

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
імені В.Н. Каразіна  
**Кафедра хімічної метрології**

УДК 543.54

*До захисту допускаю*



Завідувач кафедри

«12» 12 2024 р. д.х.н., проф. Олег ЮРЧЕНКО

**ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ 4-ФЕНІЛПРОЛІДОНУ У  
ЛІКАРСЬКОМУ ПРЕПАРАТІ «ФЕНІБУТ, КАПСУЛИ» МЕТОДОМ  
ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ**

Кваліфікаційна робота студента

VI курсу хімічного факультету

**БОЧАРОВА СЕРГІЯ АНДРІЙОВИЧА**

Науковий керівник

к. х. н., доцент



Ольга КОНОВАЛОВА

ХАРКІВ 2024

## РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота містить: 47 сторінок, 6 рисунків, 13 таблиць, 25 літературних джерел.

Об'єктом дослідження є лікарський засіб «Фенібут, капсули по 250 мг»:

Мета роботи: оцінка валідаційних метрологічних характеристик методики визначення домішки 4-фенілпіролідону в лікарському засобі «Фенібут, капсули по 250 мг».

Методи дослідження: високоефективна рідинна хроматографія за допомогою рідинного хроматографа Agilent 1200, валідація методики.

Результати та їх новизна:

- проведено літературний огляд методу високоефективної рідинної хроматографії, фенібуту та його домішки 4-фенілпіролідону-2, випробувань, що мають проводитись при валідації аналітичних методик у фармацевтичній промисловості;

- проведено аналіз літератури з питань валідації методики, переважно Державної Фармакопеї України;

- визначено основні вимоги до валідації розробленої методики вимірювань;

- визначено, що специфічність методики відповідає вимогам;

- знайдено межу кількісного визначення (МКВ), що дорівнює 0.004%;

- показано, що лінійна залежність зберігається від 20% до 120%.

- показано, що правильність та збіжність методики відповідає вимогам.

Ключові слова: РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ, ФЕНІБУТ, 4-ФЕНІЛПІРОЛІДОН-2, ДОМІШКА, ГРАДУЮВАЛЬНИЙ ГРАФІК, СПЕЦИФІЧНІСТЬ, МЕЖА ВИЗНАЧЕННЯ, МЕЖА ВИЯВЛЕННЯ, НЕВИЗНАЧЕНІСТЬ, ЛІНІЙНІСТЬ, ПРАВИЛЬНІСТЬ, ЗБІЖНІСТЬ.

## ABSTRACT

The qualification work contains: 47 pages, 6 figures, 13 tables, 25 literature sources.

The object of the study is the medicinal product “Fenibut, 250 mg capsules”:

The aim of the study: evaluation of the validation metrological characteristics of the method for determining the impurity 4-phenylpyrrolidone in the medicinal product “Fenibut, 250 mg capsules”.

Research methods: high-performance liquid chromatography using an Agilent 1200 liquid chromatograph, validation of the method.

Results and their novelty:

- a literature review of the high-performance liquid chromatography method, phenibut and its impurity 4-phenylpyrrolidone-2, tests that should be performed during the validation of analytical methods in the pharmaceutical industry was conducted;

- an analysis of the literature on the validation of the method, mainly the State Pharmacopoeia of Ukraine, was conducted;

- the main requirements for the validation of the developed measurement method are determined;

- it is determined that the specificity of the method meets the requirements;

- the Limit of Quantification (LOQ) is found to be 0.004%;

- it is shown that the linear dependence is maintained from 20% to 120%.

- it is shown that the accuracy and precision of the method meet the requirements.

Keywords: LIQUID CHROMATOGRAPHY, PHENIBUT, 4-PHENYLPYRROLIDONE-2, IMPURITY, GRADUATION GRAPH, SPECIFICITY, LIMIT OF DETERMINATION, LIMIT OF DETECTION, UNCERTAINTY, LINEARITY, ACCURACY, PRECISION.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	6
1.1 Хроматографія як метод хімічного аналізу. Історія відкриття.....	6
1.2 Поняття високоефективної рідинної хроматографії, її види та обладнання...	10
1.3 Обернено-фазова хроматографія .....	15
1.4 Фізичні та хімічні властивості фенібуту та 4-фенілпіролідону-2 .....	17
1.5 Валідація та метрологічні характеристики методики .....	21
1.5.1 Невизначеність результатів аналізу.....	22
1.5.2 Специфічність методики.....	23
1.5.3 Лінійність методики .....	24
1.5.4 Правильність методики.....	25
1.5.5 Збіжність методики .....	26
1.5.6 Контроль межі кількісного визначення.....	26
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	28
2.1 Реактиви, посуд, обладнання і програми.....	28
2.2 Методика визначення вмісту 4-фенілпіролідону у препараті «Фенібут, капсули по 250 мг».....	29
2.3 Методики приготування розчинів .....	31
2.4 Проведення вимірювань та аналіз результатів .....	34
2.4.1 Підготовка приладу до аналізу.....	34
2.4.2 Перевірка придатності хроматографічної системи .....	34
2.4.3 Хроматографування зразків.....	35
2.4.4 Обробка результатів хроматографування .....	36
2.5 Розрахунки та результати дослідження .....	37
2.5.1 Перевірка невизначеності результатів аналізу .....	37
2.5.2 Перевірка специфічності методики .....	37
2.5.3 Перевірка лінійності методики .....	39
2.5.4 Перевірка правильності методики .....	42
2.5.5 Збіжність методики .....	43
2.5.6 Розрахунок межі кількісного визначення .....	44
ВИСНОВКИ.....	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	46

## ВСТУП

При реєстрації нових лікарських засобів, як оригінальних, так і дженериків, необхідно подавати до експертної комісії реєстраційне досьє. Реєстраційне досьє являє собою набір документів, що підтверджують змогу фармацевтичної компанії виготовляти якісний продукт, що буде відповідати усім стандартам. До розділів реєстраційного досьє входить, зокрема, Модуль 3, у якому описується контроль якості фармацевтичного виробу: розроблені методики контролю якості лікарського засобу та звіти з валідації цих методик.

Валідація аналітичних методик є необхідним та обов'язковим комплексом випробувань, що проводяться для підтвердження придатності правильно та відтворювано виконувати аналіз. У різних галузях є різні критерії та списки випробувань, що мають пройти аналітичні методики. У фармацевтичній промисловості основним нормативним документом є Державна Фармакопея України [1]. Згідно з ним, для методики кількісного визначення вмісту домішок, перевіряють невизначеність результатів аналізу, специфічність, лінійність, правильність, збіжність та межу кількісного визначення.

**Актуальність роботи** полягає в необхідності підтвердження точності результатів аналізу за допомогою заздалегідь розробленої аналітичної методики, яка буде використовуватися у сфері фармацевтичної промисловості для контролю якості лікарського засобу.

Таким чином, метою роботи є валідація методики визначення вмісту домішки 4-фенілпіролідону у лікарському засобі «Фенібут, капсули по 250 мг» методом високоефективної рідинної хроматографії. Для досягнення мети потрібно було вирішити наступні задачі:

- розрахунок невизначеності результатів аналізу;
- дослідження лінійності, правильності та збіжності методики визначення вмісту 4-фенілпіролідону-2 у лікарському засобі Фенібут, капсули по 250 мг;
- визначення межі кількісного визначення.

## 1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### 1.1 Хроматографія як метод хімічного аналізу. Історія відкриття

Хроматографія – процес, який використовують для розділення гомогенних сумішей, часто цей метод використовують одночасно і для ідентифікації хімічних речовин. Хроматографічний метод базується на різній швидкості переміщення компонентів рухомої фази через нерухому фазу. Різна швидкість сорбції/десорбції досліджуваних компонентів визначає відмінність в швидкостях переміщення та, як слідство, їх розділення. Сорбція – поглинання парів, газів, розчинних речовин твердими або рідкими поглиначами (сорбентами). Рухомою фазою в хроматографії можуть виступати гази, рідини, а нерухомою фазою є тверда пориста речовина з великою поверхнею або в'язка рідина, нанесена на тверду речовину – носій нерухомої фази [2-6].

Вперше хроматографічний метод аналізу відкрив ботанік і біохімік Михайло Семенович Цвет (1872–1919). Він розділив хлорофіл – зелений пігмент, що наявний в рослинах та складається із суміші декількох пігментів. Розділення вчений проводив у скляній трубці, яка була наповнена кальцію карбонатом. Методом екстрагування органічним розчинником отримували пігменти хлорофілу, потім отриманим екстрактом наповнювали колонку. Хлорофіл поглинався сорбентом (кальцію карбонатом) і у верхній частині колонки спостерігалася зона поглиненої речовини (рис. 1.1). При цьому не відбувалося розділення поглинутих пігментів. Колонку промивали бенzenом, компоненти екстракту переміщалися по колонці із різною швидкістю, утворюючи окремі кольорові зони (рис. 1.1). Після повного розділення компонентів стовпчик вологого адсорбенту виштовхували з колонки, розрізали на окремі частини, екстрагували окремі компоненти і досліджували. Отриманий стовпчик з кольоровими зонами М. С. Цвет назвав хроматограмою (від грецького слова «хроматос» – «колір»), а метод аналізу – хроматографією.

Хроматографічний метод не отримав належної оцінки вчених на момент відкриття, а також майже через 10 років, коли Л. С. Палмер у США та К. Дер в Європі незалежно один від одного опублікували опис подібних процесів розділення.

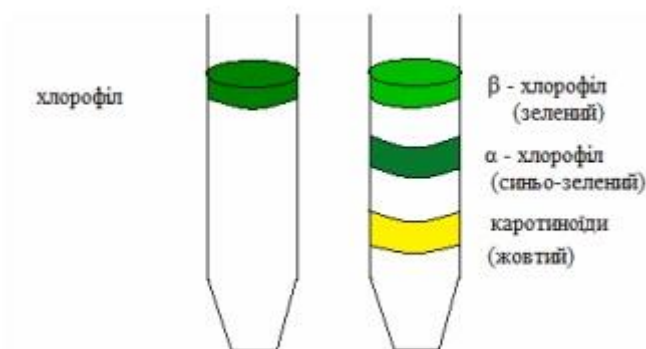


Рисунок 1.1 Схематичне зображення розділення хлорофілу

Двадцять п'ять років потому, у 1931 році, Ледерер прочитав книгу Л. С. Палмера і пізніше знайшов оригінальні публікації М. С. Цвета, а згодом він опублікував статтю про очищення ксантофілів на адсорбційній колонці  $\text{CaCO}_3$  за процедурою, описаною М. С. Цветом. У 1941 році П. Мартін і М. Сінг у Кембриджському університеті у Великій Британії відкрили роздільну хроматографію, за що вони були нагороджені Нобелівською премією в 1952 році. У тому ж році Мартін і Сінг опублікували основоположну статтю, яка разом із роботами Т. Джеймса та П. Мартіна заклала міцну основу для швидкого зростання хроматографічного методу аналізу.

Хроматографія була відкрита Цветом у формі рідина-тверда фаза, але її розвиток понад 50 років тривав переважно у формі газової хроматографії та тільки частково як тонкошарової та рідинної хроматографії. Відродження рідинної хроматографії в її сучасній формі та її надзвичайно швидке поширення привели до того, що ця техніка стала домінуючою аналітичною технікою в двадцять першому столітті, що здебільшого можна віднести до роботи професора К. Хорвата в Єльському університеті.

У середині 1960-х років професор Хорват, який раніше працював над розробкою відкритих трубчастих колонок з пористим шаром для газової хроматографії, вирішив використовувати для рідинної хроматографії невеликі пористі скляні кульки для полегшення масообміну між рідкою фазою і поверхнею. Колонки, наповнені цими кульками, створювали значний опір потоку рідини, і професор Хорват був змушений побудувати інструмент, який дозволяв розвивати безперервний потік рідини через колону. Це стало початком вискоелективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), а фактичну назву для цього методу розділення було введено професором Хорватом у 1970 році на Двадцять першій Пітсбурзькій конференції в Клівленді.

Перше розділення на хімічно модифікованій поверхні за допомогою водного елюенту, яке пізніше отримало назву обернено-фазової, також було винайдено Горватом.

В таблиці 1.1 наведена класифікація хроматографічних методів розділення. В кожному із цих методів можуть використовуватися сорбенти, механізм дії яких відрізняється (при одному і тому ж способі проведення аналізу та використовуваному обладнанні).

Таблиця 1.1 Класифікація хроматографічних методів

<b>Тип сорбції</b>	<b>Тип хроматографії</b>	<b>Назва хроматографічного методу</b>	<b>Система сорбент-середовище</b>	<b>Техніка виконання розділення</b>
Адсорбція	Молекулярна	Адсорбційна рідинна хроматографія	Тверда фаза-рідина	Колоночна за високого та низького тиску. В тонкому шарі на площині

		Гель-фільтрування та Гель-проникнення	Тверда фаза-вода або органічний розчинник	Колоночна за високого та низького тиску
		Адсорбційна газова хроматографія	Тверда фаза-газ	Колоночна за підвищеного тиску
	Іонообмінна	Іонообмінна хроматографія	Тверда фаза-рідина	Колоночна за високого та низького тиску. В тонкому шарі на площин
		Іон-парна хроматографія	Тверда фаза-рідина	Колоночна за високого та низького тиску. В тонкому шарі на площині і
Абсорбція	Молекулярна	Розподільча рідинна хроматографія	Рідина-рідина	Колоночна за низького тиску. В тонкому шарі на площині. На папері.

		Розподільча газо-рідинна хроматографія	Рідина-газ	Колоночна за підвищеного тиску. Капілярно-колоночна
--	--	--	------------	--

У цій кваліфікаційній роботі буде детально розглянуто метод хроматографії підвищеного тиску (високоєфективної рідинної хроматографії).

## 1.2 Поняття високоєфективної рідинної хроматографії, її види та обладнання

У сучасній фармацевтичній промисловості високоєфективна рідинна хроматографія (далі - ВЕРХ) є основним і невід'ємним аналітичним інструментом, який використовується на всіх етапах відкриття, розробки та виробництва ліків.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ, англійською мовою – HPLC) – це метод розділення речовин, у якому рухомою фазою є рідина, а нерухомою фазою є тонкодисперсна тверда речовина, або рідина, нанесена на твердий носій, або твердий тонкодисперсний носій, хімічно модифікований введенням органічних груп. Розділення сумішей аналітів у сучасній ВЕРХ здійснюється в пристрої, який називається «колонка». Сучасні колонки ВЕРХ у більшості випадків являють собою трубку з нержавіючої сталі, наповнену дуже дрібними (1–5 мкм) частинками жорсткого пористого матеріалу. Ущільнювальний матеріал утримується всередині колонки спеціальними торцевими фітингами, оснащеними пористими фриттами, які дозволяють підключити рідинну лінію (для доставки рухомої фази в колонку). Фритти з нержавіючої сталі або титану мають розмір пор на рівні 0,2-0,5 мкм, що дозволяє проходити рухомій фазі, в той час як дрібні частинки наповнювального матеріалу затримуються всередині колонки.

Обладнання для ВЕРХ (хроматограф) в основному складається з п'яти основних частин: (1) система подачі рухомої фази; (2) система впорскування зразка; (3) система розділення; (4) система детектування; і (5) інтерфейс і система

обробки даних. Устрій такого хроматографу схематично показано на рисунку 1.2, де лише один елюент (або рухома фаза) вводиться в систему за допомогою одного механічного насоса високого тиску. Елюент протікає через систему із заданою швидкістю потоку. Такий тип потоку одного елюенту називається ізократичним режимом. Зразок аналіту вводять в аналітичну колонку або за допомогою мікрошприца (ручний режим), або більш складного автоматичного механізму впорскування, такого як електропневматичний клапан із петлею зразка або автоматичний пробовідбірник. Аналіт проходить процес розділення, а потім розділені компоненти кількісно визначаються при обробці отриманих хроматограм (рис. 1.2).

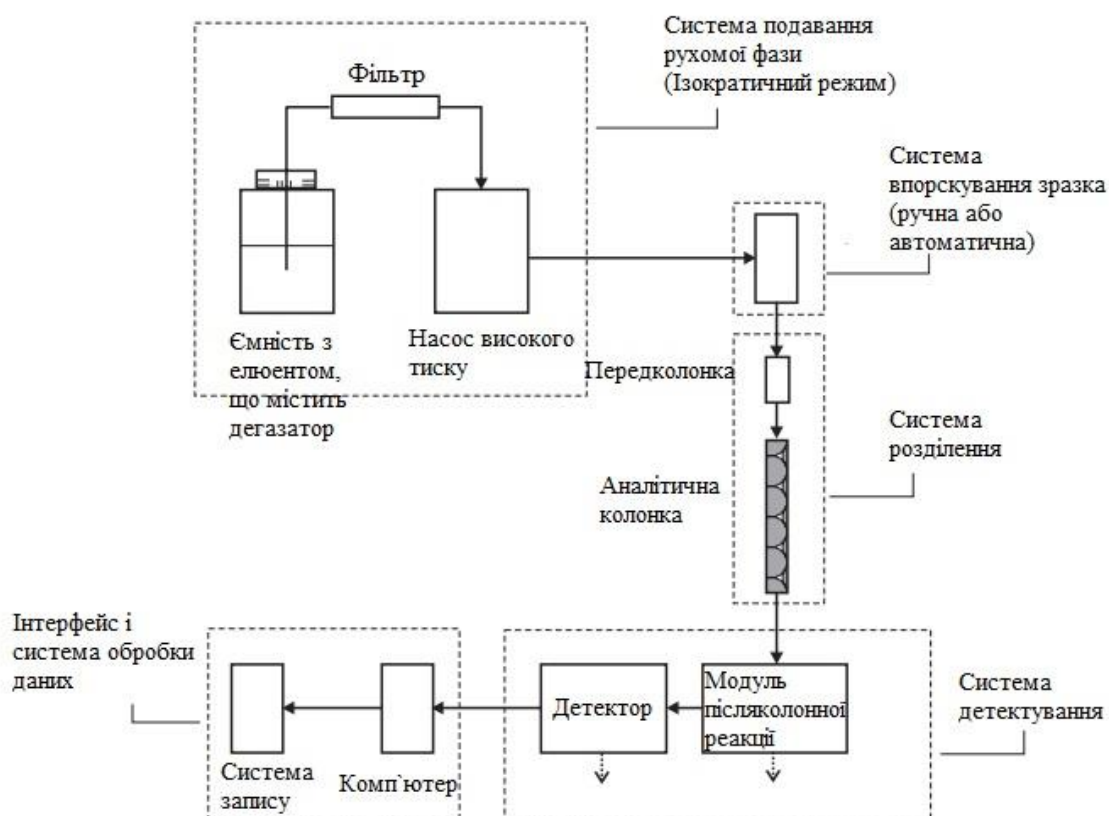


Рисунок 1.2 Принципова діаграма типової установки ВЕРХ із простою ізократичною системою рухомої фази

Кращої продуктивності хроматографічного обладнання можна досягнути при подачі рухомої фази двома насосами для змішування двох елюентів (рисунок 1.3). Склад рухомої фази безперервно змінюється, або лінійно, або відповідно до увігнутої чи опуклої кривої, щоб досягти ефективного розділення компонентів зразка з широкою різною спорідненістю до нерухомої фази.

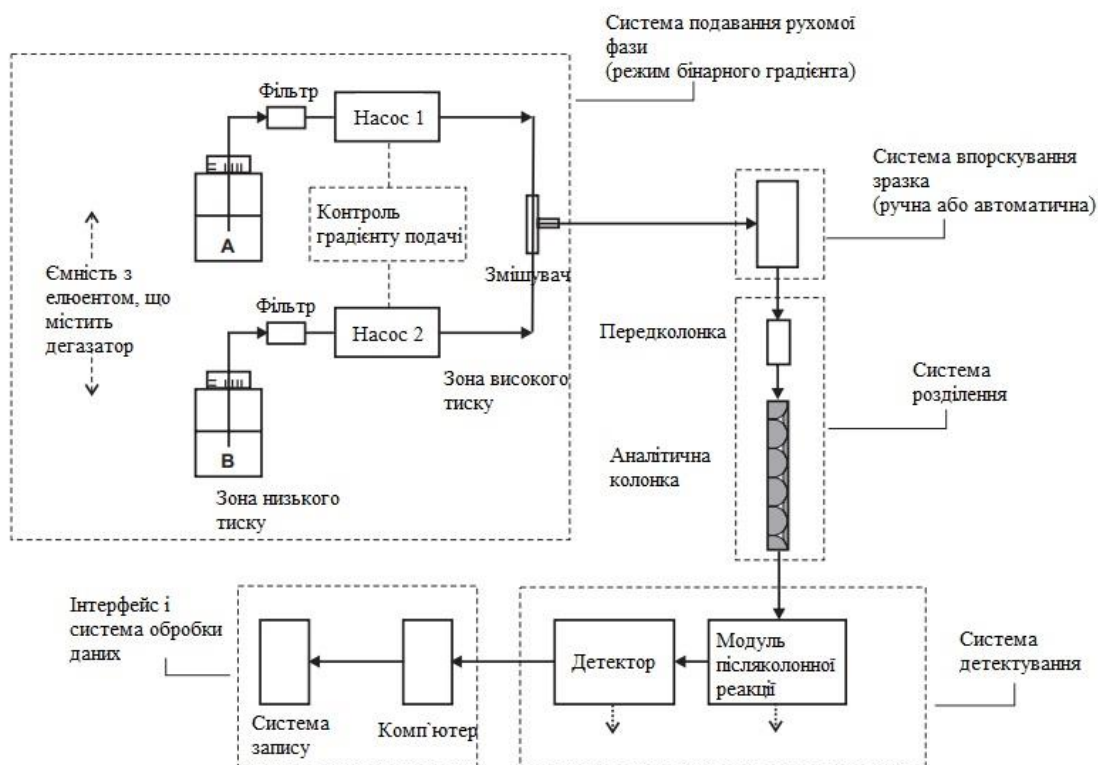


Рисунок 1.3 Принципова діаграма типової установки ВЕРХ із системою подачі рухомої фази з бінарним градієнтом

### *Система подавання рухомої фази*

У ВЕРХ дегазована рідина або елюент (зберігається в резервуарі, стійкому до хімічної корозії) проходить через аналітичну колонку (або стаціонарний шар) і є рухомою фазою. Оскільки аналіт, як правило, розчиняється в рухомій фазі перед його введенням у хроматографічну систему, рухома фаза діє як носій для розчину зразка. У цій системі ключовим компонентом є механічний насос високого тиску,

який використовується для доставки точного, відтворюваного, постійного та безімпульсного потоку рухомої фази.

#### *Система впорскування зразка*

Пристрої для введення зразків використовують головним чином клапанний механізм, і ними можна керувати вручну або автоматично за допомогою систем електромагнітних клапанів. Мікрошприц використовується для ручного введення зразків (кількість, як правило, від 5 до 100 мкл) через перегородку (або порт голки) клапана, який має положення «Завантажити» та «Ввести». Зразок вводиться в системний контур з клапаном у положенні «Навантаження», а потім включається в поточну рухому фазу шляхом зміни клапана в положення «Введення». Конструкція інжектора така, що петлю зразка потрібно видалити вручну, перш ніж можна буде встановити іншу.

#### *Аналітична колонка*

Аналітична колонка є «серцем» обладнання ВЕРХ, оскільки вона служить для селективного розділення компонентів із суміші. Також використовуються колонки з поліетеркетону або тефлону, які більш стійкі до корозії, ніж більш поширені колонки з нержавіючої сталі. Розміри колонки зазвичай становлять 100-250 мм в довжину і від 3 до 9 мм внутрішнього діаметру. Стаціонарні фази для більшості систем ВЕРХ складаються з центрального ядра (як правило, кремнезему, полімеру або полістиролу) з функціональними групами, закріпленими на поверхні. Частинки нерухомої фази є сферичними, із середнім діаметром зазвичай від 5 до 13 мкм, які щільно упаковані в колонці.

#### *Система детектування*

Система детектування містить один або більше детекторів. Деякі детектори здатні контролювати витікання колонки, стабільну базову лінію, широкий спектр лінійності аналітичного сигналу, низький рівень шуму, високу чутливість, високу відтворюваність, нечутливість до змін швидкості потоку та температури. У найбільш часто використовуваних системах детектування рухома фаза та зразок аналіту спочатку вводяться в модуль післяколонної реакції після виходу з аналітичної колонки, щоб підвищити чутливість хроматографічної системи.

Найбільш поширені детектори для ВЕРХ хроматографів: ті, що поглинають світло в УФ-видимій (ультрафіолетово-видимій) області, вимірюють

флуоресценцію, індуковану лазером флуоресценцію, провідність; мас-спектрометри (МС), ІСР-МС (inductively coupled plasma mass spectrometry – масспектрометрія з індуктивно-пов'язаною плазмою).

#### *Інтерфейс і система обробки даних*

Детекторна система підключена до персонального комп'ютера, оснащеного спеціальним хроматографічним програмним забезпеченням. Раніше системи були підключені до реєстратора та інтегратора. Комп'ютерна система, після належної оцінки ідентичності піку та умов інтеграції, надає базову інформацію, таку як час утримування та інтегровані висоти або площі піків. Якщо дані калібрування зберігаються внутрішньо, система також надає параметри регресії звичайних алгоритмів найменших квадратів і відповідні концентрації елементів.

Успішний процес розділення та кількісного визначення у ВЕРХ залежить від правильного поєднання різних робочих умов. До них відноситься колонка, рухома фаза, довжина і діаметр колонки, витрата рухомої фази, температура колонки та кількість введеного зразка, а також статистично відповідне калібрування, як правило, з використанням синтетичних стандартних сумішей з точно відомим складом.

Чотири основні види методів ВЕРХ: нормально-фазова хроматографія, обернено-фазова хроматографія, іонообмінна хроматографія і ексклюзивна хроматографія. Основною характеристикою, що визначає кожний метод, є тип молекулярних взаємодій. Кожен конкретний вид ВЕРХ використовує одну з існуючих молекулярних сил:

1. У нормально-фазовій хроматографії використовують полярні сили;
2. У обернено-фазовій хроматографії використовують дисперсійні сили;
3. В іонообмінній хроматографії використовують іонні сили.

Четвертий тип методу ВЕРХ, ексклюзивна хроматографія, заснований на відсутності будь-яких специфічних взаємодій аналіту з нерухомою фазою (у цьому типі хромаграфії не використовується жодна з існуючих міжмолекулярних сил взаємодій).

В цій кваліфікаційній роботі при валідації методики визначення 4-фенілпіролідону-2 був використаний метод обернено-фазової ВЕРХ, тому цей тип ВЕРХ буде розглянуто детальніше.

### 1.3 Обернено-фазова хроматографія

Сьогодні обернено-фазова ВЕРХ (далі – ОФ ВЕРХ) є найпопулярнішим аналітичним методом для розділення складних сумішей у хімічній, фармацевтичній та біотехнологічній промисловості. ОФ ВЕРХ є протилежністю нормально-фазової хроматографії, з неполярною нерухомою фазою та полярною, переважно водною, рухомою фазою. На відміну від нормально-фазової ВЕРХ, обернено-фазова хроматографія використовує головним чином дисперсійні сили (гідрофобні або ван-дер-ваальсові взаємодії).

Обернено-фазова ВЕРХ є, безумовно, найпопулярнішим способом хроматографії. Майже 90% усіх аналізів низькомолекулярних зразків проводять за допомогою ОФ ВЕРХ. Одним із головних факторів його величезної популярності є здатність розділяти дуже споріднені між собою за хімічною структурою молекули та легкість варіації утримання та селективності.

Успішна розробка та вдосконалення технології виготовлення хроматографічних колонок дали поштовх до швидкого розвитку хроматографічних методів аналізу. Нерухомі фази з пористим силікагелем були модифіковані лігандами різного хімічного складу та розміру. Склад і структуру зв'язаних вуглеводнів варіюють зміною розміру зв'язаної молекули, зміною питомої поверхні адсорбенту і міцності зв'язку. Найпоширенішими використовуваними нерухомими фазами є октилсилільний (С8) силікагель та октадецилсилільний (С18) силікагель. Також популярними модифікаторами є амінопропіл (NH<sub>2</sub>), ціанопропіл (CN) та інші. Силікагель має невеликий діапазон рН (від 3 до 8), в якому зразки можна розділяти без погіршення продуктивності колонки. Вище рН = 8,0 силікагелі розчиняються та руйнують колонку. Нижче рН = 3,0 зв'язок силікагель-вуглеводень розривається, і колонка руйнується. Розділення досягається при різній взаємодії зразка із нерухомою фазою. У ОФ ВЕРХ розчинені речовини розділяються за допомогою їх гідрофобності. Більш гідрофобні речовини утримуються на колонці довше, ніж менш гідрофобні. З енергетичної точки зору це пояснюють так: дисперсійні сили, що діють при цьому типі ВЕРХ, є найслабшими міжмолекулярними силами, що робить загальну енергію взаємодії в

хроматографічній системі дуже низькою порівняно з іншими методами розділення. Через низьку енергію взаємодії аналіт–поверхня зростає чутливість методу до незначних енергетичних відмінностей у досліджуваних зразках та здатності к розділенню.

Вузкий діапазон стабільності рН сілікагелей призводить до постійного пошуку альтернативних упаковок, які можуть забезпечити більшу рН стабільність. Варіанти включають фази на основі полімерів, оксиду цирконія та вуглецевих сполук. Колонки на основі полімерів включають полі (стирол-дивінілбензол) і дивінілбензолметакрилат. Ці колонки на полімерній основі є стабільними в діапазоні рН = 0–14. Нижча ефективність полімерних колонок порівняно з колонками на основі сілікагелю зазвичай є слідством повільнішої кінетики масопереносу. Ці наповнювачі схильні до набухання/усадки в залежності від складу рухомої фази. Оксид цирконія майже нерозчинний при рН = 1-14 і стабільний при температурах вище 150 °С. Поверхня оксиду цирконія заряджається позитивно до рН = 8, після чого вона стає негативно зарядженою. Колонки на основі вуглецевих сполук хімічно стабільні в діапазоні рН = 1–14. Ці фази є дуже гідрофобними порівняно з алкілсилановими фазами і тому корисні для розділення полярних сполук. Однак вони сильно, іноді необоротно, утримують дуже гідрофобні розчинені речовини. Пористий графітізований вуглець складається з кількох мікрокристалів графіту і, отже, має значну різницю в планарних взаємодіях для конформаційних ізомерів. Міжкристалічні дислокації (нерівності в кристалічній структурі), з іншого боку, є місцями з більш високою поверхневою енергією, і, оскільки весь матеріал є провідником, вони можуть бути хімічно активними, що зменшує термін служби колонки, і їх слід брати до уваги, якщо сполуки хімічно лабільні.

Рухомі фази, які зазвичай використовуються при обернено-фазовій ВЕРХ, є водно-органічними сумішами. Найпоширенішими органічними розчинниками для рухомої фази в ОФ ВЕРХ є метанол і ацетонітрил та/або комбінації цих двох розчинників. Інші розчинники, такі як тетрагідрофуран, ізопропіловий спирт та ДМСО (Диметилсульфоксид), також використовувалися для незначного регулювання селективності; однак вони не є поширеними через обмеження високого протитиску та/або високого фонового поглинання в УФ-діапазоні.

Міркування щодо вибору розчинників рухомої фази включають сумісність між розчинниками, розчинність зразка в елюенті, полярність, пропускання світла, в'язкість, стабільність і рН. Розчинники рухомої фази повинні змішуватися і не повинні викликати випадання осаду при їх змішуванні. Наприклад, дихлорметан і вода не змішуються і не повинні використовуватися як компоненти рухомої фази.

Утримування аналіту в обернено-фазовій хроматографії є складним процесом із суперпозицією багатьох різних і відносно слабких взаємодій. Вплив молекул аналіту на поверхню сілікагелю під час його міграції через колонку посилює відмінності в цих взаємодіях і, таким чином, дозволяє отримати унікальну селективність між дуже схожими молекулами. В наш час ОФ ВЕРХ інтенсивно досліджують. Щорічно публікується понад 5000 статей про теорію, розвиток і практичне застосування обернено-фазової хроматографії.

#### **1.4 Фізичні та хімічні властивості фенібуту та 4-фенілпіролідону-2**

Рекомендована міжнародна непатентована назва (МНН): Phenibut.

Хімічна назва: (3RS)-4-Аміно-3-фенілбутанової кислоти гідрохлорид.

Фенібут ((3RS)-4-Аміно-3-фенілбутанової кислоти гідрохлорид) – кристалічний порошок білого кольору, що синтезують у промисловості. Він є легкокорозчинним у воді, 96 % спирті, майже нерозчинний у ацетоні. Водний розчин має кислу реакцію (при концентрації 2,5 г/100 мл рН = 2,5-2,7). Структурна формула фенібуту наведена на рисунку 1.4. [7-8]

Фенібут є похідним  $\gamma$ -аміномасляної кислоти (ГАМК) та фенілетиламіну. Домінуючою є його антигіпоксична та антиамнестична дії. Має транквілізуючі властивості, стимулює пам'ять і навчання, підвищує фізичну працездатність, усуває психоемоційне напруження, тривожність, страх і поліпшує сон. На відміну від транквілізаторів, під впливом фенібуту поліпшуються психологічні показники (увага, пам'ять, швидкість і точність сенсорно-моторних реакцій). Не впливає на холіно- та адренорецептори.

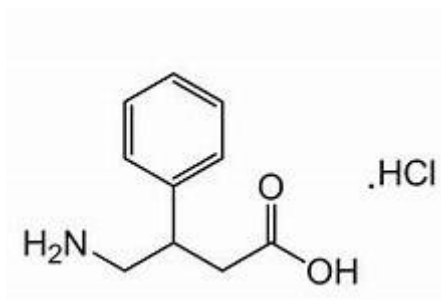


Рисунок 1.4 Структурна формула (3RS)-4-Аміно-3-фенілбутанової кислоти гідрохлориду

Препарати на основі субстанції фенібут (γ-аміно-β-фенілмасляної кислоти гідрохлорид) випускаються у формі таблеток, капсул та порошків для орального розчину. У цій кваліфікаційній роботі представлено валідацію кількісного визначення домішки 4-фенілпіролідон-2 у препараті, що представлений у формі твердих желатинових капсул.

Згідно з інструкцією для медичного застосування препарату у формі твердих желатинових капсул, що містить АФІ (активний фармацевтичний інгредієнт) фенібут:

Лікарська форма — тверді капсули.

Показання до застосування: астеничні і тривожно-невротичні стани. Занепокоєння, страх, тривога. Профілактика тривожних станів, що виникають перед хірургічними втручаннями чи хворобливими діагностичними дослідженнями. Хвороба Мен'єра. Запаморочення, пов'язані з дисфункцією вестибулярного аналізатора різного генезу. Профілактика заколисування при кінетозах. Як допоміжний засіб у комплексному лікуванні синдрому алкогольної абстиненції. У дітей лікування заїкуватості, енурезу, тиків.

Фенібут зменшує спастичність, успішно застосовується при лікуванні посттравматичного стресового розладу, «астено-депресивного» синдрому, заїкання і навіть вестибулярних розладів. У хворих з астеною і в емоційно лабільних пацієнтів вже з перших днів терапії поліпшується самопочуття, підвищується інтерес та ініціатива, мотивація до активної діяльності без седативного ефекту чи збудження. У дітей фенібут ефективний при невротичних розладах, безсонні та різних формах гіперактивності. У дітей дошкільного віку успішно

використовується при порушеннях мовлення. Завдяки своїй дії він корисний у терапії хворих на епілепсію.

Препарат добре всмоктується після перорального прийому та добре проникає у всі тканини організму, добре проходить крізь гематоенцефалічний бар'єр. Найбільше зв'язування фенібуту відбувається у печінці (80 %), воно не є специфічним. При повторному введенні кумуляції не спостерігають. [9-10]

4-фенілпіролідон-2 – майже білий або жовтуватий порошок. Помірно розчиняється в хлороформі та метанолі. Структурна формула 4-фенілпіролідону-2 наведена на рисунку 1.5:

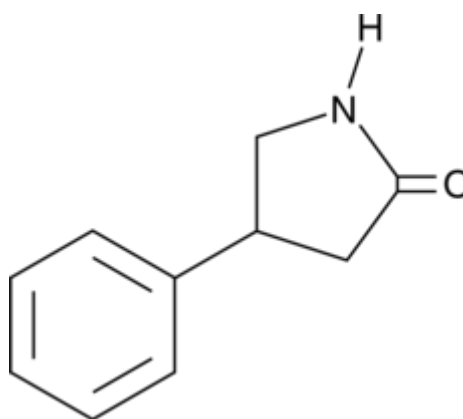


Рисунок 1.5 Структурна формула 4-фенілпіролідону-2

4-фенілпіролідон-2 є технологічною домішкою та продуктом деградації субстанції фенібуту, її вміст необхідно контролювати як у субстанції АФІ при вхідному контролі і послідовному переконтролі, так і у готовому лікарському засобі.

Були проведені випробування, що досліджують залежність вмісту домішки від впливу зовнішніх факторів. Субстанція фенібуту була піддана впливу різних чинників впродовж різних проміжків часу. Після витримання субстанції в умовах підвищеної температури, впливу окисника та ультрафіолетового випромінення, субстанція була проаналізована на вміст 4-фенілпіролідону-2. Отримані результати наведено в таблиці 1.2

Таблиця 1.2. Результати дослідження деградації фенібуту

Домішки з нормування специфікації НД* (документація виробника субстанції)	УФ-випромінювання	Термічна деградація	3 % розчин Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>
	кількісне визначення домішок, %	кількісне визначення домішок, %	кількісне визначення домішок, %
4-фенілпіролідону-2: не більше 0,1 %	0,01	0,30	0,02

\*НД – нормативний документ

Отримані результати свідчать про те, що найбільший вплив на деградацію субстанції виявляється при термічній обробці фенібуту.

Також були проведенні аналогічні випробування на готовому лікарському засобі (результати наведено в таблиці 1.3):

Таблиця 1.3 Результати дослідження деградації АФІ Фенібут в лікарському засобі «Фенібут, капсули тверді по 250 мг»

Нормування домішки за НД	УФ-випромінювання	Термічна деградація	3 % розчин Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub>
	кількісне визначення домішок, %	кількісне визначення домішок, %	кількісне визначення домішок, %
4-фенілпіролідону-2: -не більше 0,1 % на момент випуску; -не більше 0,2 % в процесі зберігання	0,01	0,05	0,05

Випробування показали, що зовнішні фактори мають незначний вплив на вміст 4-фенілпіролідону-2 у готовому лікарському засобі.

## 1.5 Валідація та метрологічні характеристики методики

Для контролю домішок використовують кількісні та граничні випробування, за допомогою яких можна підтвердити чистоту зразку. Для цього необхідно дотримуватися ряду валідаційних характеристик [11-15]. Державна Фармакопея України [1] наводить перелік випробувань, що рекомендують для проведення при валідації аналітичних методик в залежності від їх призначення. Перелік випробувань наведено у таблиці 1.4.

Таблиця 1.4 Рекомендовані випробування для валідації аналітичних методик

Типи аналітичних методик				
Характеристики	Ідентифікація	Випробування на домішки		Кількісне визначення
		Кількісні	Граничні	Розчинення, визначення вмісту, активності
Правильність	-	+	-	+
<b>Прецизійність:</b>				
Збіжність		+	-	+
Внутрішньолабораторна прецизійність		+*	-	+*
Специфічність**	+	+	+	+
Межа виявлення	-	-***	+	-
Межа кількісного визначення	-	+	-	-
Лінійність	-	+	-	+
Діапазон застосування	-	+	-	+

«-» - характеристика звичайно не досліджується;

«+» - характеристика звичайно досліджується;

\* - у тих випадках, коли проводиться дослідження відтворюваності, дослідження внутрішньолабораторної прецизійності не вимагається;

\*\* - недолік специфічності випробування можна компенсувати іншим (іншими) додатковими випробуваннями;

\*\*\* - може бути потрібним у деяких випадках (наприклад, коли межа визначення і нормована межа вмісту домішки, що визначається, близькі).

Валідацією називають процес перевірки будь-якої методики на придатність досягнення мети вимірювання, тобто, чи дотримані вимоги для опису таких характеристик, як невизначеність результатів аналізу, специфічність, лінійність, збіжність, правильність, межа кількісного та граничного визначення.

### 1.5.1 Невизначеність результатів аналізу

Для методики кількісного визначення вмісту домішок максимально допустима невизначеність результатів аналізу становить:

$$\max \Delta_{As} = 5,0\% \quad (1.1)$$

Невизначеність результатів аналізу розраховують окремо для визначення ідентифікованих та неідентифікованих домішок за формулою:

$$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2}, \quad (1.2)$$

де:  $\Delta_{SP}$  - невизначеність пробопідготовки, %;

$\Delta_{FAO}$  - невизначеність кінцевої аналітичної операції, %.

Розраховують невизначеність пробопідготовки, яка складається з невизначеності взяття наважок та отримання об'ємів в ході приготування випробовуваного розчину та розчину порівняння:

$$\Delta_{SP} = \sqrt{(\Delta_{SP})_{PP}^2 + (\Delta_{SP})_{BP}^2} = \sqrt{(\varepsilon_V^2 + \varepsilon_m^2)_{PP} + (\varepsilon_V^2 + \varepsilon_m^2)_{BP}}. \quad (1.3)$$

Для розрахунку використовують вимоги до максимально допустимих похибок посуду та максимально допустиму похибку зважування.

### 1.5.2 Специфічність методики

Специфічність методики забезпечує підтвердження повноти розділення компонентів препарату при аналізі проби.

Випробування, зазначені у підпунктах 1.5.2-1.5.6 проводять паралельно: необхідні зразки і розчини готують одночасно, проводять спільні вимірювання, використовуючи ті ж самі дані придатності хроматографічної системи. Розчини, які готують на даному етапі валідації, можуть використовуватись при виконанні випробувань 1.5.2-1.5.6.

Специфічність хроматографічної методики визначення супровідних домішок передбачає, що піки діючої речовини та її домішок на хроматограмах модельного розчину повинні розділятися з піками інших компонентів препарату та між собою.

Щоб виключити вплив на визначення аналітів інших компонентів препарату, необхідно перевірити на хроматограмі розчину плацебо, що містить усі компоненти препарату, крім 4-аміно-3-фенілбутанової кислоти та її домішок, наявність піків в діапазонах:

$$t_{R_i} \pm w_i, \quad (1.4)$$

де  $t_{R_i}$  - час утримування піку аналіту або ідентифікованої домішки;

$w_i$  - ширина піку аналіту або ідентифікованої домішки, виміряна у його основи.

Для підтвердження специфічності методики кількісного визначення домішок оцінюють спектральну чистоту піків фенібуту та 4-фенілпіролідону-2 на хроматограмах модельного розчину, який містить усі компоненти препарату та 4-фенілпіролідону-2 в максимально припустимих концентраціях.

Коефіцієнти спектральної чистоти піків (purity factor,  $F_p$ ) розраховують за УФ-спектрами, отриманими для кожної точки хроматографічного піка за допомогою спектрального модуля детектора хроматографа. Коефіцієнт спектральної чистоти є мірою подібності спектрів у всіх точках піка. Тест на спектральну чистоту підтверджує, що пік на хроматограмі обумовлений

поглинанням окремої речовини та вклад сторонніх джерел в аналітичний сигнал є незначущим.

Тест на спектральну чистоту піка пройдено, якщо  $F_p \geq 995,0$ .

### 1.5.3 Лінійність методики

Випробування на лінійність підтверджує, що методика придатна для визначення концентрації аналіту у заздалегідь визначеному діапазоні концентрацій: від 10% до 120% від максимально прийнятної концентрації 4-фенілпіролідону-2 у випробовуваному розчині

Критерії прийнятності встановлюють з урахуванням вимог ДФУ (Державна Фармакопея України) [1]:

- для вільного члена лінійної залежності  $a$ :

$$|a| \leq \frac{0,32 \cdot \max \Delta_{As}}{1 - \frac{x_{min}}{100}}, \quad (1.5)$$

де:  $\max \Delta_{As}$  – максимально допустима невизначеність результатів аналізу, що дорівнює 5,0 %;

$x_{min}$  – нижня межа досліджуваного діапазону вмісту аналіту (10,0% для 4-фенілпіролідону-2),

тобто,  $|a| \leq 1,78\%$  для 4-фенілпіролідону-2.

- для коефіцієнта кореляції  $R_c$ :

$$R_c \geq \min R_c, \quad (1.6)$$

$$\text{де: } \min R_c = \sqrt{1 - \left(\frac{\max \Delta_{As}}{t \cdot s_y}\right)^2}$$

$t$  – однібічний коефіцієнт Стюдента для ймовірності 95% і числа ступенів свободи 7 ( $t = 1,8946$ ),

$s_y$  – стандартне відхилення вибірки значень аналітичного сигналу.

тобто,

$$\min R_c = \sqrt{1 - \frac{6,96}{s_y^2}}. \quad (1.7)$$

#### 1.5.4 Правильність методики

Випробування на правильність методики визначає, що відхилення результатів визначення вмісту 4-фенілпіролідону-2 від істинного значення вмісту цієї домішки не перевищує заздалегідь визначеного критерію.

Правильність методики характеризує величина систематичної похибки  $\delta$ , тобто відхилення середнього значення відношення знайдено/введено від 100%:

$$\delta = |\bar{z} - 100|, \quad (1.8)$$

де:  $\bar{z}$  – середнє значення відношення знайдено/введено.

Систематична похибка повинна бути незначною в порівнянні з максимально допустимою невизначеністю результатів аналізу  $\max \Delta_{As}$  ( $\max \Delta_{As} = 5,0\%$ ):

$$\delta \leq 0,32 \cdot \max \Delta_{As}, \quad (1.9)$$

тобто:

$$\delta \leq 1,6\%. \quad (1.10)$$

Контроль правильності проводять для кожного аналіту окремо за наступною схемою:

##### 1. Розрахунок значень знайдено/введено

Для кожної пари значень  $x_i - y_i$  розраховують значення знайдено/ введено  $z_i$ :

$$z_i = \frac{y_i}{x_i} \cdot 100\%. \quad (1.11)$$

##### 2. Розрахунок систематичної похибки

Розраховують  $\bar{z}$  та  $\delta$  за формулами:

$$\bar{z} = \frac{\sum_{i=1}^n z_i}{n}, \quad (1.12)$$

$$\delta = |\bar{z} - 100| \quad (1.13)$$

де:  $n$  – кількість модельних розчинів.

### 1.5.5 Збіжність методики

Випробування на збіжність методики визначає, що можливий розкид результатів аналізу не перевищує заздалегідь визначеного критерію.

Розраховують довірчий інтервал одиничного значення відношення знайдено/введено  $\Delta_z$ :

$$\Delta_z = s_z \cdot t, \quad (1.14)$$

де:  $s_z$  – стандартне відхилення, розраховане за формулою:

$$s_z = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (z_i - \bar{z})^2}{n-1}}; \quad (1.15)$$

де:  $n$  – кількість модельних розчинів ( $n = 9$ );

$t$  – односторонній коефіцієнт Стьюдента для ймовірності 95% та числа ступенів свободи 8; 1,8595;

тобто:

$$\Delta_z = 1,8595 \cdot s_z \quad (1.16)$$

Довірчий інтервал  $\Delta_z$  одиничного значення для вибірки відношення знайдено/введено не має перевищувати максимально допустиму невизначеність результатів аналізу  $\max \Delta_{As}$ , що складає 5,0 %:

$$\Delta_z \leq 5,0\% \quad (1.17)$$

### 1.5.6 Контроль межі кількісного визначення

Межа кількісного визначення - найменший вміст речовини в пробі, що можна надійно кількісно визначити за допомогою обраної методики.

Оскільки межа звітності методики складає 1/10 площі піку 4-фенілпіролідону-2 на хроматограмі розчину порівняння, межа кількісного визначення не має перевищувати 10% від максимально допустимого вмісту 4-фенілпіролідону-2, тобто 0,01 %.

1. Для аналізу розраховують значення стандартного відхилення вільного члена лінійної залежності  $s_a$ :

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{n} \cdot \sum_1^n x_i^2, \quad (1.18)$$

$$\text{де: } s_b^2 = \frac{n \cdot s_0^2}{n \sum_1^n x_i^2 - (\sum_1^n x_i)^2},$$

$s_0$  - залишкове стандартне відхилення;

$s_b$  - стандартне відхилення коефіцієнту  $b$  лінійної залежності;

$n$  - кількість точок, використаних для побудови графіку лінійної залежності.

2. Для кожного аналізу розраховують межу кількісного визначення у нормалізованих координатах:

$$\text{МКВ}_{norm} = 10 \cdot \frac{s_a}{b}, \quad (1.19)$$

де:  $s_a$  - стандартне відхилення вільного члена лінійної залежності;

3. Розраховують межу кількісного визначення фенібуту та 4-фенілпіролідону-2 за формулою:

$$\text{МКВ} = \frac{\text{МКВ}_{norm} \cdot 0,2}{100} = \frac{\text{МКВ}_{norm}}{500} \quad (1.20)$$

## 2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1 Реактиви, посуд, обладнання і програми

В даній роботі використовувалися наступні реактиви, сировина та стандартні зразки:

Реактиви:

- Метанол, HPLC grade;
- Кислота фосфорна ч.д.а;
- вода деіонізована, кваліфікації HPLC (отримана на установці Millipore Academic) з питомим опором 18,2 МОм (мегаОм);

Сировина:

- фенібут;
- лактози моногідрат;
- крохмаль картопляний;
- кальцію стеарат.

Стандартні зразки:

- фенібут (ФСЗ ДФУ (Фармакопейні стандартні зразки Державної фармакопеї України));
- 4-фенілпіролідон-2 (ФСЗ ДФУ);

В даній роботі використовувалися наступні посуд і обладнання:

- фільтри мембранні з розміром пор 0,45 мкм;
- хімічні стакани;
- шпатель;
- мірний посуд (колби на 100, 200 та 1000 см<sup>3</sup> та піпетки з однією позначкою на 1, 10 та 5 см<sup>3</sup>);
- воронки пластикові для наважування;
- бюретка об'ємом 25 см<sup>3</sup>;
- воронки для вакуумного фільтрування;

- фільтри з розміром пор 0,22 мкм для вакуумного фільтрування з регенованої целюлози (Sartorius, Німеччина);
- насос вакуумний Vacuubrand;
- ваги аналітичні 2-го класу точності AB 204-S, виробництва компанії Mettler Toledo, з максимальним навантаженням 220 г (похибка зважування  $\pm 0,0001$  г) [16];
- хроматограф рідинний Agilent 1200, виробництва компанії Agilent з діодно-матричним детектором [17];

Програми:

Для обробки даних використовувалися наступні програми: Excel, Agilent Chemstation [17-18].

## **2.2 Методика визначення вмісту 4-фенілпіролідону у препараті «Фенібут, капсули по 250 мг»**

Методика була розроблена на основі нормативної документації виробника субстанції та рекомендацій до розробки аналітичних методик у фармацевтичній промисловості [15,19-25].

Випробування проводять методом рідинної хроматографії:

Близько 2500 мг (точна наважка) порошку вмісту капсул поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл води, перемішують 10 хв, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують. Отриманий розчин фільтрують крізь мембранний фторопластовий фільтр з розміром пор 0,45 мкм, відкидаючи перші 0,5 мл фільтрату (випробовуваний розчин).

2. Хроматографують розчин порівняння, отримуючи від 2 до 4 хроматограм. Для площ піків 4-аміно-3-фенілбутанової кислоти з отриманих хроматограм розраховують відносне стандартне відхилення (RSD (relative standard deviation)). Отримання паралельних хроматограм ( $n_0$ ) припиняють при досягненні вимог до RSD,  $\Delta_{imp} \leq 5\%$  [1].
3. Хроматографують розчин плацебо, розчин порівняння та випробовуваний розчин,

отримуючи число паралельних хроматограм для кожного з розчинів не менше, ніж при перевірці хроматографічної системи.

4. Хроматографування проводять на рідинному хроматографі зі спектрофотометричним детектором за наступних умов:

- колонка Kromasil C18, розміром 250 мм×4,6 мм, з розміром частинок 5 мкм, або аналогічна для якої виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»;

- детектування за довжини хвилі – 210 нм;

- температура термостату колонки – 25 °С;

- об'єм інжекції – 20 мкл;

- швидкість потоку рухомої фази – 0,8 мл/хв;

- рухома фаза: метанол — 0,1 % розчин фосфорної кислоти у співвідношенні (40:60), дегазована будь-яким зручним способом.

5.

Вміст 4-фенілпіролідону-2 ( $X_i$ ), у відсотках, розраховують за формулою:

$$X_{2i} = \frac{S_i \cdot 100 \cdot m_0 \cdot 5 \cdot P \cdot 500 \cdot 100}{S_0 \cdot m_i \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 250} = \frac{S_i \cdot m_0 \cdot P}{S_0 \cdot m_i \cdot 10^7} \quad (2.1)$$

де:  $m_i$  – маса наважки вмісту капсул, у мг;

$m_0$  – маса наважки стандартного зразку 4-фенілпіролідону-2, у мг;

$S_i$  – середнє значення площ піків 4-фенілпіролідону-2, розраховане з хроматограм випробовуваного розчину;

$S_0$  – середнє значення площ піків 4-фенілпіролідону-2, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

$P$  – вміст основної речовини в стандартному зразку 4-фенілпіролідону-2, у %;

250 – номінальна кількість діючої речовини фенібуту у лікарському засобі, у мг;

500 – номінальна маса вмісту 1 капсули, у мг.

Вміст 4-фенілпіролідону-2 має бути не більше 0,1 % на момент випуску та не більше 0,2 % у процесі зберігання.

Якщо площа піку 4-фенілпіролідону-2 на хроматограмі випробовуваного розчину є меншою, ніж 1/10 площі аналогічного піку на хроматограмі розчину порівняння, присутність такого піку не враховується.

### 2.3 Методики приготування розчинів

#### *Приготування розчину порівняння:*

5,0 мл розчину фенібуту та 5,0 мл розчину 4-фенілпіролідону-2 поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, доводять об'єм розчину водою до позначки та перемішують. Отриманий розчин фільтрують крізь мембранний фторопластовий фільтр з розміром пор 0,45 мкм, відкидаючи перші 0,5 мл фільтрату.

Розчин використовують свіжоприготованим.

#### *Приготування розчину фенібуту:*

Близько 25,0 мг (точна наважка) фенібуту (ФСЗДФУ) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл води, перемішують до розчинення наважки, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

Розчин використовують свіжоприготованим.

#### *Приготування розчину 4-фенілпіролідону-2:*

Близько 25,0 мг (точна наважка) 4-фенілпіролідону-2 (ФСЗДФУ) поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл води, перемішують до розчинення наважки, доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки та перемішують.

Розчин використовують свіжоприготованим.

#### *Приготування розчину плацебо:*

900,0 мг лактози моногідрату, 337,5 мг крохмалю картопляного, 12,5 мг кальцію стеарату поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл води, перемішують 10 хвилин, доводять об'єм розчину водою до позначки та

перемішують, отриманий розчин фільтрують крізь мембранний фторопластовий фільтр з розміром пор 0,45 мкм, відкидаючи перші 0,5 мл фільтрату.

Розчин використовують свіжоприготованим.

*Приготування 0,1 % розчину фосфорної кислоти:*

1,0 мл фосфорної кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 1000,0 мл, доводять об'єм розчину водою для хроматографії до позначки, перемішують, фільтрують та дегазують будь-яким зручним способом.

Розчин використовують свіжоприготованим.

*Приготування суміші плацебо:*

Готують суміш плацебо, що містить усі компоненти препарату, крім 4-аміно-3-фенілбутанової кислоти у розрахунку на 10 капсул препарату. Маса наважок необхідних субстанцій наведені у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 Приготування суміші плацебо

Компонент	Необхідна наважка, мг
Лактози моногідрат	1800,00
Крохмаль картопляний	675,00
Кальцію стеарат	25,00

Отриману суміш поміщають у ступку та ретельно перемішують.

*Приготування концентрованого розчину для дослідження лінійності методики:*

250,0 мг фенібуту поміщають у мірну колбу місткістю 100,0 мл, додають 70 мл води, перемішують до розчинення наважки, доводять об'єм розчину водою *P* до позначки та перемішують (концентрований розчин фенібуту).

25,0 мг (точна наважка) 4-фенілпіролідону-2 та 10,0 мл концентрованого розчину фенібуту поміщають у мірну колбу місткістю 200,0 мл, додають 100 мл

води, перемішують до розчинення наважки, доводять об'єм розчину водою до позначки та перемішують.

*Приготування модельних розчинів для дослідження лінійності методики:*

Готують 9 модельних розчинів. У кожному з 9 мірних колб місткістю 100,0 мл поміщають 1250,0 мг суміші плацебо та зазначену аліквоту концентрованого розчину. Концентрації отриманих розчинів та необхідні аліквоти концентрованого розчину зазначені у таблиці 2.2.

Таблиця 2.2 Приготування модельних розчинів для дослідження лінійності методики

№	Вміст фенібуту		Аліквота концентрованого розчину, мл	Вміст 4-фенілпіролідону-2		Аліквота концентрованого розчину, мл
	% від максимально допустимого вмісту відповідної домішки	% від номінального вмісту фенібуту у випробовуваному розчині, %		% від максимального допустимого вмісту 4-фенілпіролідону-2	% від номінального вмісту 4-фенілпіролідону-2 у випробовуваному розчині, %	
1	10	0,01	1,0	10	0,01	1,0
2	20	0,02	2,0	20	0,02	2,0
3	40	0,04	4,0	40	0,04	4,0
4	60	0,06	6,0	60	0,06	6,0
5	80	0,08	8,0	80	0,08	8,0
6	90	0,09	9,0	90	0,09	9,0
7	100	0,10	10,0	100	0,10	10,0
8	110	0,11	11,0	110	0,11	11,0
9	120	0,12	12,00	120	0,12	12,0

Доводять об'єм розчину водою до позначки та перемішують. Отримані розчини фільтрують крізь мембранний фторопластовий фільтр з розміром пор 0,45

мкм, відкидаючи перші 0,5 мл фільтрату.

## 2.4 Проведення вимірювань та аналіз результатів

### 2.4.1 Підготовка приладу до аналізу

Перед вмиканням приладу на нього встановлюється необхідна колонка. Після вмикання приладу на комп'ютері, з якого проводиться контроль хроматографування, запускається програмне обладнання Agilent Chemstation. Обирається заздалегідь створений метод, у який закладені усі необхідні параметри, зазначені у описі методики. Вмикають лампу детектора та нагрівач термостат колонки, очікують статусу «Ready» модулів детектора та термостату колонки. Вмикають насос, проводять промивання колонки за допомогою води, швидкість потоку обирають зазначену у методиці та швидкість набору потоку 0,2 мл/хв<sup>2</sup>. Після встановлення сталого тиску промивання продовжують 15 хвилин, після чого промивання продовжують рухомою фазою за тих же умов. Промивання рухомою фазою продовжують, поки дрейф базової лінії детектора не встановлюється на значенні 1 mAu/хв.

### 2.4.2 Перевірка придатності хроматографічної системи

Хроматографують розчин порівняння у режимі Single run, отримуючи від 2 до 4 хроматограм. Для площ піків 4-аміно-3-фенілбутанової кислоти з отриманих хроматограм розраховують відносне стандартне відхилення (RSD). Отримання паралельних хроматограм припиняють при досягненні вимог до RSD,  $\Delta_{imp} \leq 5\%$  [1]. Також перевіряють відповідність отриманих піків наступним критеріям:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована з хроматограм розчину порівняння за піком фенібуту, має бути не менше 2000 теоретичних тарілок;

- коефіцієнт симетрії піку фенібуту, розрахований з хроматограм розчину порівняння, має бути не більше 2,0;
- ефективність хроматографічної колонки, розрахована з хроматограм розчину порівняння за піком 4-фенілпіролідону-2, має бути не менше 2000 теоретичних тарілок;
- коефіцієнт симетрії піку 4-фенілпіролідону-2, розрахований з хроматограм розчину порівняння, має бути не більше 2,0.

Результати перевірки роздруковують у програмному забезпеченні Agilent chemstation, обираючи шаблон Extended performance.

### 2.4.3 Хроматографування зразків

Після перевірки придатності хроматографічної системи програмують наступну послідовність аналізу у програмному забезпеченні:

1. Розчин плацебо
2. Розчин порівняння
3. Модельний розчин 7
4. Модельний розчин 1
5. Модельний розчин 2
6. Модельний розчин 3
7. Модельний розчин 4
8. Модельний розчин 5
9. Модельний розчин 6
10. Модельний розчин 7
11. Модельний розчин 8
12. Модельний розчин 9
13. Промивання колонки (Для цього у послідовності встановлюється метод промивання)

Кількість інжекцій встановлюють таку ж, як при перевірці придатності хроматографічної системи.

#### 2.4.4 Обробка результатів хроматографування

В програмному забезпеченні Agilent Chemstation роздруковуються хроматограми розчинів за наступними шаблонами (Таблиця 2.3):

Таблиця 2.3 Шаблиони хроматограм розчинів

№	Розчин	Шаблон
1	Розчин плацебо	Short
2	Розчин порівняння	Short
3	Модельний розчин 7	Short+Performance
4	Модельний розчин 1	Short
5	Модельний розчин 2	Short
6	Модельний розчин 3	Short
7	Модельний розчин 4	Short
8	Модельний розчин 5	Short
9	Модельний розчин 6	Short
10	Модельний розчин 7	Short
11	Модельний розчин 8	Short
12	Модельний розчин 9	Short

## 2.5 Розрахунки та результати дослідження

### 2.5.1 Перевірка невизначеності результатів аналізу

Кінцева невизначеність результатів аналізу не має перевищувати 5,0 %.

Розрахунки невизначеності результатів аналізу наведені у таблиці 2.4:

Таблиця 2.4 Розрахунки невизначеності результатів аналізу:

Наважка, мг		$\Delta_m$ , мг	Формула для розрахунку $\epsilon_m$ , %	$\epsilon_m$ , %			
СЗ	25,0	0,2	$\epsilon_m = \frac{\Delta_m}{m} \cdot 100\%$	0,8			
Препарат	2500,0			0,008			
<b>Розрахунок невизначеності взяття об'ємів, <math>\epsilon_v</math>, %</b>							
Мірна колба			Піпетка				
V, мл	$\epsilon_{vi}$ , %	$n_i$		V, мл	$\epsilon_{vi}$ , %	$n_i$	
		РП	Зр			РП	Зр
100	0,12	2	1	5	0,37	1	-
$\epsilon_v^2 = \epsilon_{v, \text{піпетка}}^2 + \epsilon_{v, \text{колба}}^2 = (\sum \epsilon_{v,i}^2 \cdot n_i)_{\text{піпетка}} + (\sum \epsilon_{v,i}^2 \cdot n_i)_{\text{колба}}$							
$\epsilon_{v, \text{РП}}^2 = 0,1657$				$\epsilon_{v, \text{Зр}}^2 = 0,0144$			
<b>Розрахунок невизначеності пробонідготовки <math>\Delta_{SP}</math>:</b>							
$\Delta_{SP}^2 = (\Delta_{SP}^2)_{\text{РП}} + (\Delta_{SP}^2)_{\text{Зр}} = (\epsilon_m^2 + \epsilon_v^2)_{\text{РП}} + (\epsilon_m^2 + \epsilon_v^2)_{\text{Зр}} = 0,8202$							
<b>Розрахунок невизначеності хроматографування <math>\Delta_{FAO}</math></b>							
$n$	$RSD_n$	$t$ для $2(n-1)$	$\Delta_{FAO, n} = t \cdot RSD_n \cdot \sqrt{2/n}$	$\max \Delta_{FAO}$			
2	0,80	2,9200	3,3036	4,1496			
3	2,11	2,1318	3,6727				
4	3,02	1,9432	4,1496				
<b>Розрахунок прогнозованої невизначеності результатів аналізу <math>\Delta_{As}</math>:</b>							
$\Delta_{As} = \sqrt{\Delta_{FAO}^2 + \Delta_{SP}^2} = 4,3$							

Розраховане значення кінцевої невизначеності результатів аналізу становить 4,3 %, що є прийнятним.

### 2.5.2 Перевірка специфічності методики

На хроматограмах розчину плацебо не має бути піків з часом утримування в діапазоні  $t_R \pm w$  для піків фенібуту або 4-фенілпіролідону-2;

Коефіцієнт спектральної чистоти піків фенібуту або 4-фенілпіролідону-2 на хроматограмах випробовуваного розчину має бути не менше 995,0:  $F_p \geq 995,0$ .

Результати дослідження специфічності методики представлено в таблиці 2.5:

Таблиця 2.5 Результати дослідження специфічності методики

<b>1. Приготування розчину порівняння</b>			
Компонент		Необхідна наважка, мг	Взята наважка, мг
СЗ фенібуту		25,0	25,2
СЗ 4-фенілпіролідону-2		25,0	25,3
<b>2. Приготування концентрованого розчину плацебо</b>			
Компонент		Необхідна наважка, мг	Взята наважка, мг
Лактоза, моногідрат		1800,0	1801,2
Крохмаль картопляний		675,0	675,4
Кальцію стеарат		25,0	25,1
<b>3. Аналіз розчинів</b>			
Хроматограма №		1	2
Розчин порівняння	$t_R$	17,826	17,843
	$w$	0,335	0,314
	$t_{R \pm w}$	17,826±0,335	17,843±0,314
	Об'єднаний діапазон $t_{R \pm w}$	17,826±0,335	
Розчин плацебо	Наявність піків в об'єднаному діапазоні	<b>Немає</b>	<b>Немає</b>
Моделльний розчин 7	$F_p$	<b>999,976</b>	<b>999,967</b>

\*СЗ - стандартні зразки

### 2.5.3 Перевірка лінійності методики

Вільний член лінійної залежності:  $|a| \leq 1,78\%$  для 4-фенілпіролідону-2;

Коефіцієнт лінійної кореляції  $R_c \geq \min R_c$ .

За отриманими даними розраховують наведені концентрації 4-фенілпіролідону-2 в  $i$ -ому модельному розчині:

$$x_i = \frac{m \cdot V_i \cdot P \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{200 \cdot 100 \cdot 100 \cdot m_0 \cdot 5 \cdot P_0} \cdot 100\% = \frac{m \cdot V_i \cdot P \cdot 10}{m_0 \cdot P_0}, \quad (2.2)$$

де:  $m$  – маса наважки 4-фенілпіролідону-2, взята для приготування концентрованого розчину, у мг;

$m_0$  – маса наважки СЗ 4-фенілпіролідону-2, взята для приготування розчину порівняння, у мг;

$P$  – вміст основної речовини, взятої для приготування концентрованого розчину 4-фенілпіролідону-2, у %;

$P_0$  – вміст основної речовини в СЗ 4-фенілпіролідону-2, взятої для приготування розчину порівняння, у %;

$W$  – вміст води в субстанції 4-фенілпіролідону-2, взятої для приготування концентрованого розчину, %;

$V_i$  – аліквота концентрованого розчину, взята для приготування  $i$ -го модельного розчину, у мл;

Також розраховують наведені площі хроматографічних піків  $y_i$ :

$$y_i = \frac{S_i}{S_0} \cdot 100\%, \quad (2.3)$$

де:  $S_i$  – середнє значення площ піків аналіту, розраховане з хроматограм  $i$ -го модельного розчину;

$S_0$  – середнє значення площ піків аналіту, розраховане з хроматограм розчину порівняння;

Для лінійної залежності вигляду:

$$y_i = a + b \cdot x_i \quad (2.4)$$

розраховують методом найменших квадратів параметри  $a$  та  $b$ :

$$a = \frac{\sum_1^n y_i - b \cdot \sum_1^n x_i}{n}; b = \frac{n \cdot \sum_1^n x_i y_i - \sum_1^n x_i \cdot \sum_1^n y_i}{n \cdot \sum_1^n x_i^2 - (\sum_1^n x_i)^2}, \quad (2.5)$$

де  $n$  – кількість точок, використаних для побудови залежності.

Використовуючи отримані значення  $a$  і  $b$ , для кожного значення  $x_i$  отримують розраховане значення наведеної площі хроматографічного піку  $Y_i$ :

$$Y_i = a + b \cdot x_i \quad (2.6)$$

Розраховують величину залишкової дисперсії  $s_0^2$ :

$$s_0^2 = \frac{\sum_1^n (y_i - Y_i)^2}{n-2} \quad (2.7)$$

і дисперсії вибірки  $y_i - s_y^2$ :

$$s_y^2 = \frac{\sum_1^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}, \quad (2.8)$$

де  $\bar{y}$  – середнє значення вибірки  $y_i$ .

Розраховують  $R_c$  – коефіцієнт кореляції залежності  $y_i(x_i)$ :

$$R_c = \sqrt{1 - \frac{s_0^2}{s_y^2}} \quad (2.9)$$

та мінімальне значення коефіцієнта кореляції  $\min R_c$ :

$$\min R_c = \sqrt{1 - \frac{6,96}{s_y^2}} \quad (2.10)$$

Результати дослідження лінійності методики наведені у таблиці 2.6:

Таблиця 2.6 Результати дослідження лінійності методики

<b>1. Приготування концентрованого розчину</b>						
Компонент		Необхідна наважка, мг	Взята наважка, мг	Вміст основної речовини в наважці, %		
Фенібут		250,0	250,5	99,8		
4-фенілпіролідон-2		25,0	25,1	99,8		
<b>2. Приготування та аналіз модельних розчинів</b>						
№	% від максимал	% від номінального	Об'єм аліквот	$\bar{S}_i$	$x_i, \%$	$y_i, \%$

	бно допустимого вмісту	вмісту 4-фенілпіролідону-2 у випробовуваному розчині, %	и конц. р-ну, мл			
1	10	0,01	1,0	92,355	9,92	9,77
2	20	0,02	2,0	187,142	19,84	19,80
3	40	0,04	4,0	368,533	39,68	38,99
4	60	0,06	6,0	561,306	59,53	59,39
5	80	0,08	8,0	747,377	79,37	79,07
6	90	0,09	9,0	836,492	89,29	88,50
7	100	0,10	10,0	931,514	99,21	98,55
8	110	0,11	11,0	1028,631	109,13	108,83
9	120	0,12	12,0	1116,217	119,05	118,09
Розчин порівняння				945,188	-	-

### 3. Параметри лінійної залежності

$ a , \%$	0,0050	$b$	0,9938	Рівняння прямої $y = 0,9938 * x + 0,0050$
-----------	--------	-----	--------	--

### 4. Розрахунок значення коефіцієнта кореляції та вимоги до нього

$s_y^2$	1531,4000	$R_c$	1,0000
$s_0^2$	0,0757	$min$	0,9977

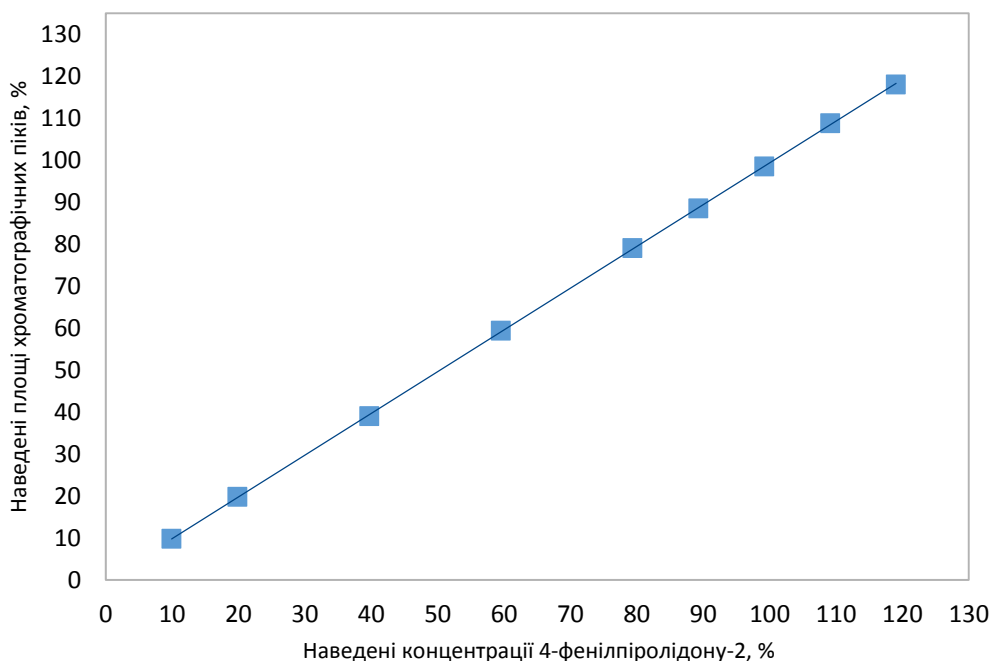


Рис. 2.1 Залежність аналітичного сигналу від концентрації аналіту у модельних розчинах

#### 2.5.4 Перевірка правильності методики

Критерієм правильності аналітичної методики слугує систематична похибка – похибка вимірювання, що може бути сталою або залежати від низки умов. Похибка, що є змінною, може прогресувати, що можна пояснити деградацією приладу в процесі експлуатації, або може періодично змінюватись, наприклад, через коливання температури протягом доби. До складових систематичної похибки можна віднести інструментальну похибку, методичну похибку та похибку оператора.

Систематична похибка має задовольняти критерію  $\delta < 1,6\%$ . Розрахунок систематичної похибки наведено на таблиці 2.7:

Таблиця 2.7 Результати дослідження правильності методики

<i>1. Розрахунок відношення знайдено/введено <math>z_i</math></i>	
№ модельного розчину	$z_i, \%$
1	100,50

2	99,80
3	98,26
4	99,76
5	99,62
6	99,17
7	99,33
8	99,73
9	99,19
<b>2. Розрахунок <math>\delta</math>-критерію</b>	
$\bar{z}, \%$	99,48
$\delta, \%$	0,52

Отримане значення систематичної похибки  $\delta=0,52 \%$  не перевищує критерій прийнятності, значення якого дорівнює  $1,6 \%$ .

### 2.5.5 Збіжність методики

Збіжність методики показує її точність при виконанні аналізу в аналогічних умовах впродовж деякого часу.

Довірчий інтервал  $\Delta_z$  одиничного значення для вибірки відношення знайдено/введено не має перевищувати  $5,0 \%$ .

Результати дослідження збіжності методики наведено у таблиці 2.8.

Таблиця 2.8 Результати дослідження збіжності методики

<b>Результати контролю</b>	
<b>Розрахунок довірчого інтервалу розрахованих значень знайдено/введено</b>	
$s_z, \%$	0,561
$\Delta_z, \%$	1,04

Отримане значення довірчого інтервалу  $\Delta_z=1,04 \%$  не перевищує критерій прийнятності, значення якого дорівнює  $5,0 \%$ .

### 2.5.6 Розрахунок межі кількісного визначення

Межа кількісного визначення методики показує, яку мінімальну концентрацію аналіту можна визначити за допомогою методики з необхідною правильністю та точністю. Визначення необхідно за низької концентрації аналізованої речовини, зазвичай, домішки.

Межа кількісного визначення має задовільняти наступному критерію:  $\text{МКВ} \leq 0,01\%$ .

Результати розрахунку межі кількісного визначення методики зазначені у таблиці 2.9:

Таблиця 2.9 Результати розрахунку межі кількісного визначення методики

<b>1. Розрахунок стандартного відхилення вільного члена лінійної залежності</b>	
$s_b^2$	0,0000061
$s_a^2$	0,038
<b>2. Розрахунок межі кількісного визначення</b>	
$\text{МКВ}_{\text{норм}} = 10 \cdot \frac{s_a}{b}$	1,96
$\text{МКВ} = \frac{\text{МКВ}_{\text{норм}}}{500}$	0,004

Отримане значення  $\text{МКВ} = 0,004\%$  не перевищує критерій прийнятності, значення якого дорівнює  $0,01\%$ .

## ВИСНОВКИ

1. Проведено літературний огляд методу вискоєфективної рідинної хроматографії, фізичних та хімічних властивостей фенібуту, застосування у фармацевтичній промисловості.

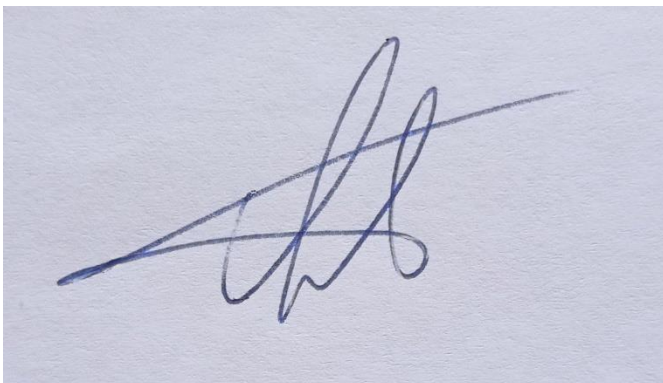
2. Проведено літературний огляд вимог до валідації аналітичних методик у фармацевтичному аналізі та встановлено перелік випробувань, що необхідні для валідації методики визначення вмісту домішки 4-фенілпіролідону-2 у лікарському засобі Фенібут, капсули по 250 мг.

3. Досліджено властивості домішки фенібуту 4-фенілпіролідону-2, залежності його вмісту в субстанції фенібуту та готовому лікарському засобі Фенібут, капсули по 250 мг від впливу ультрафіолетового опромінення, нагрівання та наявності окисника.

4. Знайдено, що невизначеність результатів аналізу, специфічність, лінійність, правильність та збіжність методики відповідають критеріям придатності.

5. Розраховано, що значення межі кількісного визначення для досліджуваної методики становить 0,004 %, що є нижчим за межу звітності методики, яка становить 0,05 %.

6. Встановлено, що аналітична методика визначення вмісту 4-фенілпіролідону-2 у лікарському засобі Фенібут, капсули по 250 мг відповідає усім критеріям валідаційних випробувань та є придатною для подальшого використання у фармацевтичній промисловості.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Міністерство охорони здоров'я України. Державна фармакопея України. Київ: Державний експертний центр МОЗ України, **2015**, т. 1, 1153 с.
2. Snyder L.R., Kirkland J.J., Dolan J.W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 3rd. ed. Wiley, **2011**, 960 с.
3. Хроматографічні методи аналізу : навч. посіб. / Федорченко Софія Володимирівна, Курта Сергій Андрійович. – Івано-Франківськ : Прикарп. нац. ун-т ім. В. Стефаника, 2012. – 146 с.
4. Swartz M.E. Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction. LCGC North America, **2005**.
5. Heftmann E. Chromatography: Fundamentals and Applications of Chromatographic and Electrophoretic Methods. Springer, **2004**.
6. Lloyd R.S. HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice. Wiley, **2015**.
7. Lapin I. Phenibut (beta-phenyl-GABA): A Tranquilizer and Nootropic Drug. CNS Drug Reviews, **2001**.
8. ChemicalBook. Phenibut (CAS 1078-21-3) // [www.chemicalbook.com](http://www.chemicalbook.com).
9. Centers for Disease Control and Prevention. Notes from the field: Phenibut exposures reported to poison centers – United states, **2009-2019**. [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov).
10. U.S.Food and Drug Administration. Phenibut in dietary supplements. [www.fda.gov](http://www.fda.gov).
11. Renger B. Validation of Analytical Procedures. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2004**.
12. United States Pharmacopeial Convention (USP). United States Pharmacopeia and National Formulary (USP-NF). 47th Edition – 42nd Edition. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; **2024**.
13. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). European Pharmacopoeia. 11th Edition, Council of Europe, Strasbourg, **2024**.
14. British Pharmacopoeia **2024**. British Pharmacopoeia Commission. Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, London, United Kingdom.
15. ICH Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization, **2005**.

16. Mettler Toledo. Operating instructions AB-S. [www.mt.com](http://www.mt.com).
17. Agilent Technologies. Understanding Your Agilent ChemStation. [www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2070-91126\\_Understanding.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2070-91126_Understanding.pdf).
18. Agilent Technologies. Application Notes: Validation of HPLC Methods Using Chemstation Software.
19. Swartz M.E., Krull I.S. Analytical Method Development and Validation. CRC Press, **2012**.
20. Kazakevich Y., LoBrutto R. HPLC for Pharmaceutical Scientists. Wiley, **2007**.
21. Bakshi M., Singh S. Development of Validated Stability-Indicating Assay Methods – Critical Review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2002**.
22. Qiu F., Norwood D.L. Identification of Pharmaceutical Impurities. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **2007**.
23. Xu X., Madden T.L. HPLC Method Development for Pharmaceuticals. CRC Press, **2016**.
24. Ravisankar P., Vasuvedan P., Ramiseti N. HPLC Method Development and Validation – An Overview. Pharmaceutical Research, **2018**.
25. Rajkumar A. Sharma A. Advanced Chromatographic Techniques in Pharmaceutical Analysis. CRC Press, **2021**.