

УДК 543.544.5.068.7: 615.07

**А. В. Егорова¹, А. А. Федосенко², Е. О. Витюкова¹, С. Н. Кашуцкий²,
Г. В. Мальцев²**¹Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина²ОДО «ИНТЕРХИМ», Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ВЭЖХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ КЛОФЕЛИНА ГИДРОХЛОРИДА С ПОВЕРХНОСТЕЙ ФАРМОБОРУДОВАНИЯ

Предложена высокочувствительная методика ВЭЖХ определения следовых количеств клофелина гидрохлорида в смывах для валидации процесса очистки фармацевтического оборудования. Разработанная методика валидирована по следующим показателям: специфичность, линейность, точность, предел обнаружения и предел количественного определения. Градуировочный график линеен в интервале концентраций 0,1–6,0 мкг/мл, предел обнаружения (ПО) равен 0,026 мкг/мл.

Установлено, что растворы клофелина гидрохлорида стабильны в течение 48 часов. Эффективность метода отбора проб составляет более 95 %.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, клофелин гидрохлорид.

В фармацевтическом производстве субстанций и лекарственных форм для предотвращения контаминации каждого последующего препарата предыдущим очень важным является проведение эффективной очистки оборудования, которая включает отбор образцов (метод мазков или смывов) и валидированные испытания на допустимые остаточные количества активных фармацевтических ингредиентов (АФИ) на поверхностях фармоборудования [1-4].

Обычно допустимые пределы остаточных количеств АФИ на поверхностях фармоборудования рассчитывают, исходя из критериев риска, связанного с остатками данных ингредиентов [5, 6]. Согласно рекомендациям PIC/S (система сотрудничества всех фармацевтических инспекций – Pharmaceutical inspection cooperation scheme) допустимое количество остатков препарата должно соответствовать следующим критериям:

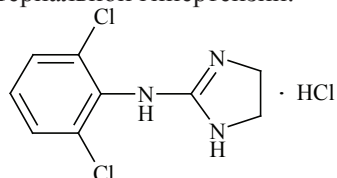
- после завершения процедур очистки на оборудовании не должно быть видимых следов,
- в максимальной суточной дозе препарата может содержаться не более 0,1 % средней терапевтической дозы любого произведенного перед ним препарата,
- в препарате не должно содержаться более 10 ppm любого другого препарата.

Для определения остаточных количеств АФИ используют методы, обладающие селективностью по отношению к аналиту и примесям – продуктам деградации, возникающим в процессе отмывки, а также высокой чувствительностью. К таким методам, как правило относятся высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [1-5], люминесценция [7, 11] и УФ-спектроскопия [14].

Целью данной статьи была разработка и валидация простой и селективной методики определения остаточных количеств АФИ клофелина гидрохлорида в смывах с поверхностей очищенного фармоборудования после производства субстанции

«КЛОФЕЛН». В работе использовали высокочувствительный и селективный метод ВЭЖХ.

Клофелина гидрохлорид — 2-[(2,6-дихлорфенил)амино]-имидазолина гидрохлорид, гипотензивный препарат группы производных имидазолина, стимулятор α_2 -адренорецепторов и центральных имидазолиновых рецепторов. Широко используется при лечении артериальной гипертензии.



Для определения клофелина гидрохлорида в фармацевтических препаратах и биологических образцах используют спектрофотометрию [15], люминесценцию [16], ионселективные электроды [17], ВЭЖХ [18-21]. Некоторые из известных методик обладают высокой чувствительностью, достаточной для определения следовых количеств клофелина, однако они не были использованы для определения остаточных количеств клофелина при контроле очистки фармоборудования.

Разработанная нами аналитическая методика определения остаточных количеств клофелина валидирована по следующим параметрам: специфичность, линейность, внутрилабораторная прецизионность, предел обнаружения.

Экспериментальная часть

Реагенты. Для приготовления подвижных фаз, растворов сравнения исследуемых АФИ и смывов применяли метанол (MERCK), 96% спирт, воду очищенную (Direct-Q[®]3 Smart, Millipore, Франция).

0,22% раствор натрия октансульфоната готовили растворением точной навески препарата (квалификации х.ч.) в воде.

Смывы с поверхности фармоборудования отбирали хлопковыми аппликаторами (свабами) Alpha[®] Sampling Swab марки TX 715, смоченными в 96% спирте.

В качестве рабочего стандартного образца (PCO) использовали фармацевтическую субстанцию клофелина гидрохлорида, соответствующую требованиям Европейской фармакопеи [22].

Аппаратура. Анализ проводили на хроматографе Agilent 1200 3D LC System с диодно-матричным детектором в изократическом режиме, используя колонку размером 0,25 м x 4,6 мм, заполненную силикагелем октадецилсилильным для хроматографии типа Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ с размером частиц 5 мкм.

В работе использовали весы лабораторные электронные AX 124 фирмы SARTORIUS (Германия).

Методика определения. Определение следовых количеств клофелина гидрохлорида основано на измерении площади пика клофелина на хроматограммах в зависимости от концентрации (при необходимости раствор пробы разбавляют до концентрации, лежащей в интервале линейности градуировочного графика).

Содержание клофелина гидрохлорида в смывах (мкг/смыв) определяют по градуировочному графику.

Определение клофелина гидрохлорида

Аппликатор со смывом с поверхности предварительно очищенного фармоборудования (площадь смыва – 100 см²) помещают в химический стакан вместимостью 25 мл, прибавляют 5,0 мл метанола и проводят десорбцию в течение 10 мин. Полученный раствор фильтруют через мембранный фильтр (0,20 мкм; Minisart RC 15, «Sartorius», Германия) и хроматографируют при таких условиях:

- подвижная фаза: 0,22 % раствор натрия октансульфоната : метанол : кислота фосфорная (400:600:1,0);
- скорость подвижной фазы 1,5 мл/мин;
- температура колонки 40 °С;
- время хроматографирования 4 мин;
- детектирование при длине волны 220 нм;
- объём инъекции 20 мкл;
- время удерживания клофелина 2,8 мин.

Раствор для проверки пригодности. 0,025 г РСО клофелина гидрохлорида помещают в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, добавляют 20,0 мл воды, перемешивают и доводят объем до метки тем же растворителем. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100,0 мл, доводят объём до метки водой и перемешивают (раствор А – 10,0 мкг/мл). В мерную колбу вместимостью 10,0 мл помещают 0,1 мл полученного раствора, доводят до метки водой и перемешивают (0,1 мкг/мл).

Хроматографическая система считается пригодной, если соотношение сигнал/шум, рассчитанное для пика клофелина из хроматограммы раствора для проверки пригодности, составляет не менее 3 (при расчете не учитывают системные пики с временами удерживания около 1,5 мин).

Концентрацию клофелина гидрохлорида (мкг/мл) в исследуемом растворе определяют по градуировочному графику.

Построение градуировочного графика

В мерные колбы вместимостью 10,0 мл помещают 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,25; 2,5; 3,5; 5,0; 5,5 и 6,0 мл раствора А для проверки пригодности и доводят до метки водой, получая растворы с содержанием клофелина гидрохлорида 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,25; 2,5; 3,5; 5,0; 5,5 и 6,0 мкг/мл, соответственно.

Хроматографируют полученные растворы при условиях, указанных в разделе «Методика определения».

По полученным результатам строят градуировочный график (рис. 1), откладывая на оси абсцисс значения содержания клофелина гидрохлорида (мкг/мл), а по оси ординат – значения площадей пиков.

Содержание клофелина гидрохлорида (X), в микрограммах в смыве, рассчитывают по формуле:

$$X = C \cdot 5,$$

где: C – концентрация клофелина гидрохлорида, полученная по градуировочному графику, в мкг/мл.

Определение степени извлечения. В модельных опытах в ходе валидации метода делали смывы свабом, смоченным 96% спиртом, с поверхности (100 см²), на которую наносили 0,005 г АФИ клофелина гидрохлорида, далее проводили извлечение 5,0 мл метанола. 0,5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу

вместимостью 100,0 мл и доводили до метки водой (5,0 мкг/мл). Было установлено, что количественное извлечение клофелина гидрохлорида в конечный раствор составляет 95,5 % – 96,1 % (табл. 1).

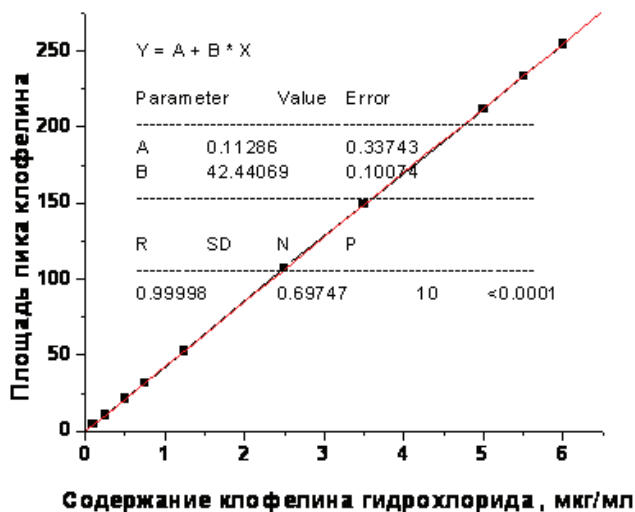


Рис. 1 Градуировочный график для определения клофелина гидрохлорида

Таблица 1

Значения степени извлечения клофелина гидрохлорида с модельной поверхности

Номер пробы	1	2	3	4	5
Степень извлечения клофелина гидрохлорида, %	95,49	95,83	96,28	95,74	96,12

Проверка стабильности. Для подтверждения срока годности раствора РСО клофелина гидрохлорида и смыва с аппликатора изучена зависимость площадей пиков клофелина через 24 и 48 часов хранения при комнатной температуре (табл. 2).

Таблица 2

Результаты изучения стабильности образцов клофелина гидрохлорида

Объекты	S					
	0 ч		24 ч		48 ч	
	1	2	1	2	1	2
PCO клофелина гидрохлорида	211,4	216,3	210,9	216,5	211,5	216,1
АФИ клофелина гидрохлорида в растворе (смыве) с аппликатора	206,1	205,8	205,7	204,9	206,4	205,3

Результаты исследования стабильности, приведенные в таблице 2, свидетельствуют об устойчивости растворов изученного АФИ к хранению в течение 2 суток.

Валидация разработанной методики

1. Проверка специфичности

Специфичность метода основана на возможности избирательного разделения хроматографической зоны основного вещества от других возможных зон на хроматограмме и устойчивости положения хроматографической зоны основного вещества на хроматограмме испытуемого раствора в сравнении с хроматограммой внешнего стандарта (РСО клофелина гидрохлорида).

Для проверки специфичности методики были получены хроматограммы подвижной фазы, промывного раствора с чистого аппликатора и модельных растворов РСО клофелина гидрохлорида (рис 2). Как видно из рисунка 2, хроматограммы подвижной фазы (рис. 2, а) и промывного раствора с чистого аппликатора (рис. 2, б) идентичны. На них отсутствуют пики, мешающие определению клофелина гидрохлорида.

2. Проверка линейности

Градуировочный график линеен в диапазоне содержаний клофелина гидрохлорида 0,1 – 6,0 мкг/мл, предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) составляют [23]:

$$\begin{aligned} \text{ПО} &= 3,3 \cdot \sigma/S = 3,3 \cdot 0,33743/42,44069 = 0,026 \text{ мкг/мл;} \\ \text{ПКО} &= 10 \cdot \sigma/S = 10 \cdot 0,33743/42,44069 = 0,080 \text{ мкг/мл;} \end{aligned}$$

где: σ – стандартное отклонение свободного члена;
 S – тангенс угла наклона градуировочного графика.

Предел обнаружения и предел количественного определения в смыве составляют 0,13 мкг и 0,39 мкг, соответственно (т.е. 0,13 мкг и 0,40 мкг на сваб, которым сделан смыв с поверхности 100 см²).

Значения коэффициентов «а» и «b» соответствующей линейной аппроксимации и коэффициент корреляции, а также предел обнаружения, установленные в соответствии с требованиями ГФУ [23], приведены в таблице 3.

Таблица 3

Данные линейной регрессии для определения клофелина гидрохлорида

Концентрационный интервал (мкг/мл)	0,1 – 6,0
Уравнение градуировочного графика	$y = 0,11286 + 42,44069x$
Коэффициент корреляции (r)	0,99998
Предел обнаружения, мкг/мл	0,026

Как видно из таблицы 3 коэффициенты линейной зависимости в исследуемом диапазоне содержаний соответствуют допустимым значениям [23] для методик определения веществ, концентрация которых в пробе выше предела количественного определения.

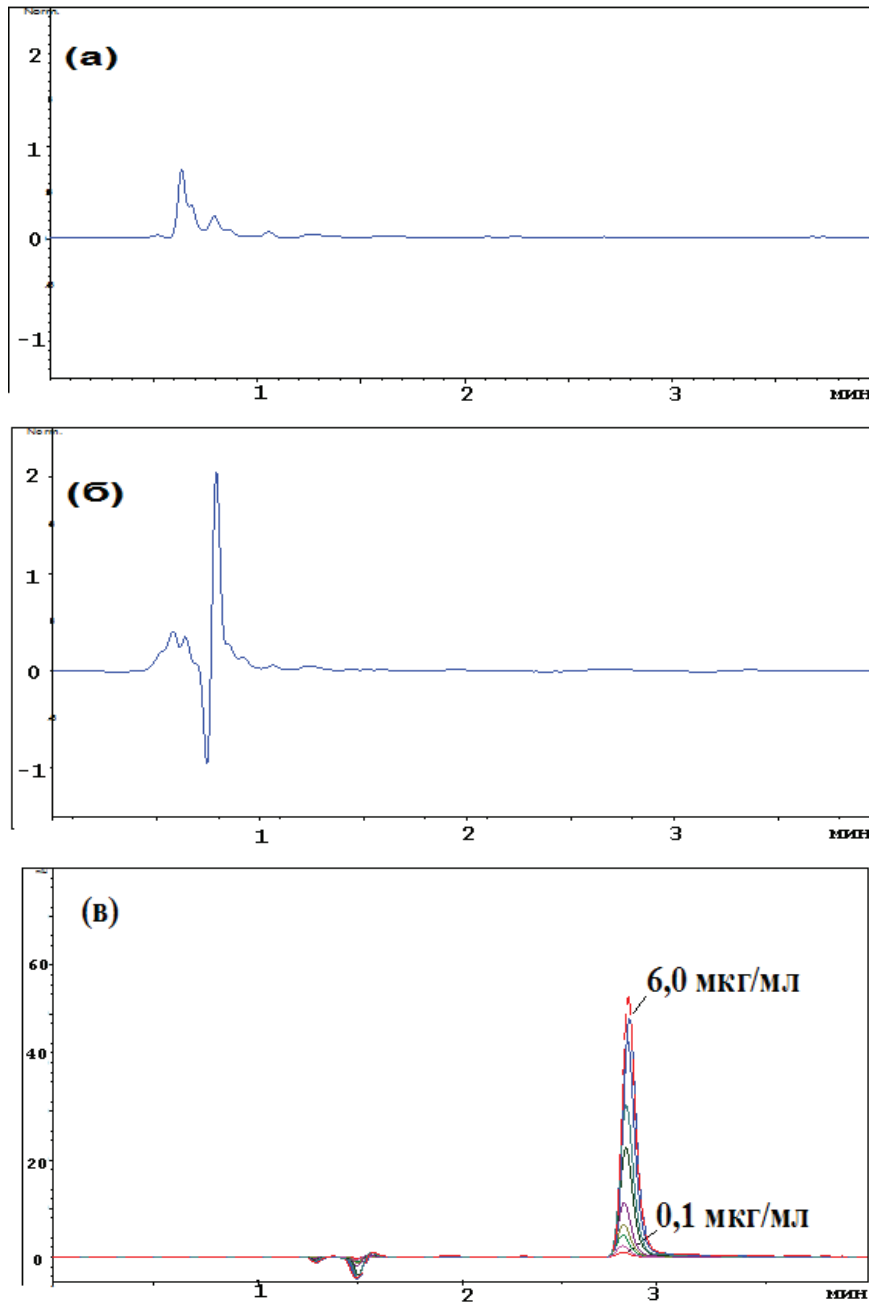


Рис. 2. Хроматограммы: подвижной фазы (а); промывного раствора с чистого аппликатора (б); модельных растворов РСО клофелина гидрохлорида для градуировочного графика (в) (0,1 – 6,0 мкг/мл)

3. Проверка внутрилабораторной прецизионности

Метрологические характеристики методики определения остаточных количеств клофелина гидрохлорида, сделанные в разные дни одним аналитиком, представлены в таблице 4.

Значения \bar{X} для различных дней должны быть статистически неотличимы, что при отсутствии грубых погрешностей свидетельствует об удовлетворительной внутрилабораторной прецизионности.

Для проверки этого рассчитывают средневзвешенное стандартное отклонение S_0 :

$$S_0 = \sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{2}},$$

где S_1 – стандартное отклонение результатов первого дня;
 S_2 – стандартное отклонение результатов второго дня;
 2 – количество дней измерений.

Модуль разницы между средними значениями \bar{X} для различных дней должен удовлетворять соотношению [24]:

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq \sqrt{2} \cdot t(0,95; f) \cdot \frac{S_0}{\sqrt{n}}$$

где $f = 2(n-1)$,

n – число параллельных измерений.

Из приведенных в таблице 4 результатов можно сделать вывод о том, что данная методика характеризуется удовлетворительной внутрилабораторной прецизионностью.

Расчет предельно допустимой массы остатков предшествующего продукта.

Для расчета приняли следующие обозначения:

MDD – средняя суточная доза предшествующего продукта, мг;

p – коэффициент запаса: допустимая доля от **MDD** предшествующего продукта в максимальной суточной дозе последующего, %;

N_1 – наименьший размер серии последующего продукта, кг;

N_2 – максимальная суточная доза последующего продукта, мг;

R – эффективность метода отбора проб, %.

Предельно допустимая масса предшествующего продукта в максимальной суточной дозе последующего (**D**, мг) составит:

$$D = \frac{MDD \cdot p}{100}.$$

Теоретическое предельно допустимое значение остатков предыдущего продукта на всем оборудовании после очистки (**E_т**, мг):

$$E_t = \frac{D \cdot N_1}{N_2} \cdot 10^6.$$

Таблица 4

Метрологические характеристики методики количественного определения клофелина гидрохлорида в модельных смывах с поверхностей в разные дни, сделанные одним аналитиком ($f=5$; $P=0,95$; $t(P, f)=2,57$)

	$X_p, \%$	$\bar{X}, \%$	S^2	S	$\Delta \bar{X}, \%$	$\varepsilon = \frac{\Delta X}{\bar{X}} \cdot 100, \%$	$ \bar{X}_1 - \bar{X}_2 $	$\sqrt{2} \cdot t(0,95; f) \cdot \frac{S_0}{\sqrt{n}}$ ($t(P, f)=2,23$)
1-й день	96,08	95,57	0,22	0,47	0,50	0,52	0,24	0,50
	95,84							
	95,46							
	96,05							
	96,04							
	95,18							
2-й день	96,21	95,81	0,08	0,27	0,29	0,30	0,24	0,50
	95,42							
	95,66							
	95,83							
	96,00							
	95,74							

С учетом эффективности пробоотбора R , *практическое* предельно допустимое значение остатков предыдущего продукта на всем оборудовании после очистки (E_p , мг), будет иметь значение:

$$E_p = \frac{E_T \cdot R}{100} = \frac{D \cdot N_1 \cdot R}{N_2} \cdot 10^4.$$

С учетом того, что на всей площади, контактируемой с продуктом – S_2 , должно находиться E_p мг предшествующего продукта, в пробе, взятой с участка оборудования с поверхностью пробоотбора площадью S_1 , должно находиться *практическое предельно допустимое значение остатков предыдущего продукта в пробе* (в смыве с площади S_1) (F_{crit} , мкг):

$$F_{crit} = \frac{E_p \cdot S_1}{S_2} \cdot 10^3.$$

В качестве «наихудшего» случая выбран последующий продукт с наибольшей максимальной суточной дозой, производимый на участке, а именно субстанция транквиляр, максимальная суточная доза которой составляет $N_2 = 10000$ мг, а наименьший размер серии – $N_1 = 10$ кг. Средняя суточная доза предшествующего продукта (клофелина гидрохлорида) составляет $MDD = 0,45$ мг. Коэффициент запаса $p = 0,1$ %. Как показали исследования эффективность метода отбора проб (коэффициент R) составил не менее 95 %.

Таким образом, рассчитанное *практическое* предельно допустимое значение остатков клофелина гидрохлорида на всем оборудовании после очистки будет иметь значение: $E_p = 0,43$ мг.

Общая площадь рабочего оборудования, контактируемого с продуктом на производственном участке составляет $S_2 = 20920$ см², следовательно, *практическое* предельно допустимое значение остатков клофелина гидрохлорида в пробе (в смыве с площади $S_1 = 100$ см²) равно $F_{crit} = 2,04$ мкг.

Предел количественного определения методики:

$$\text{ПКО} = \frac{10 \cdot \sigma}{S} = \frac{10 \cdot 0.33743}{42,44069} = 0,07951 \text{ мкг/мл}$$

Предел количественного обнаружения в смыве:

$$0,07951 \cdot 5 = 0,40 \text{ мкг.}$$

F_{crit} (2,04 мкг) превосходит ПКО в смыве (0,40 мкг), это означает, что данная методика позволяет обнаруживать и достоверно определять остаточные количества предшествующего продукта (клофелина гидрохлорида), с учетом требований к очистке оборудования.

Результаты анализа свабов

С использованием разработанной методики ВЭЖХ проведено определение остаточных количеств клофелина гидрохлорида с поверхностей фармооборудования при производстве АФИ «КЛОФЕЛН» на участке химического производства органических продуктов методом мазков (с помощью свабов). Для примера на рис. 3 представлена типовая хроматограмма, полученная при анализе сваба, которым проводили извлечение остаточных количеств клофелина гидрохлорида с поверхности сборника. Как видно из рисунка время удерживания пика клофелина совпадает с временем удерживания пика клофелина на хроматограмме модельных растворов РСО клофелина гидрохлорида для градуировочного графика (рисунок 2, в). Это подтверждает тождественность АФИ клофелина гидрохлорида, присутствующее в смывах и в соответствующем растворе РСО, а также отсутствие в смывах продуктов деградации этого АФИ.

В таблице 5 представлены результаты определения клофелина гидрохлорида на первом этапе разработки программы очистки оборудования.

Таблица 5

Результаты определения остаточных количеств клофелина гидрохлорида

Проба	Найдено клофелина гидрохлорида, мкг
<u>Сушильный шкаф 51-2:</u>	
№ 1 (дверца)	8,7
№ 2 (ниж. полка)	8,2
<u>Кювета:</u>	
№ 3	8,6
№ 4	8,9
<u>Сборник С 76</u>	
№ 5	9,4

Методика характеризуется удовлетворительной сходимостью инъекций – относительное стандартное отклонение результатов измерений площадей пиков менее 2%.

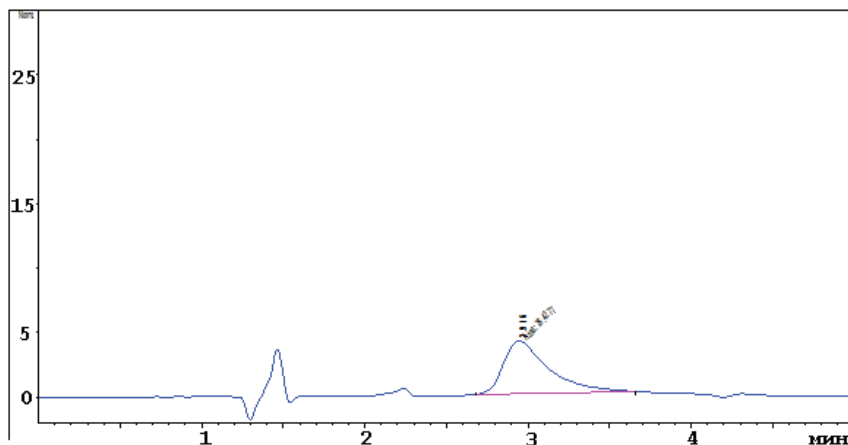


Рис. 3. Хроматограмма, полученная при анализе сваба, которым проводили извлечение остаточных количеств клофелина гидрохлорида с поверхности сборника С76 (содержание клофелина гидрохлорида – 9,3 мкг)

Выводы

Метод ВЭЖХ в изократическом режиме применен для чувствительного определения остаточных количеств клофелина гидрохлорида в смывах с поверхностей фармоборудования. Данная методика проста и хорошо воспроизводится. Результаты валидации показали, что методика обладает хорошей линейностью и внутрилабораторной прецизионностью. Степень извлечения клофелина гидрохлорида с аппликаторов и поверхностей фармоборудования составляет более 95 %.

Установлено, что клофелин гидрохлорид стабилен, продукты его деградации не образуются в течение 48 часов при комнатной температуре в растворах.

Разработанная методика может быть использована для определения остаточных количеств клофелина гидрохлорида при контроле качества очистки фармоборудования.

Литература

1. PIC/S document PI006-2. Recommendations on Validation Master Plan, Installation und Operational Qualification. Non Sterile Process Validation, Cleaning Validation; July 2004.
2. U.S. Food and Drug Administration. Guide to inspections validation of cleaning processes; July 1993.
3. Гармонов С.Ю., Нурисламова Г.Р., Фатхуллин Р.Р., Горюнова С.М. Проблемы перекрестного загрязнения в химико-фармацевтическом производстве: стандартизация и унификация требований // Вестник Казанского технологического университета. – 2006. – Vol. 6. – С. 294-305.
4. Nassani M. Cleaning validation in the pharmaceutical industry // J. Validation Technol. – 2005. – P. 11 -14.
5. Fourman G.L., Mullen M.V. Determining cleaning validation acceptance limits for pharmaceutical manufacturing operations // Pharm. Technol. – 1993. – Vol. 17. – P. 54-60.

6. *McCormick P.Y., Cullen L.F.*, «Cleaning Validation,» in *Pharmaceutical Process Validation*, edited by Berry R.I., Nash R.A., second edition, Marcel Dekker, Inc., New York, P. 319-341.
7. *Shabir G.A.* Equipment Cleaning Valiation: Developing an HPLC Method to Determine Contamination Residues on Equipment Surfaces // *Am. Pharm. Rev.* – 2008. – Vol. 11. – P. 16–22.
8. *Schmidt A. H.* Validated HPLC method for the determination of residues of acetaminophen, caffeine, and codeine phosphate on swabs collected from pharmaceutical manufacturing equipment in support of cleaning validation // *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* – 2006. – Vol. 29. – P. 1663-1673.
9. *Milenovic D.M., Lazic M.L., Veljkovic V.B., Todorovic Z.B.* Validation of an HPLC method for analysis of nifedipine residues on stainless-steel surfaces in the manufacture of pharmaceuticals// *Acta Chromatogr.* – 2008. – Vol. 20, №1. – P. 183-194.
10. *Magda A.A., Ahmed M.A., Ramadan A.* Validation of an HPLC–UV method for the determination of ceftriaxone sodium residues on stainless steel surface of pharmaceutical manufacturing equipments // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2011. – Vol. 55. – P. 247–252.
11. *Schmidt A. H., Stanic M.* UPLC-MS/MS in support of cleaning validation studies in an cephalosporin antibiotics production facility // *G.I.T. Laboratory J Europe.* – 2012. – Vol. 5-6. – P. 28.
12. *Peles D.N., Ely K.J., Crowder T.M., Ponstingl M.* Rapid at-line pharmaceutical cleaning verification using a novel light induced fluorescence (LIF) sensor // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2013 – Vol. 72. – P. 1-7.
13. *Fakutsu N., Konse T., Kawasaki T., et al.*, Determination of cefmetazole residue at pharmaceutical manufacturing facilities by chemiluminescence flow injection analysis // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2006 – Vol. 41. – P. 599–602.
14. *Кондратьева М.Л., Наприенко Е.Н., Шкуратова О.В.* Разработка аналитических методик для валидации очистки оборудования, используемого в производстве лекарственных средств // *Сибирский медицинский журнал* – 2011. — Т. 26, Вып. № 2-2. – С. 84–97.
15. *Sandra S. G., Giovana D., Sousa S. G. J., Daniel M. C. B., Miracy M. A., Leila B. L., Davi P. S.* Spectrophotometric Determination of Clonidine Hydrochloride through the Formation of Ion-Pair Complex // *Lat. Am. J. Pharm.* – 2012. – Vol. 31, № 8. – P. 1222–1225.
16. *El-Yazbi F.A., Bedair M., Korany M.A.* Spectrophotometric and fluorimetric determination of clonidine hydrochloride // *Analyst.* – 1986. – Vol. 111. – P. 477–478.
17. *Mohammad R. G., Anahita K., Sayed J. Sh., Parviz N.* Determination of Clonidine by Potentiometry Using PVC Membrane Electrode // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2013. Vol. 8. – P. 1999–2008.
18. *Gondaliya K., Kapupara P. P., Shah K. V.* Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of clonidine hydrochloride and hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulation // *Int. Bull. Drug Res.* – 2014. –Vol. 4, № 6. – P. 106–115.
19. *Hercegoва A., Sadecka J., Poloncky J.* Isotachophoretic determination of bisoprolol, clonidine, disopyramide and tolazoline in human fluids // *Acta Poloniae Pharm.– Drug Res.* – 1998. – Vol. 55, № 3. – P. 167–171
20. *Wenzl Th., Lankmayr E. P., Wintersteiger R., Sadjak A., Likar R., Zakel D.* Determination and quantification of clonidine in human blood serum // *J. Biochem. Biophys. Methods* – 2002. – Vol. 53, № 1–3, P.131–139.
21. *Chinmoy G., Rajendra P. S., Shafi I., Mandar M., Bhaswat S. Ch.* Sensitive, Selective, Precise and Accurate LC–MS Method for Determination of Clonidine in Human Plasma // *Chromatographia* – 2009. – Vol. 69, № 11-12, P. 1227–1232.
22. *European Pharmacopoeia. 7th edition. EP 7.0. Clonidine hydrochloride.* – 2008. – (monograph 0477).
23. *Державна Фармакопея України/Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр».* – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ. – Доповнення 2–2008. – С. 97-100.
24. *Гризодуб А.И.* Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // *Фармаком.* – 2006. – № 1-2. – С. 35–44.

Стаття надійшла до редакції 16.04.14

**А. В. Єгорова¹, Г. А. Федосенко², К. О. Вітюкова¹, С. М. Кашуцький²,
Г. В. Мальцев²**

¹Фізико-хімічний інститут ім. О.В.Богатського НАН України,
Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

²ТДВ «ІНТЕРХІМ», Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВЕРХ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ КЛОФЕЛІНУ ГІДРОХЛОРИДУ З ПОВЕРХОНЬ ФАРМОБЛАДНАННЯ

Запропоновано високочутливу методику ВЕРХ визначення слідових кількостей клофеліну гідрохлориду в змивах для валідації процесу очищення фармацевтичного обладнання. Розроблена методика валідована за наступними показниками: специфічність, лінійність, точність, межа виявлення та межа кількісного визначення. Градувальний графік лінійний в інтервалі концентрацій 0,1-6,0 мкг/мл, межа виявлення (МВ) дорівнює 0,026 мкг/мл. Встановлено, що розчини клофеліну гідрохлориду стабільні протягом 48 годин. Ефективність методу відбору проб складає більш ніж 95%.

Ключові слова: високоефективна рідинна хроматографія, клофелін гідрохлорид.

**A. V. Yegorova¹, G. A. Fedosenko², K. O. Vityukova¹, S. N. Kashutsky²,
G. V. Maltsev²**

¹A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute
of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

²«INTERCHEM», Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

VALIDATION HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF CLONIDINE HYDROCHLORIDE RESIDUES FROM PHARMACEUTICAL MANUFACTURING EQUIPMENT

Highly sensitive HPLC method of determination of clonidine hydrochloride trace amounts for validation cleaning process of the pharmaceutical equipment has been proposed. The developed method has been validated on the following parameters: specificity, linearity, precision, limit of detection and limit of quantification. The calibration curve was linear over the concentration range of 0.1-6.0 mg / ml, the limit of detection is 0.026 µg/ml. It has been found that clonidine hydrochloride solutions are stable for 48 hours. Effectiveness of the method of sampling is more than 95%.

Keywords: high performance liquid chromatography, clonidine hydrochloride.