

М. Є. Блажеєвський, О. В. Ковальська, Є. О. Цапко, Д. Д. Шаповаленко

Національний фармацевтичний університет, Україна

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: lena05021985@ukr.net

Розробка та валідація ензимної кінетико-фотометричної методики визначення залишкових кількостей деквалінію хлориду на поверхні фармацевтичного обладнання

Мета. Розробка та валідація нової ензимної кінетико-фотометричної методики аналізу деквалінію хлориду, що ґрунтується на використанні реакції ферментного гідролізу ацетилхоліну, для визначення залишкових кількостей деквалінію хлориду при здійсненні контролю повноти очищення фармацевтичного обладнання.

Результати та обговорення. Встановлені оптимальні умови перебігу ензимної реакції – порядок змішування та концентрації ацетилхоліну (0,05 мг/мл), холінестерази (0,4 мг/мл), водню пероксиду (10 %) та *p*-фенетидину (1 %), час витримування реакційної суміші (20 хв), рН середовища (8,35), вплив природи буферного розчину. Проведено валідацію розробленої методики – запропоновано діапазон застосування методики (40–160 % в нормалізованих координатах, за 100 % обрано максимально допустиму концентрацію деквалінію хлориду в змивах з фармацевтичного обладнання $x_{crit} = 0,5$ мкг/мл), кількість концентраційних рівнів ($n = 7$) та порядок їх розташування всередині діапазону застосування, з урахуванням чого розраховано максимально допустиму невизначеність методики ($\max\Delta_x = 3,05$ %) і, відповідно, критерії прийнятності параметрів лінійної залежності, систематичної та випадкової похибок. Показано, що валідаційні характеристики розробленої методики відповідають розрахованим критеріям прийнятності. Встановлено ступінь екстракції деквалінію хлориду зі свабу зі змивом з фармацевтичного обладнання.

Експериментальна частина. Визначення залишкових кількостей деквалінію хлориду на поверхні фармацевтичного обладнання визначали за ступенем інгібування ензимної реакції, який оцінювали за залишком субстрату біохімічної реакції – ацетилхоліну, що не прореагував. Визначення залишкової кількості ацетилхоліну в реакційній суміші виконували кінетико-фотометричним методом за індикаторною реакцією окиснення *p*-фенетидину надацетатною кислотою (утворюється під час допоміжної реакції пергідролізу при додаванні до реакційної суміші надлишку водню пероксиду), реєструючи світлопоглинання утворюваного продукту реакції – азоксифенетолу ($\lambda_{max} = 358$ нм) впродовж певного періоду часу.

Висновки. Розроблено ензимну кінетико-фотометричну методику визначення залишкових кількостей деквалінію хлориду на поверхні фармацевтичного обладнання після його очищення. Проведено валідацію розробленої методики за такими параметрами, як лінійність, правильність, прецизійність та межа кількісного визначення.

Ключові слова: деквалінію хлорид; холінестераза; ацетилхолін; валідація

M. Ye. Blazheyevskiy, O. V. Kovalska, Ye. O. Tsapko, D. D. Shapovalenko

National University of Pharmacy, Ukraine

Development and validation of the enzymatic kinetic photometric procedure for determination of residual quantities of dequalinium chloride on the surface of the pharmaceutical equipment

Aim. To develop and validate the new enzymatic kinetic photometric procedure for analysis of dequalinium chloride based on application of enzymatic acetylcholine hydrolysis to determine the residual quantities of dequalinium chloride while monitoring the completeness of cleaning of the pharmaceutical equipment.

Results and discussion. The optimal conditions for the enzymatic reaction course were determined – the order of mixing and the concentration of acetylcholine (0.05 mg/mL), cholinesterase (0.4 mg/mL), hydrogen peroxide (10 %) and *p*-phenetidine (1 %), the time of the reaction mixture maintaining (20 min), pH (8.35), the effect of the nature of the buffer solution. Validation of the procedure developed was carried out – the application range of the procedure was proposed (40–160 % in the normalized coordinates, the maximum acceptable concentration of dequalinium chloride in washes from the pharmaceutical equipment $x_{crit} = 0.5$ μ g/mL), the number of concentration levels ($n = 7$); the order of their location within the application range, taking these data into account the maximum acceptable uncertainty of the procedure ($\max\Delta_x = 3.05$ %) and the acceptability criteria for linear dependence parameters, systematic and random errors were calculated. The validation characteristics of the procedure developed were shown to correspond to the acceptability criteria calculated. The degree of extraction of dequalinium chloride from swabs with flushing from the pharmaceutical equipment was determined.

Experimental part. The residual quantities of dequalinium chloride on the surface of the pharmaceutical equipment were determined by the degree of inhibition of the enzymatic reaction assessed by the unreacted residue of the substrate of the biochemical reaction, such as acetylcholine. The residual quantities of acetylcholine in the reaction mixture was determined by the kinetic photometric method by the indicator reaction of *p*-phenetidine oxidation with peracetic acid (formed during the auxiliary perhydrolysis reaction when adding an excess of hydrogen peroxide to the reaction mixture) in the way of registering the light absorbance of the resulting reaction product – azoxifenetole ($\lambda_{max} = 358$ nm) for a definite period of time.

Conclusions. The enzymatic kinetic photometric procedure has been developed to determine the residual quantities of dequalinium chloride on the surface of the pharmaceutical equipment after its cleaning. The procedure developed has been validated by such parameters as linearity, accuracy, precision and the limit of quantification.

Key words: dequalinium chloride; cholinesterase; acetylcholine; validation

Н. Е. Блажеевский, Е. В. Ковальская, Е. А. Цапко, Д. Д. Шаповаленко

Национальный фармацевтический университет, Украина

Разработка и валидация энзимной кинетико-фотометрической методики определения остаточных количеств деквалиния хлорида на поверхности фармацевтического оборудования

Цель. Разработка и валидация новой энзимной кинетико-фотометрической методики анализа деквалиния хлорида, основанной на использовании реакции ферментного гидролиза ацетилхолина, для определения остаточных количеств деквалиния хлорида при проведении контроля полноты очистки фармацевтического оборудования.

Результаты и обсуждение. Установлены оптимальные условия протекания энзимной реакции – порядок смешивания и концентрации ацетилхолина (0,05 мг/мл), холинэстеразы (0,4 мг/мл), пероксида водорода (10 %) и *l*-фенетидина (1 %), время выдерживания реакционной смеси (20 мин), pH среды (8,35), влияние природы буферного раствора. Проведена валидация разработанной методики – предложен диапазон применения методики (40–160 % в нормализованных координатах, за 100 % взята максимально допустимая концентрация деквалиния хлорида в смывах с фармацевтического оборудования $X_{crit} = 0,5$ мкг/мл), количество концентрационных уровней ($n = 7$) и порядок их расположения внутри диапазона применения, с учетом чего рассчитана максимально допустимая неопределенность методики ($\max \Delta_x = 3,05$ %) и, соответственно, критерии приемлемости параметров линейной зависимости, систематической и случайной погрешностей. Показано, что валидационные характеристики разработанной методики соответствуют рассчитанным критериям приемлемости. Установлена степень экстракции деквалиния хлорида из смывов со смывом с фармацевтического оборудования.

Экспериментальная часть. Определение остаточных количеств деквалиния хлорида на поверхности фармацевтического оборудования определяли по степени ингибирования энзимной реакции, которую оценивали по непрореагировавшему остатку субстрата биохимической реакции – ацетилхолина. Определение остаточного количества ацетилхолина в реакционной смеси выполняли кинетико-фотометрическим методом по индикаторной реакции окисления *l*-фенетидина перуксусной кислотой (образуется в ходе вспомогательной реакции пергидролиза при добавлении к реакционной смеси избытка пероксида водорода), регистрируя светопоглощение образующегося продукта реакции – азоксифенетола ($\lambda_{max} = 358$ нм) в течение определенного периода времени.

Выводы. Разработана энзимная кинетико-фотометрическая методика определения остаточных количеств деквалиния хлорида на поверхности фармацевтического оборудования после его очистки. Проведена валидация разработанной методики по таким параметрам, как линейность, правильность, прецизионность и предел количественного определения.

Ключевые слова: деквалиния хлорид; холинэстераза; ацетилхолин; валидация

Належна виробнича практика (GMP) являє собою комплекс заходів, спрямований на забезпечення якості фармацевтичної продукції, в свою чергу, валидація та кваліфікація – це, власне, і є розділи GMP, які забезпечують належний контроль технологічних систем, обладнання, процесів, порядку здійснення досліджень, що забезпечує випуск якісної продукції [1].

На теперішній час в Україні триває процес створення методичної бази визначення залишкових кількостей лікарських препаратів після очищення фармацевтичного обладнання [2]. Дану роботу присвячено розробці методики визначення залишкових кількостей четвертинних амонієвих сполук (ЧАС) після очищення фармацевтичного обладнання на прикладі деквалінію хлориду (ДХ), застосування якої у майбутньому дозволить забезпечити конкурентну спроможність фармацевтичної продукції вітчизняних виробників.

Деквалінію хлорид (Dequalinii Chloridum ($C_{30}H_{40}Cl_2N_4$) – 1,1'-декан-1,10-ділбіс(4-аміно-2-метилхінолін) дихлорид) є четвертинною амонієвою сполукою, що характеризується антисептичними властивостями і широко застосовується в медицині для терапії гострих респіраторних захво-

рювань та бактеріальних вагінозів вже понад 30 років [3–6]. Бактерицидна дія ДХ пов'язана з посиленням проникності клітин патогенних мікроорганізмів та впливом на їх мітохондрії, що призводить до зниження ензимної активності [5, 6]. На ринку України представлено ряд лікарських препаратів на основі ДХ як активного фармацевтичного інгредієнту, серед яких як брендові, виготовлені за межами України (Ангіноваг, Декатилен, Тевалор, Флуомізін), так і препарати-генерики вітчизняного походження (Амілар ІС, Деквадол, Ларитилен, Лізак, Флумібакт ІС) [7].

Для визначення ДХ у Європейській фармакопеї запропоновано метод неводного титрування у середовищі оцтового ангідриду та мурашиної кислоти, як титрант використовують 0,1 М розчин хлорної кислоти, кінцеву точку титрування реєструють потенціометрично [8]. Британська фармакопея також рекомендує для кількісного визначення ДХ неводне титрування розчином хлорної кислоти у діоксані в середовищі льодяної оцтової кислоти з додаванням ртуті (II) ацетату; як індикатор використовують кристалічний фіолетовий [9]. Широко використовують метод високоефективної рідинної хроматографії в ана-

лізі ДХ [10–13]. Метод спектрофотометрії в декількох варіантах також запропоновано для кількісного визначення ДХ [14–16].

Коло описаних методик [8–16] досить широке, проте всі вони потребують або наявності специфічного обладнання та відповідно підготовленого персоналу, або недостатньо чутливі для визначення залишкових кількостей ДХ, або відсутні дані щодо можливості їх застосування для процесу контролю очищення фармацевтичного обладнання.

В цьому аспекті певний інтерес викликають біохімічні (або ензимні) методи аналізу, що передбачають використання унікальних властивостей ферментів (ензимів) для визначення субстратів, інгібіторів та активаторів ферментних реакцій, власне як і самих ферментів, переваги та недоліки застосування ензимів в аналітичних цілях викладені у роботі [17]. Оскільки кожен окремих фермент каталізує лише певну реакцію з певним субстратом, такі методи характеризуються виключною специфічністю [17]; здатність каталізувати реакції навіть у дуже низьких концентраціях робить ензимні методи вельми чутливими [17], що дуже важливо для сучасної аналітичної та фармацевтичної хімії і актуальним у контексті визначення саме залишків активних фармацевтичних інгредієнтів на поверхні фармацевтичного обладнання.

Метою роботи є розробка та валідація нової ензимної кінетико-фотометричної методики визначення ДХ, що ґрунтується на використанні реакції ферментного гідролізу ацетилхоліну, для визначення залишкових кількостей ДХ при здійсненні контролю повноти очищення фармацевтичного обладнання.

Розробка аналітичної процедури

Визначення залишкових кількостей ДХ на поверхні фармацевтичного обладнання запропоновано виконувати ензимним кінетико-фотометричним методом, в основу якого покладено здатність ЧАС пригнічувати каталітичну активність холінестерази (ChE) в біохімічній реакції гідролітичного розкладання ацетилхоліну (ACh) [18]. Вміст ДХ визначають за ступенем інгібування ензимної реакції,

який оцінюють за залишком субстрату біохімічної реакції – ацетилхоліну, що не прореагував. Визначення залишкової кількості ацетилхоліну в реакційній суміші виконують кінетико-фотометричним методом за індикаторною реакцією окиснення *p*-фенетидину (*p*-Phen) надацетатною кислотою, що утворюється в ході допоміжної реакції пергідролізу при додаванні до реакційної суміші надлишку водню пероксиду, реєструючи світлопоглинання утворюваного продукту реакції – азоксифенетолу ($\lambda_{\max} = 358 \text{ nm}$) впродовж певного періоду часу (рис. 1) [18].

Попередньо були встановлені оптимальні умови перебігу ензимної реакції, а саме порядок змішування та концентрації реагентів, час витримання реакційної суміші, рН середовища, вплив природи буферного розчину тощо [18].

Встановлено, що рН 7,5–8,5 та температура 37–39 °С є оптимальними для перебігу реакції ензимного гідролізу ACh в присутності ChE. При застосуванні фосфатного буферу з рН 8,2–8,5 досягається найвища швидкість перебігу усіх трьох аналітичних реакцій: ензимної, допоміжної реакції пергідролізу та індикаторної реакції окиснення *p*-Phen [19].

За результатами вивчення залежності умовної швидкості ензимної реакції, яку характеризує тангенс кута нахилу кінетичної кривої індикаторної реакції, від концентрації ChE в реакційній суміші встановлено, що лінійна концентраційна залежність спостерігається в інтервалі концентрацій 0,12–0,36 мг/мл [18] (рис. 2), вище 0,4 мг/мл індикаторна реакція практично гальмується, тому для визначення ДХ як інгібітора ChE було обрано саме таку концентрацію.

Крива залежності умовної швидкості реакції від концентрації ACh в реакційній суміші має лінійний характер в інтервалі концентрацій 0,006–0,06 мг/мл (рис. 3), тому для визначення ДХ як інгібітора ChE було обрано концентрацію 0,05 мг/мл.

Оптимальна концентрація використовуваного розчину водню пероксиду в допоміжній реакції пергідролізу ацетилхоліну становила 10 %.

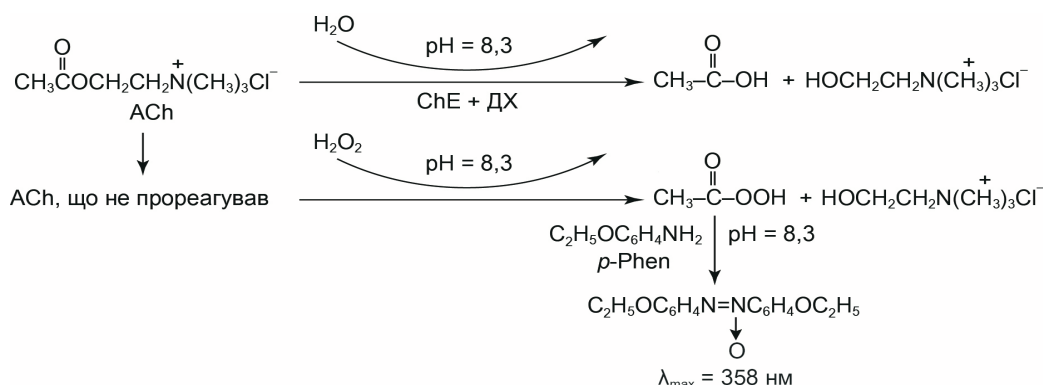


Рис. 1. Схема визначення ДХ ензимним кінетико-фотометричним методом

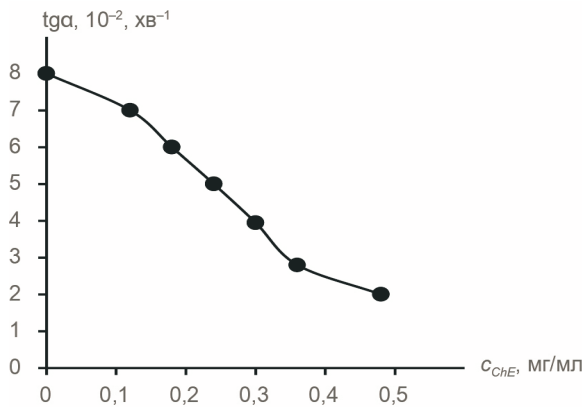


Рис. 2. Залежність умовної швидкості ензимної реакції від концентрації ChE ($c_{ACh} = 0,05$ мг/мл)

Експериментально підтверджено, що використання 1 % розчину *n*-фенетидину в індикаторній реакції забезпечувало виконання умов перебігу реакції псевдопершого порядку, а відтак лінійну залежність швидкості реакції від концентрації утвореної в допоміжній реакції пергідролізу надацетатної кислоти.

У перші 15 хв попереднього процесу інкубації ензиму інгібітором відбувається зниження активності ChE. Подальше збільшення тривалості інкубації практично не приводило до покращення чутливості аналітичної реакції, тому за оптимальний час витримування розчину ChE з інгібітором було обрано 20 хв.

Розрахунок кількісного вмісту ДХ у зразках змиву запропоновано проводити методом градуювального графіка, попередньо побудованого за калібрувальними розчинами.

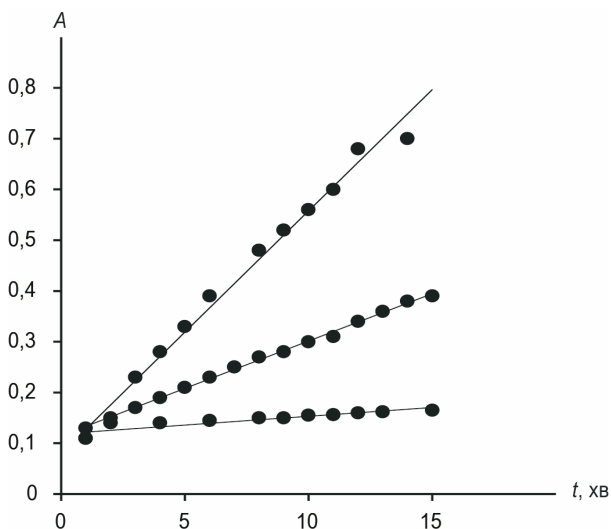


Рис. 4. Кінетичні криві індикаторної реакції окиснення *n*-фенетидину надлишком водню пероксиду:
1 – [(ChE + ACh) + H₂O₂ + *p*-Phen]; 2 – [(ACh + H₂O₂) + *p*-Phen]; 3 – [(ChE + ДХ) + ACh] + H₂O₂ + *p*-Phen на прикладі розчину порівняння

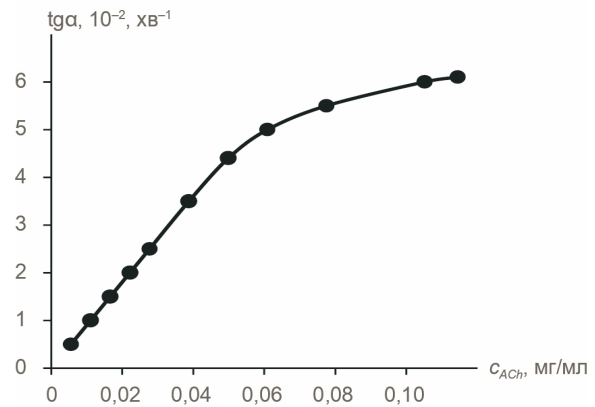


Рис. 3. Залежність умовної швидкості ензимної реакції від концентрації ACh ($c_{ChE} = 0,4$ мг/мл)

Валідація методики

Діапазон застосування. Для проведення валідації розробленої методики використано дані [2] щодо розрахунку максимально допустимої концентрації ДХ у змивах з робочого обладнання, згідно з якими $x_{crit} = 0,5$ мкг/мл, яку і було обрано як номінальну, тобто 100 % в нормалізованих координатах [19]. Відповідно аналітичний діапазон застосування методики було обрано як 40–160 % у нормалізованих координатах з рівномірним розподілом концентраційних рівнів ($n = 7$): 40 % – 60 % – 80 % – 100 % – 120 % – 140 % – 160 %.

Лінійність. За експериментально отриманими даними для серії калібрувальних розчинів ДХ та розчину порівняння будували кінетичні криві залежності поглинання від часу для різних концентрацій інгібітора (рис. 4) та розраховували ступінь інгібування ензимного гідролізу ацетилхоліну U , %, за формулою:

$$U = \frac{tg\alpha_c - tg\alpha_{min}}{tg\alpha_{max} - tg\alpha_{min}} \cdot 100 \%, \quad (1)$$

де: $tg\alpha_c$ – тангенс кута нахилу початкової лінійної ділянки кінетичної кривої індикаторної реакції в присутності певної концентрації інгібітора; $tg\alpha_{min}$ – тангенс кута нахилу початкової лінійної ділянки кінетичної кривої індикаторної реакції в присутності ChE за відсутності інгібітора; $tg\alpha_{max}$ – тангенс кута нахилу початкової лінійної ділянки кінетичної кривої індикаторної реакції за відсутності ChE та інгібітора.

За отриманими даними залежності ступеня інгібування ChE від концентрації ДХ будували градуювальну залежність в абсолютних (рис. 5) та нормалізованих координатах (нормалізацію проводили за розчином порівняння) виду $U = b_1 \cdot c + a_1$ та $Y = b_2 \cdot X + a_2$ відповідно. Методом найменших квадратів розраховували метрологічні параметри отриманих градуювальних залежностей (кутовий коефіцієнт b та його стандартне відхилення s_b , вільний член a та його стандартне відхилення s_a ,

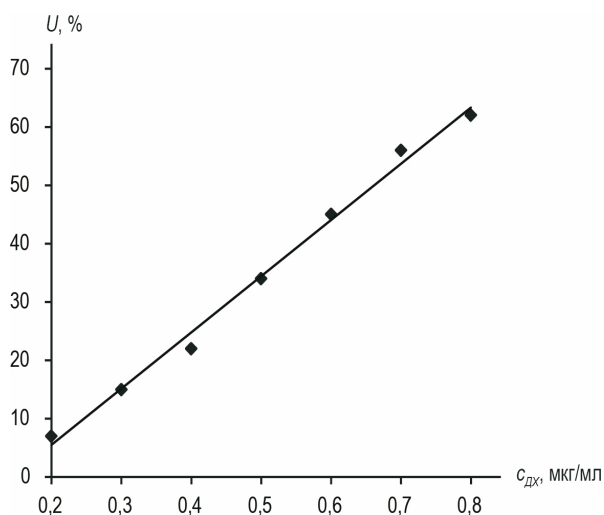


Рис. 5. Градувальний графік залежності ступеня інгібування ChE U , %, від концентрації ДХ

коефіцієнт кореляції R_c та залишкове стандартне відхилення RSD_0), які наведені в табл. 1.

Критерії прийнятності для лінійної залежності виду $Y = b_2 \cdot X + a_2$ розраховували у відповідності до рекомендацій [19] з урахуванням кількості концентраційних рівнів, використаних для побудови градувальної кривої, їхнього розташування всередині діапазону застосування та максимально допустимої невизначеності методики $\max\Delta_x$, розрахованої за підходом [2]:

$$\max\Delta_x, \% = 3,2 \cdot t(P, n-2) \cdot \sqrt{\frac{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot (x_{crit} - \bar{x})^2}{(n-1) \cdot s_x^2 + n \cdot \bar{x}^2}} =$$

$$= 3,2 \cdot 2,5706 \cdot \sqrt{\frac{6 \cdot 0,216^2 + 7 \cdot (0,5 - 0,5)^2}{6 \cdot 0,216^2 + 7 \cdot 0,5^2}} = 3,05 \% \quad (2)$$

З даних табл. 1 можна зробити висновок, що параметри побудованої у нормалізованих координатах градувальної лінійної залежності для методики визначення залишкових кількостей ДХ у змивах після очищення обладнання задовольняють розрахованим критеріям прийнятності, тобто методика характеризується задовільною лінійністю для заданого діапазону застосування та максимально допустимої невизначеності.

Правильність та прецизійність. Для перевірки правильності та прецизійності методики проводили експеримент з серією модельних розчинів ДХ 1–7, для яких за градувальним графіком розраховували вміст ДХ та параметр «знайдено/введено» RR , %, який використано для розрахунку систематичної та випадкової похибок методики (табл. 2).

Дані табл. 2 свідчать про задовільну правильність та прецизійність розробленої методики визначення ДХ.

Таким чином, отримані результати відповідають критеріям, що висуваються до процедури очищення фармацевтичного обладнання – опрацьована методика дозволяє кількісно визначити до 20 % від гранично допустимої концентрації ДХ.

Ступінь екстракції ДХ. У модельних дослідах свабом, змоченим 96 % етиловим спиртом, проводили змив з поверхні (100 см²), на яку наносили 2,5 мкг ДХ, далі проводили екстракцію 5,00 мл бідистильованої води та визначали кількісний вміст ДХ в отриманому екстракті за розробленою методикою з використанням градувального графіка. Результати визначення ступеня екстракції ДХ наведені в табл. 3.

Експериментальна частина

Усі спектрофотометричні вимірювання проводили з використанням однопроменевого спектрофотометра SPEKOL@1500 (Analytik Jena AG, Німеччина) з робочим діапазоном довжини хвиль від 190 нм до 1100 нм. Ширина спектральної смуги становить 1 нм. Під час експерименту використовували пару кварцових кювет S90-309Q (UNICO, США) з довжиною шляху 10 мм і робочим діапазоном довжини хвиль від 200 до 1200 нм.

Значення рН вимірювали на іонімірі лабораторному И-160М (Беларусь); індикаторний електрод – скляний електрод ЭСЛ 43-07, електрод порівняння – хлоросрібний електрод ЭВЛ-1М3.1

В експерименті використовували такі реагенти: *n*-фенетидин (98 %; Sigma-Aldrich, США); ацетилхоліну хлорид (ампули по 0,2 г, с. 20275, Вектор, РФ); холінестераза (сухий білковий препарат, отри-

Таблиця 1

Параметри лінійності розробленої методики визначення ДХ

Параметр	$U = b_1 \cdot c + a_1$	$Y = b_2 \cdot X + a_2$	Критерії прийнятності	Висновок
b	97,1	1,45	–	–
s_b	0,9	0,01	–	–
a	-14,1	-42,00	–	–
s_a	0,5	1,50	–	–
R_c	0,9997	0,9997	> 0,9994	відповідає
RSD_0	0,49	1,47 %	< 1,51 %	відповідає
МКВ	0,05 мкг/мл	10 %	< 32 %	відповідає

Таблиця 2

Параметри правильності та прецизійності розробленої методики визначення ДХ

Фактична концентрація ДХ в модельному розчині ($C_{reference} = 0,5$ мкг/мл)		Ступінь інгібування ChE, U_{it} , %	Знайдено у % до $U_{reference}$ Y_{it} , % ($U_{reference} = 33,5$ %)	Розрахована концентрація ДХ в модельному розчині X_i^{calc} , %	RR_{it} , % = $\frac{X_i^{calc}}{X_i} \cdot 100$ %
C_{it} , мкг/мл	X_{it} , %				
0,2	40	5,02	14,99	39,31	98,26
0,3	60	15,32	45,73	60,51	100,85
0,4	80	24,15	72,09	78,69	98,36
0,5	100	33,95	101,34	98,87	98,87
0,6	120	45,21	134,96	122,05	101,71
0,7	140	52,65	157,16	137,37	98,12
0,8	160	62,54	186,69	157,73	98,58
\overline{RR} , %					99,25
δ , % = $ 100 - \overline{RR} $					0,75
δ , % $\leq 0,32 \cdot \max \Delta_x = 0,96$ %					відповідає
RSD_{RR} , %					1,43
Δ_{RR} , % = $RSD_{RR} \cdot t(95\%, n-1)$					2,76
Δ_{RR} , % $\leq \max \Delta_x = 3,05$ %					відповідає

маний з кінської сироватки (флакони по 80 мг, 22 АО/мг, с. 13/74, НВО «Біомед», РФ); водню пероксид (стабілізований, 30–40 %, ТОВ «Інтер-Синтез», Україна; вміст H_2O_2 визначали згідно з монографією ДФУ «Розчин водню пероксиду концентрований 27,5–31,0 % [20]); деквалінію хлорид фармакопейної чистоти (с. 1410001632, OLON, Італія); *n*-фенетидину гідрохлорид (*p*-Phen), який отримували за такою методикою: 10 г *n*-фенетидину розчиняли в 20 мл хлороформу, до отриманого розчину поступово додавали концентровану хлористоводневу кислоту до припинення утворення осаду; осад відфільтровували та висушували.

Розчин ацетилхоліну хлориду, 0,1 %: вміст 1 ампули (0,2 г ацетилхоліну хлориду) розчиняють у 4 мл бідистильованої води безпосередньо в ампулі, струшують до повного розчинення ацетилхоліну та кількісно переносять до мірної колби місткістю 200,0 мл, промиваючи ампулу декілька разів бідистильованою водою, та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки.

Розчин холінестерази: у флакон, що містить 80 мг сухого препарату ChE, додають 20,00 мл бідистильованої води, збовтують та термостатують впродовж 10 хв за температури 38 °С.

Фосфатний буферний розчин (рН 8,35): 35,75 мг натрію фосфату двозаміщеного вносять до мірної колби місткістю 500,0 мл, додають 300 мл бідистильованої води, розчиняють, додають 19,00 мл 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти, перемішують та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки; рН отриманого розчину контролюють потенціометрично.

Розчин водню пероксиду, 10 %: одержують шляхом відповідного розбавлення розчину водню пероксиду концентрованого бідистильованою водою. Точний вміст водню пероксиду визначають перманганатометрично [20].

Розчин *n*-фенетидину гідрохлориду, 1 %: 1,00 г *n*-фенетидину гідрохлориду розчиняють у 80 мл бідистильованої води у мірній колбі місткістю 100,0 мл і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки.

Розчини деквалінію хлориду (ДХ):

- *вихідні розчини 1–3:* 0,05000 г (точна наважка) робочого стандартного зразка (РСЗ) ДХ розчиняють у бідистильованій воді у мірній колбі місткістю 100,0 мл і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки (концентрація – 500 мкг/мл); відбирають піпеткою 1,00 мл отриманого розчину, переносять до

Таблиця 3

Ступінь екстракції ДХ з поверхні фармацевтичного обладнання

Номер змиву	1	2	3	4	5	Середнє значення	RSD
Ступінь екстракції	76,4	73,5	83,6	74,9	69,8	75,64	6,71 %

мірної колби місткістю 100,0 мл та доводять об'єм розчину бідистильованою водою до позначки за температури 20 °С, ретельно перемішують (концентрація – 5 мкг/мл);

- *розчин порівняння*: відбирають піпеткою 10,00 мл вихідного розчину 1, переносять до мірної колби місткістю 100,0 мл та доводять об'єм розчину бідистильованою водою до позначки за температури 20 °С, ретельно перемішують (концентрація – 0,5 мкг/мл);
- *калібрувальні/модельні розчини 1–7*: в серію мірних колб місткістю 100,0 мл вносять піпеткою 4,00; 6,00; 8,00; 10,00; 12,00; 14,00 та 16,00 мл вихідного розчину 2/3 та доводять об'єми розчину бідистильованою водою до позначки за температури 20 °С, ретельно перемішують (концентрація – 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 та 0,8 мкг/мл).

Перевірка лінійності, правильності та прецизійності методики

1. У градуйовану пробірку на 20 мл з притертим корком вносять 10,00 мл фосфатного буферного розчину (рН = 8,35) та 1,00 мл 1 % розчину ацетилхоліну, додають 2,00 мл 10 % розчину водню пероксиду, витримують впродовж 10 хв в термостаті за температури 38 °С, вносять 1,00 мл 1 % розчину *n*-фенетидину та додають бідистильовану воду до 20 мл (приблизно 6 мл). Вмикають секундомір і впродовж 20 хв щохвилини вимірюють світлопоглинання приготованого розчину за довжини хвилі 358 нм [(ACh + H₂O₂) + *p*-Phen].

2. У градуйовану пробірку на 20 мл з притертим корком вносять 10,00 мл фосфатного буферного розчину (рН = 8,35) та 2,0 мл розчину холінестерази, додають 1,00 мл 1 % розчину ацетилхоліну, вмикають секундомір, енергійно струшують та витримують впродовж 10 хв у термостаті за температури 38 °С, після чого додають 2,00 мл 10 % розчину водню пероксиду, витримують впродовж 10 хв у термостаті за температури 38 °С, вносять 1,00 мл 1 % розчину *n*-фенетидину та додають бідистильовану воду до 20 мл (приблизно 6 мл). Вмикають секундомір і впродовж 20 хв щохвилини вимірюють світлопоглинання приготованого розчину за довжини хвилі 358 нм [(ChE + ACh) + H₂O₂ + *p*-Phen].

3. У серію градуйованих пробірок на 20 мл з притертим корком вносять по 10,00 мл фосфатного буферного розчину (рН = 8,35) та по 1,0 мл калібрувальних/модельних розчинів ДХ 1–7 або

розчину порівняння ДХ, потім додають при перемішуванні по 2,0 мл розчину холінестерази, вмикають секундомір, розчини енергійно струшують та витримують впродовж 20 хв в термостаті за температури 38 °С, після чого швидко додають по 1,00 мл 1 % розчину ацетилхоліну, вмикають секундомір, енергійно струшують та витримують впродовж 10 хв у термостаті за температури 38 °С, додають по 2,00 мл 10 % розчину водню пероксиду, витримують впродовж 10 хв у термостаті за температури 38 °С, вносять по 1,00 мл 1 % розчину *n*-фенетидину та додають бідистильовану воду до 20 мл (приблизно 6 мл). Вмикають секундомір і впродовж 20 хв щохвилини вимірюють світлопоглинання приготованого розчину за довжини хвилі 358 нм [(ChE + ДХ) + ACh] + H₂O₂ + *p*-Phen].

Кожного разу перед перемішуванням пробірку ретельно закорковують. Як розчин порівняння використовують суміш фосфатного буферного розчину (рН = 8,35) та бідистильованої води (1:1). Експеримент повторюють п'ять разів.

Методика визначення деквалінію хлориду у змивах з обладнання. Сваб зі змивом із забрудненого обладнання вносять до лабораторного стакану, додають 5,0 мл води та проводять десорбцію впродовж 10 хвилин. Отриманий екстракт використовують для подальшого аналізу.

Висновки

1. Розроблено ензимну кінетико-фотометричну методику визначення залишкових кількостей деквалінію хлориду на поверхні фармацевтичного обладнання після його очищення.

2. Проведено валідацію розробленої методики за такими параметрами: лінійність, правильність, прецизійність та межа кількісного визначення. Запропоновано діапазон застосування методики, кількість концентраційних рівнів та порядок їх розташування всередині діапазону застосування, з урахуванням чого розраховано максимально допустиму невизначеність методики і, відповідно, критерії прийнятності параметрів лінійної залежності, систематичної та випадкової похибок. Показано, що валідаційні характеристики розробленої методики відповідають розрахованим критеріям прийнятності.

3. Встановлено ступінь екстракції деквалінію хлориду зі свабу зі змивом з фармацевтичного обладнання.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Перелік використаних джерел інформації

1. Лікарські засоби. Належна виробнича практика : СТ-Н МОЗ України 42-4.0:2016. – Київ : МОЗ України, 2016. – 332 с.
2. Валідація методик контролю якості очистки фармацевтичного обладнання / А. В. Егорова, А. А. Федосенко, Г. В. Мальцев, В. П. Антонович // Аналітика і контроль. – 2015. – Т. 19, № 4. – С. 387–395. <https://doi.org/10.15826/analitika.2015.19.4.002>
3. Абатуров, О. Є. Застосування препарату лізоциму й деквалінію хлориду в лікуванні гострих респіраторних захворювань верхніх дихальних шляхів у дітей / О. Є. Абатуров, О. О. Агафонова, Н. М. Токарева // Здоров'я ребенка. – 2018. – Т. 13, № 6. – С. 576–584. <https://doi.org/10.22141/2224-0551.13.6.2018.143163>
4. Хурасєва, А. Б. Оцінка ефективності лікування бактеріального вагінозу вагінальними таблетками с деквалінію хлоридом / А. Б. Хурасєва, Т. В. Реминная // Акушерство, гинекологія і репродукція. – 2018. – Т. 12, № 3. – С. 29–34. <https://doi.org/10.17749/2313-7347.2018.12.3.029-034>
5. Dequalinium for bacterial vaginosis // *Drug Ther. Bull.* – 2017. – Vol. 55, Issue 5. – P. 54–57. <https://doi.org/10.1136/dtb.2017.5.0478>
6. Use of locally delivered dequalinium chloride in the treatment of vaginal infections: a review / W. Mendling, E. R. Weissenbacher, S. Gerber et al. // *Arch. Gynecol. Obstet.* – 2016. – Vol. 293, Issue 3. – P. 469–484. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3914-8>
7. Державний реєстр лікарських засобів України. [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://www.drlz.kiev.ua>
8. European Pharmacopoeia / European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). – 6th ed. – Council of Europe, 2007. – 3308 p.
9. British Pharmacopoeia / The Stationery Office on Behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA). – London: Crown, 2008. – 10952 p.
10. Gagliardi, L. Determination of dequalinium chloride and related impurities in cosmetics and pharmaceuticals by reversed-phase HPLC / L. Gagliardi, G. Cavazzutti, D. Tonelli // *Anal. Lett.* – 1998. – Vol. 31, Issue 5. – P. 829–839. <https://doi.org/10.1080/00032719808002821>
11. Determination of the quaternary ammonium compounds dequalinium and cetylpyridinium chlorides in candy-based lozenges by high-performance liquid chromatography / R. B. Taylor, S. Toasaksiri, R. G. Reid, D. Wood // *Analyst.* – 1997. – Vol. 122, Issue 9. – P. 973–976. <https://doi.org/10.1039/A703893C>
12. Simultaneous quantitation of cationic disinfectants by high-performance liquid chromatography on a silica gel column using aqueous eluents / F.-A. Chen, K.-S. Wu, M.-C. Huang et al. // *J. Food Drug Anal.* – 2001. – Vol. 9, Issue 4. – P. 191–198.
13. Determination of dequalinium chloride in dequalinium chloride buccal tablets by HPLC / W.-H. Fang, J. Liu, J. Shen, L.-J. Zhang // *Anhui Med. Pharm. J.* – 2011. – Vol. 7. – P. 837–839.
14. Mohamed, H. A. Spectrophotometric determination of dequalinium chloride / H. A. Mohamed // *Anal. Lett.* – 1993. – Vol. 26, Issue 11. – P. 2421–2429. <https://doi.org/10.1080/00032719308017481>
15. Leung, C. P. Spectrophotometric determination of dequalinium chloride in pharmaceutical preparations / C. P. Leung, S. Y. Kwan // *Analyst.* – 1979. – Vol. 104, Issue 1235. – P. 143–146. <https://doi.org/10.1039/an9790400143>
16. Spectrophotometric methods for the determination of dequalinium chloride and clidinium bromide using ion-pair complex formation with acid dyes / T. Y. Mohamed, H. A. Dossouki, M. M. Moustafa, M. S. Ghoname // *Egypt. J. Chem.* – 2008. – Vol. 51, Issue 1. – P. 113–123.
17. Guilbault, G. G. Use of enzymes in analytical chemistry. Analytical use of enzymes / G. G. Guilbault, M. H. Sadar // *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.* – 1977. – Vol. 14, Issue 10. – P. 302–306. <https://doi.org/10.1039/ad9771400302>
18. Патент на корисну модель 117474 Україна, МПК G01N 33/68 (2006.01), G01 N 21/79(2006.01). Спосіб визначення активності холінестерази крові / Блажеєвський М. С., Ковальська О. В., Дядченко В. В. – № у 2017 00721; заявл. 26. 01. 17; опубл. 26. 06. 17, Бюл. №12. – 4 с.
19. Гризодуб, А. И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств / А. И. Гризодуб. – Х.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. – 396 с.
20. Державна фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Х. : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.

References

1. *Likarski zasoby. Nalezna vyrobnycha praktyka.* (2016). ST-N MOZ Ukrainy 42-4.0:2016. Kyiv: MOZ Ukrainy, 332.
2. Yegorova, A. V., Fedosenko, G. A., Maltsev, G. V., Antonovich, V. P. (2015). [Validation of methods for quality control of cleaning the pharmaceutical equipment]. *Analitika i kontrol*, 19 (4), 387–395. <https://doi.org/10.15826/analitika.2015.19.4.002>
3. Abatur, O. Y., Ahafonova, O. O., Tokarieva, N. M. (2018). [Application of lysozyme and dequalinium chloride in the treatment of acute respiratory diseases of the upper respiratory tract in children]. *Child's health*, 13 (6), 576–584. <https://doi.org/10.22141/2224-0551.13.6.2018.143163>
4. Khuraseva, A. B., Reminnaya, T. V. (2018). [Efficacy of dequalinium chloride vaginal tablets in treatment of bacterial vaginosis]. *Obstetrics, Gynecology and Reproduction*, 12 (3), 29–34. <https://doi.org/10.17749/2313-7347.2018.12.3.029-034>
5. Dequalinium for bacterial vaginosis. (2017). *Drug and Therapeutics Bulletin*, 55(5), 54–57. <https://doi.org/10.1136/dtb.2017.5.0478>
6. Mendling, W., Weissenbacher, E. R., Gerber, S., Prasauskas, V., Grob, P. (2015). Use of locally delivered dequalinium chloride in the treatment of vaginal infections: a review. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 293 (3), 469–484. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3914-8>
7. *Derzhavnyi reiestr likarskykh zasobiv Ukrainy.* (n.d.). Available at: <http://www.drlz.kiev.ua>
8. *European Pharmacopoeia.* (2007). European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). 6th ed. Council of Europe, 3308.
9. *British Pharmacopoeia.* (2008). The Stationery Office on Behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA). London: Crown, 10952.
10. Gagliardi, L., Cavazzutti, G., Tonelli, D. (1998). Determination of Dequalinium Chloride and Related Impurities in Cosmetics and Pharmaceuticals by Reversed-Phase HPLC. *Analytical Letters*, 31 (5), 829–839. <https://doi.org/10.1080/00032719808002821>
11. Taylor, R. B., Toasaksiri, S., Reid, R. G., Wood, D. (1997). Determination of the Quaternary Ammonium Compounds Dequalinium and Cetylpyridinium Chlorides in Candy-based Lozenges by High-performance Liquid Chromatography. *The Analyst*, 122 (9), 973–976. <https://doi.org/10.1039/A703893C>
12. Chen, F.-A., Wu, K.-S., Huang, M.-C., Chen, C.-Ya., Wu A.-B. (2001). Simultaneous quantitation of cationic disinfectants by high-performance liquid chromatography on a silica gel column using aqueous eluents. *Journal of Food and Drug Analysis*, 9 (4), 191–198.
13. Fang, W.-H., Liu, J., Shen, J., Zhang, L.-J. (2011). Determination of dequalinium chloride in dequalinium chloride buccal tablets by HPLC. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 7, 837–839.

14. Mohamed, H. A. (1993). Spectrophotometric Determination of Dequalinium Chloride. *Analytical Letters*, 26 (11), 2421–2429. <https://doi.org/10.1080/00032719308017481>
15. Leung, C. P., Kwan, S. Y. (1979). Spectrophotometric determination of dequalinium chloride in pharmaceutical preparations. *The Analyst*, 104 (1235), 143–146. <https://doi.org/10.1039/an9790400143>
16. Mohamed, T. Y., Dossouki, H. A., Moustafa, M. M., Ghoname, M. S. (2008). Spectrophotometric methods for the determination of dequalinium chloride and clidinium bromide using ion-pair complex formation with acid dyes. *Egyptian Journal of Chemistry*, 51 (1), 113–123.
17. Guilbault, G. G., Sadar, M. H. (1977). Use of enzymes in Analytical Chemistry. Analytical use of enzymes. *Proceedings of the Analytical Division of the Chemical Society*, 14 (10), 302–306. <https://doi.org/10.1039/ad9771400302>
18. Blazheievskiy, M. Ye., Kovalska, O. V., Diadchenko, V. V. (2017). Patent na korysnu model 117474 Ukraina, MPK G01N 33/68 (2006.01), G01 N 21/79(2006.01). *Sposib vyznachennia aktyvnosti kholinesterazy krovi*.
19. Grizodub, A. I. (2016). *Standartizovannye protsedury validatsii metodik kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv*. Kharkiv: DP «Ukrainskii naukovii farmakopeinii tcentr yakosti likarskikh zasobiv», 396.
20. *Derzhavna farmakopeia Ukrainy*. (2015). Vols. 1–3. Vol. 1. 2nd ed. Derzhavne pidpriemstvo «Ukrainskyi naukovyi ekspertnyi farmakopeinyi tcentr yakosti likarskykh zasobiv». Kharkiv, 1128.

Надійшла до редакції 27.04.2019 р.