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{1,2283}{1,1484} = 1,070 \quad (2.17)$$

Отримане значення менше за табличне, тобто розходження дисперсій двох вибірок є статистично незначущим.

В-критерій Бартлета застосовується, коли необхідно перевірити гіпотезу про однорідність дисперсій. Табличне значення Пірсона χ^2 , з яким порівнюється значення розрахованого критерія Бартлета, при $P=95\%$ та ступенях свободи $f=1$ (кількість паралелей – 1) дорівнює 3,841.

$$B = 2,303 \cdot (f_n \cdot \lg \bar{s}^2 - \sum_{i=1}^i f_i \cdot \lg s_i^2), \quad (2.18)$$

де f_n – об'єднане число ступенів свободи (кількість вимірювань в кожній паралелі – 2)

$\bar{s}^2$ – дисперсія, розрахована з результатів обох паралелей

s_i^2 – дисперсія i -тої вибірки

f_i – число ступенів свободи кожної паралелі

$$B_1 = 2,303 \cdot (8 \cdot \lg(1,1484) - 4 \cdot \lg(1,2050) - 4 \cdot \lg(1,0918)) = 0,0097 \quad (2.19)$$

$$B_2 = 2,303 \cdot (8 \cdot \lg(1,2283) - 4 \cdot \lg(1,3069) - 4 \cdot \lg(1,1497)) = 0,0164 \quad (2.20)$$

Отримані для кожної з паралелей значення критерію менші за табличне значення, тобто вибірки рівноточні.

2.6 Охорона праці

При роботі в хімічній лабораторії необхідно дотримуватись правил техніки безпеки, щоб не допустити нещасних випадків внаслідок теплових та хімічних опіків, отруєнь небезпечними речовинами, уражень електричним струмом, механічних пошкоджень, порізів.

1. Для цього потрібно мати засоби індивідуального захисту: халат, закрите взуття, гумові рукавички, щоб уникнути попадання кислот та лугів на відкриті ділянки шкіри.

2. Перед початком роботи необхідно оглянути робоче місце, перевірити наявність індивідуальних засобів захисту, засобів пожежогасіння та аптечки.

3. Усі електроприлади, що використовуються у лабораторії, повинні бути заземлені з використанням провідників відповідного діаметра.

4. У хімічній лабораторії має працювати не менше двох осіб.

5. На робочому місці заборонено вживати їжу, використовувати для цього хімічний посуд, зберігати їжу разом із хімічними реактивами.

6. У разі появи запаху газу, який використовується для газових пальників, у приміщенні не запалювати вогонь, і не включати електроплити до повного провітрювання приміщення, усунення ділянок, де існує витік газів.

7. Якщо кислота або луг потрапили на шкіру або очі, необхідно промити їх великою кількістю води. Потім уражену ділянку промити слабким розчином харчової соди (у разі ураження кислотою) або слабким розчином оцтової кислоти (у разі ураження лугом). При роботі зі шкідливими речовинами їх розчини готують безпосередньо перед використанням та у витяжній шафі, щоб зменшити ризик отруєння ними при тривалому зберіганні. Експеримент проводять під тягою з опущеним склом.

8. При роботі з токсичними речовинами необхідно мати наготові засоби першої допомоги. Після закінчення роботи руки та посуд необхідно ретельно вимити.

9. Під час роботи з легкозаймистими рідинами експеримент необхідно проводити під тягою з опущеним склом. Перші засоби гасіння пожежі мають бути наготові. Легко займисті рідини зберігають у спеціальних металевих ящиках з кришками.

10. Скляний посуд, що використовується в роботі, не повинен містити помітних дефектів, щоб уникнути порізів.

11. У разі виявлення неполадок обладнання, приладів та інструментів необхідно негайно повідомити про це адміністрацію та вжити заходів щодо усунення аварійної ситуації.

12. Після закінчення роботи у лабораторії необхідно відключити апаратуру, вимкнути газ, воду, електроштити, опустити заслінки витяжної шафи.

ВИСНОВКИ

1. В даній кваліфікаційній роботі після проведеного літературного пошуку та аналізу джерел, що стосуються досліджуваної теми, була проведена кваліфікація вторинного стандартного зразку парацетамолу – було проведено описання процедури атестації робочого стандартного зразку, були визначені основні цілі та задачі атестації, а також розглянуті етапи та вимоги до процедури.

2. На основі літературного огляду та власних експериментів для проведення атестації була використана методика високоефективної рідинної хроматографії з УФ–детектором. Були описані етапи підготовки зразків, методика була перевірена на лінійність – функція відповіді парацетамолу показала лінійну залежність. Також були оцінені результати атестації, за результатами хроматографування були отримані результати кількісного визначення вторинного стандартного зразку – вміст парацетамолу 99,8%, розраховані критерії прийнятності загальної невизначеності методики аналізу робочого стандартного зразку – однорідність та рівноточність вибірок була підтверджена, невизначеність пробопідготовки дорівнює 0,1581 та 0,1597, невизначеність кінцевої аналітичної операції склала 0,2583 та 0,2767, а невизначеність атестації робочого стандартного зразку склала 0,3029 та 0,3195 для двох вибірок відповідно.

3. Однорідність вибірок була доведена ($Q_n = 0,49; 0,28; 0,34; 0,02$ при $Q_n^{\text{крит}} = 0,64$), для статистичної обробки були обрані критерій Фішера – розходження дисперсій двох вибірок є статистично незначущим ($F = 1,070$ при $F_{\text{табл}} = 6,388$), критерій Стьюдента – різниця між середніми значеннями є статистично незначущою ($t = 0,042$ при $t_{\text{табл}} = 2,306$), та критерій Бартлета – гіпотеза про однорідність дисперсій даної вибірки була перевірена ($B = 0,0097; 0,0164$ при $B_{\text{табл}} = 3,841$).

4. В результаті атестації були отримані надійні дані про вміст парацетамолу в РСЗ, також було доведено, що даний РСЗ задовольняє усім вимогам якості, що є надзвичайно важливим, так як парацетамол є одним із найчастіше використовуваних фармацевтичних препаратів, і якісна атестація стандартних зразків є необхідною умовою для забезпечення якості та безпеки лікарських препаратів з парацетамолом.

СПИСОК ДЖЕРЕЛ

1. Chhaya V Sharma, Vivek Mehta. Paracetamol: mechanisms and updates. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain*. **2014**, 14 (4), 153–158.
2. Enas M.A. Mostafa, Ayat M. Tawfik, Khadiga M. Abd–Elrahman. Egyptian perspectives on potential risk of paracetamol/acetaminophen–induced toxicities: Lessons learnt during COVID–19 pandemic. *Elsevier*. **2022**, Vol. 9, 541–548.
3. Зупанець І. В., Рубан О. А., Євтушенко О. М., Колісник Т. Є. Дослідження асортименту анагетичних засобів для терапії хронічного болю на фармацевтичному ринку України. *Фармацевтичний журнал*. **2020**, 75 (3), 16–28.
4. National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 1983, Acetaminophen" *PubChem*, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaminophen>. (Дата звернення Січ 17, 2023)
5. За заг. ред. Безуглого П. О. Фармацевтична хімія. Підручник для студ. вищ. фармац. навч. закл. і фармац. ф–тів вищ. мед. навч. закл. III–IV рівнів акредитації. Вінниця, 2008; 560 с.
6. Швайка О. П. Основи синтезу лікарських речовин та їх проміжних продуктів: навч. посіб. для студ. хім. спец. вищ. навч. закл. *НАН України*. 2 вид., випр. й доп. Донецьк, 2004; 552 с.
7. Державна Фармакопея України. Доповнення 2.0; Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Харків: **2018**; Т. 2.
8. Jahidul Hoq, Md. Fahamidul Islam, Md. Rezwan Miah, Mohammed M. Rahman, Albandy Almahri, Mohammad A. Hasnat. Development of [I(ads)|Au(pc)] electrode to attain electrocatalytic oxidation of paracetamol: An efficient platform for quantitative analysis. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. **2022**, 10 (4), 108141.
9. Abbas Saadatmandi, Mahmoud Reza Sohrabi, Hasan Kabiri Fard. Smart chemometrics spectrophotometry for rapid simultaneous quantitative determination of paracetamol, diphenhydramine, and phenylephrine in commercial tablet compared to high–performance liquid chromatography as a reference method. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **2023**, Vol. 233, 104732.
10. Kai Gao, Xue Bai, Yi Zhang, Yetong Ji. N–doped graphene quantum dots embedded in BiOBr nanosheets as hybrid thin film electrode for quantitative photoelectrochemical detection paracetamol. *Electrochimica Acta*. **2019**, Vol. 318, 422–429.

11. S. Meenakshi, K. Pandian, S.C.B. Gopinath. Quantitative simultaneous determination of pentoxifylline and paracetamol in drug and biological samples at graphene nanoflakes modified electrode. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. **2020**, Vol. 107, 15–23.
12. Marie–Hélène Langlois, Antonios Vekris, Christine Bousses, Elodie Mordelet, Nathalie Buhannic, Céline Séguard, Pierre–Olivier Couraud, Babette B. Weksler, Klaus G. Petry, Karen Gaudin. Development of a solvent–free analytical method for paracetamol quantitative determination in Blood Brain Barrier in vitro model. *Journal of Chromatography B*. **2015**, Vol. 988, 20–24.
13. Jan Schripsema, Ronald dos Santos Merlim, Lais Gonçalves Parvan, Helen Sant’Ana dos Santos Ribeiro, Leonardo Dagnino Schripsema, Seldon Aleixo, Alexander Becht, Ulrike Holzgrabe, Denise Dagnino. Towards a holistic view of tablet quality, an extensive study on paracetamol tablets with nuclear magnetic resonance using similarity calculations, differential NMR and hierarchical cluster analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2022**, Vol. 215, 114773.
14. ISO Guide 30:2015, Reference materials — Selected terms and definitions.
15. Тичков В.В., Гальченко В.Я., Трембовецька Р.В. Метрологічне забезпечення фізико–хімічних вимірювань: навчально–методичний посібник до практичних робіт. Черкаси, 2021; 253 с.
16. Берест Г. Г., Лукіна І. А., Бігдан О. А. Фармацевтичний аналіз лікарських засобів: навч. посіб. до самостійної роботи провізорів–інтернів спеціальності «Загальна фармація». Запоріжжя, 2017; 87 с.
17. Леонтьєв Д. А. Створення системи фармацевтичних стандартних зразків в Україні. Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора фармацевтичних наук за спец. 15.00.03 – стандартизація та організація виробництва лікарських засобів, Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів", Харків, 2016.
18. Annex 3. World Health Organization. General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances. WHO Technical Report Series 943, 2007.
19. Наказ Міністерства охорони здоров’я України 16.09.2011 №595 (з1159–11). Порядок забезпечення належних умов зберігання, транспортування, приймання та обліку вакцин, анатоксинів та алергену туберкульозного в Україні.
20. Міністерство охорони здоров’я України. Державний фармакологічний центр. Державна інспекція з контролю якості лікарських засобів. Порядок використання стандартних зразків та інших речовин порівняння.

21. Torgny Rundlöf, Ian McEwen, Monika Johansson, Torbjörn Arvidsson. Use and qualification of primary and secondary standards employed in quantitative ¹H NMR spectroscopy of pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2014**, Vol. 93, 111–117.
22. Liene Dhooghe, Tania Naessens, Arne Heyerick, Denis De Keukeleire, Arnold J. Vlietinck, Luc Pieters, Sandra Apers. Quantification of xanthohumol, isoxanthohumol, 8–prenylnaringenin, and 6–prenylnaringenin in hop extracts and derived capsules using secondary standards. *Talanta*. **2010**, 83 (2), 448–456.
23. Kowalska, M., Woźniak, M., Kijek, M. et al. Management of validation of HPLC method for determination of acetylsalicylic acid impurities in a new pharmaceutical product. *Sci Rep*. **2022**, 12 (1).
24. P. Gramigni, M. Pellegrini, S. Scurati, G. Arienti, A. Lodi, E. Vignali, M. Ferri, A. Alimonti, R. Bocca. Development of a certified reference material for paracetamol in human serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2017**.
25. O.V. Egorova, E.N. Nesterova, N.A. Meshalkina, N.A. Romanova, O.A. Shpigun. Design, preparation and certification of a proficiency testing material for the determination of paracetamol in pharmaceuticals. *Accreditation and Quality Assurance*. **2020**.
26. S. Ganta et al. Quantification of doxorubicin and daunorubicin in rat plasma and tissues by LC–MS/MS: validation and application in pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*. **2015**.
28. X. Yang et al. Development of beclometasone dipropionat in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a deuterated internal standard and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. **2014**.
29. J. Sun, Y. Song, L. Shen, Y. Xu, X. Wang, X. Sun, Y. Zhang, J. Liu. Development and validation of an LC–MS/MS method for the simultaneous determination of paracetamol, caffeine, chlorpheniramine maleate and phenylephrine hydrochloride in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2016**.
30. Laxman S. Waghmare, Rakesh D. Deulgaonkar, Sanjay D Sawant, Jayashree B. Gogtay и Urmila M. Thatte. Validation of a high performance liquid chromatography method for the quantification of paracetamol in human plasma using an isotopically labeled internal standard and its application to bioequivalence study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2011**.
31. Saritha Kurapati, Gowri Sankar Dannana, N. Devanna. Simultaneous Determination of Metformin and Linagliptin in Human Plasma by Liquid Chromatography – Tandem Mass

Spectrometry and Its Application to a Pharmacokinetic Study. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. **2019**.

32. N. Soonsawad, R. E. Wilner, S. G. Weber, J. M. O'Connell, G. L. Kearney. Development and Validation of a LC – MS / MS Method for the Quantification of Ivacaftor and Its Major Metabolites in Human Plasma. *Journal of Chromatography B*. **2018**.

33. K.V.K. Ranganadha Rao et. al. Simultaneous Determination of Hydrochlorothiazide and Lisinopril in Human Plasma by LC–MS/MS: Application to a Clinical Study. *Journal of Chromatographic Science*. **2019**.

34. ДСТУ ISO/IEC Guide 98–3:2018. Невизначеність вимірювань. Частина 3. Настанова щодо подання невизначеності у вимірюванні (GUM:1995) (ISO/IEC Guide 98–3:2008, IDT).

35. Закон України. Про метрологію та метрологічну діяльність. 2014, №30, с. 1008

36. Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". Контроль якості результатів аналізу в лабораторії. [Електронний ресурс] <http://sphu.org/viddil-validaci%D1%97-ta-sz/kontrol-yakosti-rezultativ-analizu-v-laboratori%D1%97> (Дата звернення Бер 15, 2023)

37. Губаревич І.Г., Нікішина Л.С., Комарова Ю.А., Леонтьєв Д.А., Циблієва Н.О., Гризодуб А.І. Розробка та валідація методики кількісного визначення супровідних домішок методом верх у субстанції фенсукцинала. Філія “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, Державного підприємства “Український фармацевтичний інститут якості”, Державна Установа “Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України”, 2018.

38. Iain D. Watson, Nigel J. Gay, Tony Fishwick. Evaluation of the Stability of Analytical Standards: A Review. *Accreditation and Quality Assurance*. **2002**.

39. K.M. MacDonald, M.A. Whittington, P. Wood. Stability of Secondary Reference Standards for Clinical Chemistry Assays. *Clinical Chemistry*. **2000**.

40. Рекомендації Державної фармакопеї України: стандартизовані процедури валідації кількісних методик контролю якості лікарських засобів. [Електронний ресурс] http://sphu.org/wp-content/uploads/2019/06/Validation_chapter_04_-_SPU-ukr_1-130619.pdf (Дата звернення Бер 22, 2023)

ДОДАТОК А

Таблиця А.1 Результати хроматографування модельних зразків

№ з/п	D, %	Необхідна наважка, мг	Взята наважка, мг	Площі	$\bar{S}$	X, %	Y, %
1	80	160	160,2	687,53 675,1 680,35 676,48 677,02	679,296	80,1802	79,9525
2	85	170	170,3	722,28 720,39 723,96 725,86 721,97	722,892	85,2352	85,0838
3	90	180	180,1	760,89 764,39 763,81 767,46 766,59	764,628	90,1401	89,9961
4	95	190	190,3	803,93 805,58 808,78 810,31 811,22	807,964	95,2453	95,0967
5	100	200	200,1	848,82 849,32 850,13 848,25 853,76	850,056	100,150	100,051

Продовження таблиці А.1

№ з/п	D, %	Необхідна наважка, мг	Взята наважка, мг	Площі	$\bar{S}$	X, %	Y, %
6	105	210	210,2	892,97 895,01 897,47 896,63 893,35	895,086	105,205	105,351
7	110	220	220,3	937,1 932,54 934,31 933,81 936,84 934,92	934,92	110,260	110,039
8	115	230	230,4	976,36 979,29 980,03 976,46 977,39 977,906	977,906	115,315	115,099
9	120	240	240,2	1026,69 1025,34 1028,9 1027,36 1019,93	1025,644	120,220	120,717
Розчин порівняння			200,2	849,35 848,62 849,71 850,12 850,32	849,624		

X – приведені концентрації, Y – приведений аналітичний сигнал