

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**Vitamīnus saturošu preparātu ūdenī šķīstošo komponentu  
noteikšanas metožu salīdzināšana, optimizācija un  
validācija**

MAĢISTRA DARBS

Autore: **Olesya Popova**

Studenta apliecības Nr.: op15008

Darba vadītāji: lab. vad. Marija Trifonova  
asoc. prof. Vadims Bartkevičs

RĪGA

2017

## ANOTĀCIJA

**Vitamīnus saturošu preparātu ūdenī šķīstošo komponentu noteikšanas metožu salīdzināšana, optimizācija un validācija.** Popova O., zinātniskie vadītāji: lab. vad. Trifonova M., asoc. prof. Bartkevičs V. Maģistra darbs, 102 lappuses, 16 attēli, 20 tabulas, 57 literatūras avoti, 8 pielikumi. Latviešu valodā.

Maģistra darbs aptver divu farmaceitisko preparātu ūdenī šķīstošo komponentu ultra efektīvās šķīdumu hromatogāfiskās un tiešās infūzijas augstas izšķirtspējas masspektrometriskās noteikšanas metožu izstrādi un to pielietojamības izvērtējumu.

Literatūras apskatā izpētīta un apkopota informācija par ūdenī šķīstošo vitamīnu šķīdumu hromatogrāfijas noteikšanas metodēm, kā arī par ultra efektīvo šķīdumu hromatogāfijas un Orbitrap augstas izšķirtspējas masspektrometrijas teorētiskajiem pamatiem.

ŪDENĪ ŠĶĪSTOŠIE VITAMĪNI, ASKORBĪNSKĀBE, L-CISTĪNS, KALCIJA D-PANTOTENĀTS, NIKOTINAMĪDS, AMINO BENZOSKĀBE, PIRIDOKSĪNS, TIAMĪNS, RIBOFLAVINS, ULTRA EFEKTĪVĀ ŠĶĪDRUMU HROMATOGĀFIJA, AUGSTAS IZŠĶIRTSPĒJAS MASSPEKTROMETRIJA, ORBITRAP.

## ABSTRACT

**Comparison, optimization and validation of methods for water-soluble component assay in vitamin products.** Popova O., supervisors: head of lab. Trifonova M., asoc. prof. Bartkevics V. Master thesis, 102 pages, 16 figures, 20 tables, 57 literature references, 8 appendixes. In Latvian.

Ultra performance liquid chromatography and direct infusion high-resolution mass spectrometry methods for analysis of water-soluble components in two vitamin products were developed and applicability of those methods was assessed in frame of this thesis.

The literature review summarizes a comparison of the methods for analysis of water-soluble vitamins by liquid chromatography, as well as theoretical principles of ultra performance liquid chromatography and Orbitrap high-resolution massspectrometry.

WATER SOLUBLE VITAMINS, ASCORBIC ACID, L-CYSTINE, CALCIUM D-PANTOTHENATE, NICOTINAMIDE, AMINOBENZOIC ACID, PYRIDOXINE, THIAMINE, RIBOFLAVIN, ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, HIGH-RESOLUTION MASS SPECTROMETRY, ORBITRAP.

# SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS .....	6
IEVADS.....	8
1. LITERATŪRAS APSKATS .....	9
1.1. Bioloģiski aktīvu vielu analīzes metodes.....	9
1.2. Ultra efektīvā šķidrums hromatogrāfija.....	16
1.3. Augstas izšķirtspējas Orbitrap masspektrometrija.....	20
1.4. Prasības farmaceitiskā preparāta analīzes metodes validācijai.....	23
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA.....	26
2.1. Izmantotās iekārtas un reaģenti.....	26
2.1.1. Reaģenti .....	26
2.1.2. Standartvielas.....	26
2.1.3. Izmantotā aparatūra, programmatūra un trauki.....	26
2.2. Šķidrums hromatogrāfijas apstākļi.....	27
2.3. Tiešās infūzijas augstas izšķirtspējas masspektrometrijas apstākļi .....	27
2.4. Paraugu raksturojums.....	28
2.5. Šķīdumu pagatavošana.....	28
2.6. Paraugu, standartu un placebo šķīdumu pagatavošana.....	29
2.7. Selektivitātes pārbaude .....	29
2.8. Šķīdumu stabilitātes pārbaude .....	30
2.9. Linearitātes, precizitātes un pareizības pārbaude.....	31
2.9.1. Linearitātes pārbaude.....	31
2.9.2. Precizitātes pārbaude .....	33
2.9.3. Pareizības pārbaude .....	35
2.10. Augstas izšķirtspējas masspektrometriskā analīze.....	37
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS.....	39
3.1. Šķidrums hromatogrāfiskas metodes optimizācija.....	39
3.2. Šķidrums hromatogrāfiskas metodes validācija.....	42
3.2.1. Metodes selektivitātes pārbaude .....	42
3.2.2. Šķīdumu stabilitātes pārbaude .....	43
3.2.3. Linearitātes pārbaude.....	45
3.2.4. Precizitātes pārbaude .....	47
3.2.5. Pareizības pārbaude .....	47

3.2.6. Robustuma pārbaude.....	47
3.3. Augstas izšķirtspējas masspektrometriskā analīze.....	49
3.4. Metožu salīdzinājums .....	52
SECINĀJUMI.....	53
IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	54
PIELIKUMI.....	59
1. Pielikums. Analizējamo savienojumu molekulārās absorbcijas spektri .....	59
2. Pielikums. Selektivitātes pārbaude .....	62
3. pielikums. Stabilitātes pārbaude .....	67
4. Pielikums. Linearitātes pārbaude.....	69
5. Pielikums. Kalibrēšanas taisnes.....	85
6. Pielikums. Precizitātes pārbaude .....	87
7. Pielikums. Pareizības pārbaude .....	90
8. Pielikums. Robustuma pārbaude.....	101

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

ABA	<i>para</i> -aminobenzoskābe
ASC	askorbīnskābe
AU	absorbcijas vienības (angļu val. <i>absorbance units</i> )
B <sub>1</sub>	tiamīns, tiamīna mononitrāts, tiamīna hidrohlorīds
B <sub>2</sub>	riboflavīns
B <sub>3</sub>	nikotīnamīds, nikotīnskābe
B <sub>5</sub>	kalcija D-pantotenāts, D-pantotēnskābe
B <sub>6</sub>	piridoksīna hidrohlorīds, piridoksāls, piridoksīns, piridoksamīns
B <sub>9</sub>	folskābe
B <sub>10</sub>	<i>para</i> -aminobenzoskābe
B <sub>12</sub>	cianokobalamīns
C18	oktadecilsilāns
C8	oktilsilāns
CaD	kalcija D-pantotenāts
CID	jonu fragmentācijas režīms (angļu val. <i>Collision-induced dissociation</i> )
CYS	L-cistīns
EudraLex	Eiropas Savienības zāļu tiesiskā regulējuma dokumentu krājums
FDA	ASV Pārtikas un zāļu pārvalde (angļu val. <i>Food and Drug Administration</i> )
FLD	fluorescences detektēšana
FTICR	Furjē transformācijas jonu ciklotrona rezonanse (angļu val. <i>Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i> )
GC	gāzu hromatogrāfija (angļu val. <i>gas chromatography</i> )
GMP	Laba ražošanas prakse (angļu val. <i>Good Manufacturing Practice</i> )
HCD	augstās enerģijas sadursmju un disociācijas šūna (angļu val. <i>Higher energy collisional dissociation cell</i> )
HPLC	augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija (angļu val. <i>high performance liquid chromatography</i> )
HPTLC	augsti efektīvā plānslāņa hromatogrāfija (angļu val. <i>High performance thin layer chromatography</i> )
HRMS	augstas izšķirtspējas masspektrometrija (angļu val. <i>high-resolution mass spectrometry</i> )
ICH	Starptautiskā konference zāļu reģistrācijas prasību harmonizēšanai (angļu val. <i>International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use</i> )

LC	šķidrumu hromatogrāfija
MS	masspektrometrija
MS/MS	tandēma masspektrometrija
NIC	nikotīnamīds
PYR	piridoksīna hidrohlorīds
RIB	riboflavīns
TEA	triētilamīns
TEOA	triētanolamīns
THI	tiamīna mononitrāts
TOF	nolidojuma laika masspektrometrija (angļu val. <i>time-of-flight massspectrometry</i> )
TQMS	trīskāršā kvadrupola masspektrometrija (angļu val. <i>triple quadrupole mass spectrometer</i> )
UPLC	ultra efektīvā šķidrumu hromatogrāfija (angļu val. <i>ultra performance liquid chromatography</i> )
USP	Amerikas Savienoto Valstu farmakopeja (angļu val. <i>United States Pharmacopeia</i> )
UV	ultravioletā gaisma

## IEVADS

Vitamīni ir organiski savienojumi, kuri nelielā daudzumā ir nepieciešami visu orgānu un to sistēmu funkcionēšanai: augšanai un attīstībai, redzes un asinsrades procesiem, kaulu kalcifikācijai, vielmaiņai un citām svarīgām funkcijām. Tie palielina organisma spēju pretoties infekcijām. Organisms pats nespēj sintezēt vitamīnus vai sintezē tos nepietiekamā daudzumā [1-3], tāpēc uztura nepietiekamības apstākļos ir nepieciešamība uzņemt tos papildus ar uztura bagātinātājiem un farmaceitiskiem preparātiem, kuri mūsdienās ir plaši pieejami tirgū.

Vitamīnu kvantitatīvā noteikšana ir uzdevums, ar kura risināšanu analītiķiem jāstopas ļoti bieži. Tam pamatā ir liels visdažādāko vitamīnu kombināciju saturošo preparātu klāsts, kā arī GMP un ICH vadlīniju noteikumi, kuri reglamentē aktīvo farmaceitisko vielu satura pārbaudi produktos gan pirms izlaišanas, gan visā produkta derīguma termiņa laikā [4-6]. Līdz ar to ir izstrādāts atbilstošs metožu klāsts vitamīnu analīzei. Tādējādi, sastopoties ar jaunu objektu, analītiķa uzdevums daļēji reducējas uz atbilstošās metodikas izvēli no literatūrā atrodamajām. Neskatoties uz šķietami lielo piedāvājumu, pareiza paņēmiena izvēle vienmēr saistās ar ievērojamu eksperimentālā darba apjomu.

Šis darbs fokusējas uz diviem vitamīnu saturošiem preparātiem:

- *preparāts A*, kapsulas ar kalcija D-pantotenātu (60 mg/kapsulā), L-cistīnu (20 mg/kapsulā), p-aminobenzoskābi (20 mg/kapsulā) un tiamīna mononitrātu (60 mg/kapsulā);
- *preparāts B*, dražejas ar nikotīnamīdu (10 mg/dražejā), kalcija D-pantotenātu (3 mg/dražejā), tiamīna mononitrātu (1,2 mg/dražejā), riboflavīnu (1,6 mg/dražejā), piridoksīna hidrohlorīdu (1,2 mg/dražejā) un L-cistīnu (30 mg/dražejā).

**Darba mērķis:** apskatīt un salīdzināt literatūrā aprakstītās ūdenī šķīstošo vitamīnu noteikšanas metodes, izvēlēties vispiemērotāko paņēmieni to noteikšanai farmaceitiskajos preparātos, veikt metodes pielietojamības izvērtējumu, optimizāciju un validāciju.

### **Darba uzdevumi:**

- atrast un optimizēt metodi piedāvāto farmaceitisko preparātu ūdenī šķīstošo komponentu noteikšanai;
- izvērtēt metodes pielietojamību interesējošo savienojumu kvantitatīvai noteikšanai;
- veikt izvēlētās metodes validāciju atbilstoši labās ražošanas prakses prasībām.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

Pētot ūdenī šķīstošo vitamīnu noteikšanas iespējas, konstatēts, ka visas metodes var nosacīti iedalīt 2 pamatgrupās:

1. Individuālu vitamīnu noteikšanas metodes, kas pārsvarā ir nehromatogrāfiskās metodes;
2. Vairāku vitamīnu vienlaicīga noteikšana, izmantojot hromatogrāfiskās metodes.

Līdz ar tehnoloģisko progresu analītiskās ķīmijas jomā pēdējo 25-30 gadu laikā ir strauji pieaudzis pētījumu un publikāciju skaits, kur ir izmantotas hromatogrāfiskās metodes. Metožu attīstību veicināja jaunu spiedienizturīgo hromatogrāfisko aparātu, selektīvu sorbentu un jutīgu detektoru rašanās un pastāvīga uzlabošana.

Mūsu darba fokusā ir 8 dažādu savienojumu (askorbīnskābe, tiamīna mononitrāts, riboflavīns, nikotīnamīds, kalcija *D*-pantotenāts, piridoksīna hidrohlorīds, *p*-aminobenzoskābe un L-cistīns) vienlaicīga noteikšana, tāpēc ir detalizēti apskatītas tieši hromatogrāfiskās metodes, bet citas iespējamās analīzes metodes ir tikai pārskaitītas.

Maģistra darba ietvaros tika aprobētas divas modernākās instrumentālās metodes vairāku savienojumu vienlaicīgai analīzei: ultra efektīvā šķīdumu hromatogrāfija un augstas izšķirtspējas Orbitrap masspektrometrija, – apskatīta literatūra un apkopota informācija par tās principiem, aktualitāti un priekšrocībām, salīdzinot ar radnieciskām metodēm.

## 1.1. Bioloģiski aktīvu vielu analīzes metodes

**Nehromatogrāfiskās analīzes metodes.** Literatūrā ir atrastas vairākas individuālu vitamīnu un L-cistīna noteikšanas metodes, informācija ir apkopota 1.1. tabulā.

Minētās metodes ir novecojušas un laikietilpīgas, tās nevar tikt pielietotas visu interesējošu vielu vienlaicīgai noteikšanai ar apmierinošu precizitāti. Šo iemeslu dēļ šajā darbā ir apskatītas hromatogrāfiskās metodes, kuras dod iespēju veikt vienlaicīgu daudzkomponentu analīzi.

**Individuālu vitamīnu un L-cistīna noteikšanas metodes**

Savienojums	Noteikšanas metode	Literatūras avota Nr.
B <sub>1</sub>	Fluorimetrija	7
	Potenciometrija	1
	Voltamperometrija	8
B <sub>2</sub>	Spektrofotometrija	9
	Voltamperometrija	10
B <sub>3</sub>	Spektrofotometrija	11, 12
	Fluorimetrija	13
B <sub>5</sub>	Fluorimetrija	14
B <sub>6</sub>	Spektrofotometrija	15
	Potenciometrija	1
	Voltamperometrija	16
B <sub>10</sub>	Fluorimetrija	17
	Spektrofotometrija	18
L-Cistīns	Hemiluminiscences analīze	19
	Fluorimetrija	20
	Voltamperometrija	21
	Amperometrija	22

**Hromatogrāfiskās analīzes metodes.** Literatūra ir plaši aprakstītas ūdenī šķīstošo vitamīnu šķīdumu hromatogrāfijas noteikšanas metodes. Vitamīnu un L-cistīna noteikšanai ir atrastas konvencionāla šķīdumu hromatogrāfijas metode (LC) [23, 24], augsti efektīvā šķīdumu hromatogrāfijas metode (HPLC) [2, 3, 25-31] un ultra efektīvā šķīdumu hromatogrāfijas metode (UPLC) [32, 33]. Apskatītās analīzes metodes ir paredzētas 2 līdz 9 dažādu ūdenī šķīstošo vitamīnu vienlaicīgai noteikšanai, tomēr netika atrasta neviena metode, kura būtu pielietojama visu mūs interesējošo aktīvo vielu noteikšanai. Apskatīto hromatogrāfisko metožu īss pārskats ir apkopots 1.2. tabulā.

## Hromatogrāfisko metožu apkopojums ūdenī šķīstošo vitamīnu noteikšanai

Metode	Savienojumi	Kolonnas parametri (sorbents, garums x iekšējais diametrs, daļiņu izmērs)	Kustīgā fāze	Analīzes laiks, min.	Literatūras avota Nr.
LC-UV	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>9</sub> , B <sub>10</sub> , B <sub>12</sub> , ASC	C18 250 × 4,6 mm, 5 μm	Gradients: A: 15 mM amonija formiāts, kas satur 0,1 % TEA, pH 4,0 (ar skudrskābi); B: acetoniils.	12	23
LC-UV	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>9</sub> , B <sub>12</sub> , ASC	C18 250 × 4,6 mm, 5 μm	Gradients: A: 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> buferšķīdums, kas satur 3 mM nātrija heksānsulfonātu pH 2,80 (ar H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ); B: metanols .	11	24
HPLC-UV	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>9</sub> , ASC	C18 250 × 2,0 mm, 4 μm	Gradients: A: 0,1 % skudrskābes šķīdums ūdenī; B: 0,1 % skudrskābes šķīdums acetoniilā.	25	2
HPLC-MS/MS (TQMS)	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>5</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>7</sub> , B <sub>9</sub> , B <sub>10</sub> , B <sub>12</sub>				
HPLC-FLD	B <sub>6</sub> , B <sub>2</sub>				
HPLC-UV	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>9</sub> , B <sub>12</sub>	C18 150 x 4,6 mm, 3,5 μm	Gradients: A: 10 mmol/L amonija formiāta šķīdums, pH 3,8 (ar skudrskābi); B: metanols.	30	3
HPLC-MS/MS (TQMS)	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>5</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>7</sub> , B <sub>9</sub> , B <sub>12</sub>				
HPLC-FLD	B <sub>6</sub> , B <sub>2</sub>				

1.2.tabula (turpinājums)

Metode	Savienojumi	Kolonnas parametri (sorbents, garums x iekšējais diametrs, daļiņu izmērs)	Kustīgā fāze	Analīzes laiks, min.	Literatūras avota Nr.
HPLC-UV	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>9</sub> , B <sub>12</sub> , ASC	C18 100 x 4,6 mm, 3,5 μm	Gradients: A: 5,84 mM nātrija heksānsulfonāta šķīdums un acetonilrils (95:5) ar 0,1 % TEA, pH 2,5 (ar 1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ); B: 5,84 mM nātrija heksānsulfonāta šķīdums un acetonilrils (50:50) ar 0,1 % TEA, pH 2,5 (ar 1M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ).	5	25
HPLC-FLD	B <sub>6</sub> , B <sub>2</sub>				
HPLC-UV	B <sub>1</sub> , B <sub>5</sub> , B <sub>10</sub> , CYS	C18 150 × 4,6 mm, 4 μm	Gradients: A: 3 g nātrija heksānsulfonāta un 2 mL H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 1 L ūdenī; B: metanols.	39	26
HPLC-UV	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub>	C18 250 × 4,6 mm, 5 μm	Gradients: A: 11,0 mM fosfāta buferšķīdums (pH 2,25), kas satur 4 % acetonitrila un 10,5 mM nātrija heksānsulfonātu; B: acetonitrils.	25	27
HPLC-UV	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub>	C18 150 x 4,6 mm, 5 μm	Ūdens un metanola maisījums (82:18), kas satur 2,5 mM nātrija heksānsulfonātu.	17	28
HPLC-UV	B <sub>1</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>9</sub>	Alkilamid- aizvietots C18 150 x 4,6 mm, 5 μm	Metanola un 5 mM nātrija heksānsulfonāta šķīdums (25:75), kas satur 0,1 % TEA.	8	30

Metode	Savienojumi	Kolonnas parametri (sorbents, garums x iekšējais diametrs, daļiņu izmērs)	Kustīgā fāze	Analīzes laiks, min.	Literatūras avota Nr.
HPLC-UV	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> , ASC	C8 250 × 4,6 mm, 3,5 μm	Ūdens un metanola maisījums (85:15) ar nātrija heksānsulfonātu un TEOA, pH 2,8 (ar H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ).	7	29
	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>10</sub>		Gradients: A: Ūdens un metanola maisījums (92:8) ar nātrija heksānsulfonātu un TEOA, pH 2,8 (ar H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ); B: Ūdens un metanola maisījums (82,8:17,2) ar nātrija heksānsulfonātu un TEOA, pH 2,8 (ar H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ).		
UPLC-MS (TOF)	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>5</sub> , B <sub>6</sub>	C18 50 x 2,1 mm, 1,8 μm	Gradients: A: 0,1 % skudrskābes šķīdums ūdenī; B: 0,1 % skudrskābes šķīdums acetonitrilā.	15	32
UPLC-MS/MS (TQMS)	B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub>	C18 50 x 2,1 mm, 1,8 μm	Gradients: A: 10 mM amonija formiāta šķīdums ūdenī; B: acetonitrils.	5	33
HPLC-UV	B <sub>1</sub> , B <sub>5</sub> , B <sub>10</sub> , CYS	C8 250 x 4,0 mm, 1,8 μm	Gradients: A: 340 mg nātrija heksānsulfonāta, 950 mL ūdens, 50 mL metanola, pH 2,25 (ar H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ); B: 340 mg nātrija heksānsulfonāta, 100 mL ūdens, 900 mL metanola pH 2,6 (ar H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ).	40	31

Visas atrastās metodes pieder pie apgrieztās fāzes šķidrums hromatogrāfijas, tas arī bija sagaidāms, jo ūdenī šķīstošie vitamīni ir polāri savienojumi, un to analīze polārā vidē ir loģiska un pamatota. Par stacionāro fāzi izmanto modificētos silikagelus, galvenokārt, C18 [2, 3, 25-28, 32, 33], kā arī C8 [29, 31] un alkilamidaizvietotos [30], ar daļiņu izmēriem 3,5 – 5 μm HPLC gadījumā un 1,8 μm UPLC gadījumā. HPLC analīzei pārsvarā izmanto 150 un 250 mm garas kolonnas ar iekšējo diametru 4,0 un 4,6 mm, bet UPLC analīzei – 50 mm garas kolonnas ar diametru 2,1 mm.

Neskatoties uz to, ka visi apskatīti vitamīni ir ūdenī šķīstošie, to hidrofilītāte stipri atšķiras, tāpēc ir grūti piemeklēt kustīgās fāzes sastāvu, lai veiktu eluēšanu izokrātiskos apstākļos, tomēr tādu hromatogrāfisko sistēmu pielietošana ir aprakstīta [28-30]. Apskatītā literatūrā ir aprakstīta līdz 5 vitamīnu vienlaicīga analīze izokrātiskos apstākļos, pie tam B<sub>1</sub> vitamīnu nosaka mononitrāta [28] vai hidrohlorīda formā [29, 30], B<sub>3</sub> vitamīnu visos gadījumos analizē nikotīnamīda formā, bet B<sub>6</sub> vitamīnu – hidrohlorīda formā. Izokrātiskai eluēšanai izmanto kustīgu fāzi, kas sastāv no metanola un ūdens maisījuma, kuram visos gadījumos ir pievienots jonu pāru reaģents un atsevišķos gadījumos TEA [30] vai TEOA [29]. TEA un TEOA pievieno smaiļu simetrijas uzlabošanai [30, 34, 35], it īpaši B<sub>1</sub> un B<sub>6</sub> vitamīnu gadījumā [23]. Konstatēts, ka, pievienojot kustīgai fāzei 0,1 % TEA, notiek ievērojama smailes simetrijas uzlabošana, bet 0,2 % TEA pievienošana labāku efektu jau nedod, tāpēc ir pieņemts, ka 0,1 % TEA koncentrācija ir optimālā [23].

Tomēr biežāk vitamīnu šķidrums hromatogrāfisko analīzi veic gradienta apstākļos [2, 3, 23-27, 31-33]. Analīzi sāk ar zemāku organiskā šķīdinātāja saturu kustīgajā fāzē un to pakāpeniski palielina. Gradienta eluēšana dod iespēju samazināt analīzes laiku un uzlabot smaiļu simetriju [36]. Gradienta apstākļos eluēšanai izmanto ūdens un acetonitrila [2, 23, 25, 27, 32, 33] vai metanola [3, 24, 26, 29, 31] maisījumu. Autori [24] rekomendē izmantot metanolu nevis acetonitrilu, lai padarītu metodi ekonomiski izdevīgāku.

Daudzās metodēs [24-31] ir aprakstīta jonu pāru reaģenta (piemēram, nātrijs heksānsulfonāts) izmantošana kustīgās fāzes sastāvā. Vitamīnu klase apvieno savienojumus ar dažādām funkcionālām grupām (piemēram, aminogrupām, amidogrupām, aminokarbonilgrupām), kurām ir tieksme jonizēties skābā vidē. Jonizējoties, savienojumiem pieaug polaritāte, pastiprinās afinitāte pēc polārās kustīgas fāzes un pavājinās sorbcija, vai arī šīs vielas vispār netiek aizturētas uz sorbenta apgrieztās fāzes režīmā [36]. Šajā gadījumā izmanto jonu pāru reaģentus. Tie ir savienojumi, kas iedarbojas uz analizējamās vielas jonizētām vai jonizējamām funkcionālajām grupām, regulējot šo vielu aizturi un uzlabojot hromatogrāfisko izšķirtspēju, tajā pašā laikā nekādā veidā neiedarbojoties uz neitrālām molekulām [36]. Autori [24], salīdzinot 4 dažādu jonu pāru reaģentu (nātrijs butānsulfonāts,

nātrijs pentānsulfonāts, nātrijs heksānsulfonāts un nātrijs heptānsulfonāts) ietekmi uz ūdenī šķīstošo vitamīnu aizturi, konstatēja, ka labāki rezultāti ir sasniedzami, izmantojot nātrijs heksānsulfonātu. Tas uzrādīja apmierinošu aizturi vitamīniem, kas eluējas ātrāk (C, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>), un neuzrādīja pārmērīgu aizturi analītiem, kas eluējas vēlāk. Bez tam ziņots [24], ka nātrijs heksānsulfonāta izmantošana ievērojami uzlabo smaiļu formu: novērotas asākas un simetriskākas smailes.

Jonu pāru hromatogrāfijas gadījumā liela nozīme ir kustīgās fāzes izvēlei: gan analītiem, gan jonu pāru reaģentam jābūt jonizētā formā [36]. Visās apskatītās jonu pāru hromatogrāfijas metodēs autori izvēlējās fosfāta buferšķīdumu pH diapazonā 2,25 – 2,8.

Literatūrā aprakstītā pētījuma [23] autori konstatēja, ka pH 3,0 nodrošina optimālu aizturi visiem viņu noteiktiem vitamīniem, taču izšķirtspēja, it īpaši starp B<sub>1</sub> un B<sub>6</sub> vitamīnu smailēm, nav pietiekama smaiļu formas un asimetrijas dēļ. Lai uzlabotu formu un izšķirtspēju, autori [23, 25] pievieno eluentam 0,1 % TEA, bet autori [29] – TEOA. Savukārt ir ziņots [24] nepietiekošs B<sub>1</sub> un B<sub>2</sub> vitamīnu sadalījums smaiļu sliktu formu dēļ, ja kustīgās fāzes pH ir lielāks par 3,0. Līdz ar to secināts, ka atdalīšanas efektivitātes uzlabošanai tomēr jāizmanto kustīgā fāze ar pH vērtību zem 3,0.

Vēl viens būtisks analīzes aspekts ir detektēšana, jo tās izvēle var ievērojami ietekmēt metodu jutību, robustumu, kā arī pielietojamību ikdienā. Apskatītā literatūrā analītu signāla reģistrēšanai izmantota fluorimetriskā [2, 25], masspektrometriskā [2, 3, 32, 33] un UV-VIS [2, 3, 23-31] detektēšana. MS detektēšana ir ļoti jutīga, bet tās izmantošana ir apgrūtināta, ja analīzei ir izmantoti jonu pāru reaģenti un fosfāta buferšķīdums to zemas gaistamības dēļ [23]. FLD detektēšana ir jutīga un selektīva, taču vairāku vitamīnu noteikšanai ir jāpielieto derivatizācija, nederivatizētā veidā iespējams noteikt tikai B<sub>6</sub> un B<sub>12</sub> vitamīnus [3]. Praksē vitamīnu signālu reģistrēšanai visplašāk izmanto UV-VIS detektorus, jo tiem ir laba jutība, kā arī tie ir salīdzinoši lēti un ir pieejami gandrīz visās analītiskajās laboratorijās. Mūsdienu spektrofotometri ļauj detektēt katru analītu tā absorbcijas spektra maksimumā vai kādā citā optimālā viļņa garumā.

Tātad, analizējot literatūras datus, par piemērotāko analīzes metodi atzīta jonu pāru šķīdumu hromatogrāfija uz apgrieztais fāzes ar UV-VIS detektēšanu. Izvēloties apstākļus, ņemam vērā to, ka mūsu gadījumā ir liels savienojumu skaits, kas ir jāatdala, tāpēc mūsu mērķim noteikti neder eluēšana izokrātiskos apstākļos. Tā kā L-cistīna smailes forma ir būtiski atkarīga no kustīgās fāzes A pH vērtības [31], savukārt tiamīna smailes forma – no kustīgās fāzes B pH vērtības [31], nolemam iestādīt eluentu A un B pH vērtības 2,25 un 2,6 attiecīgi.

## 1.2. Ultra efektīvā šķidrums hromatogrāfija

HPLC ir efektīvā analītiskā metode dažādu komponentu sadalīšanai maisījumos, kuru jau vairākus desmitus gadu izmanto bioloģiski aktīvu vielu identificēšanai un kvantitatīvai noteikšanai. Vairāk kā 40 gadus zinātnieki mēģināja uzlabot hromatogrāfisko atdalīšanas efektivitāti, fokusējoties uz nekustīgās fāzes daļiņu izmēru samazināšanu. Bet pēc noteikta laika optimizācijas tehnoloģijas attīstība bija sasniegusi robežu, kad, samazinot daļiņu izmēru, vairs nebija iespējams uzlabot efektivitāti ierobežota spiediena diapazona un joslu izplešanos dēļ [37]. 2004. gadā kompānija *Waters* paziņoja, ka ir izstrādāts jauns šķidrums hromatogrāfijas paveids – UPLC. UPLC metode balstās uz nekustīgās fāzes daļiņu maziem izmēriem (1,7-2,0 μm, HPLC gadījumā daļiņu izmēri ir 3-5 μm) un kustīgās fāzes augstu spiedienu (līdz 1030 bar, HPLC gadījumā – līdz 400 bar) [38-40]. UPLC metodes priekšrocības, salīdzinot ar HPLC, ir labāka izšķirtspēja, jutība, ātrums, kā arī mazāki kustīgas fāzes patēriņi [37].

Konstatēts, ka izmantojot sorbentu, kura daļiņu izmēri ir mazāki par 2,5 μm, ievērojami uzlabojas atdalīšanas efektivitāte, un šī efektivitāte nesamazinās, palielinot plūsmas ātrumu [38]. Literatūrā [38] atrasta informācija, kā ar UPLC metodi kustīgās fāzes patēriņš samazinās vismaz par 80 %, salīdzinot ar HPLC.

UPLC darbības pamatprincipi ir aprakstāmi ar van Demtera vienādojumu (1.1. formula), kas izskaidro teorētiskā šķīvja augstuma  $H$  atkarību no kustīgās fāzes lineārā ātruma  $u$  [37-40]:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (1.1.)$$

kur  $u$  – kustīgās fāzes lineārais ātrums un  $A$ ,  $B$ ,  $C$  ir konstantes:

- $A$  ir virpuļdifūzijas un plūsmas sadalījuma komponenta ieguldījums joslas paplašinājumā (1.2. formula) [37, 39].

$$A = 2\lambda d_p \quad (1.2.)$$

kur  $\lambda$  – pildījuma konstante,  $d_p$  – sorbenta daļiņu diametrs.

- $B$  ir garendifūzijas ieguldījums (1.3. formula). Garendifūzija ir parādība, kad parauga molekulas kustīgajā fāzē izkliedējas arī bez jebkādas ārējas iedarbības [37, 40].
-

$$B = \frac{2\gamma D_m}{u} \quad (1.3.)$$

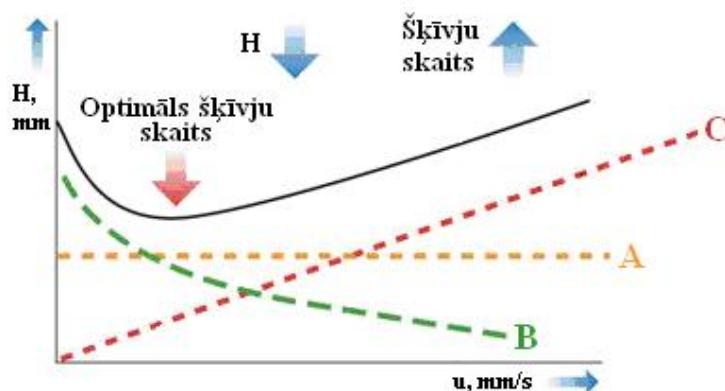
kur  $\gamma$  ir līkumainības faktors un  $D_m$  – parauga difūzijas koeficients.

- $C$  ir masas pārnese konstante (1.4. formula). Masas pārnese raksturo analīta molekulu pārvietošanos kustīgajā un nekustīgajā fāzēs [37, 40].

$$C = \frac{8}{\pi^2} \cdot \frac{k'}{(1+k')^2} \cdot \frac{d_f^2}{D_{liq}} \cdot u \quad (1.4.)$$

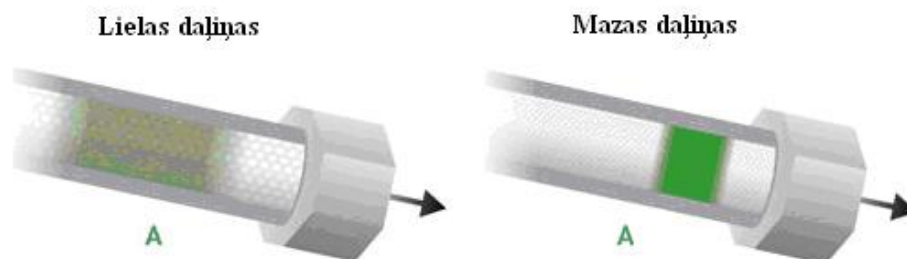
kur  $k'$  ir kapacitātes faktors,  $d_f$  – nekustīgas fāzes slāņa biezums un  $D_{liq}$  – parauga difūzijas koeficients nekustīgajā fāzē.

Konstantes  $A$ ,  $B$  un  $C$  var attēlot grafiski kā teorētiskā šķīvja augstuma  $H$  funkciju no kustīgās fāzes lineārā ātruma  $u$  (1.1. att.).



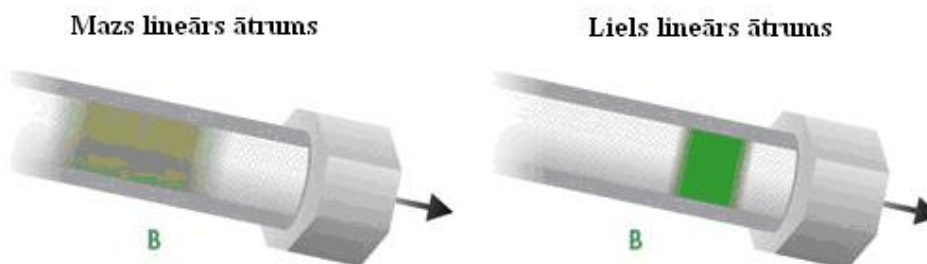
1.1. att. Individuāli attēlotās van Demtera vienādojuma konstantes

Konstantes  $A$  funkcija ir horizontālā taisne. Konstante  $A$  ir atkarīga no kolonnas uzpildīšanas kvalitātes un nav atkarīga no kustīgas fāzes plūsmas ātruma. Tā arī parāda, ka analīta molekulas iziet dažādas trajektorijas, pārvietojoties starp sorbenta daļiņām kolonnā. Ciešu novietotu maza izmēra sorbenta daļiņu lietošanas rezultātā iegūst šaurākas joslas, augstāku atdalīšanas efektivitāti un jutību, ko atspoguļo konstantes  $A$  vērtības samazināšanās [37, 40].



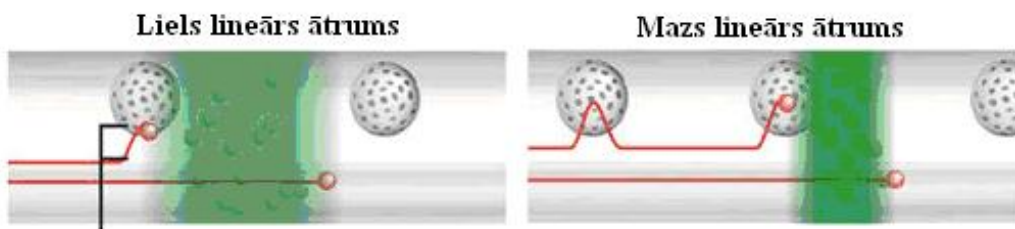
1.2. att. Sorbenta daļiņu diametra ietekme uz joslas platumu (konstante  $A$ )

Garendifūzijas ieguldījums (konstante  $B$ ) ir lejupejoša līkne. Tas nozīmē, ka palielinoties kustīgās fāzes lineārajām ātruma  $u$ , teorētiskais šķīvja augstums  $H$  samazinās. Konstantes  $B$  vērtība nav atkarīga no sorbenta daļiņu izmēra. Konstante rāda arī to, ka, palielinoties kustīgās fāzes ātruma  $u$ , parauga molekulas uzturas kolonnā īsāku laiku, un rezultātā iegūtas joslas ir šaurākas (1.3. att.) [37, 40].



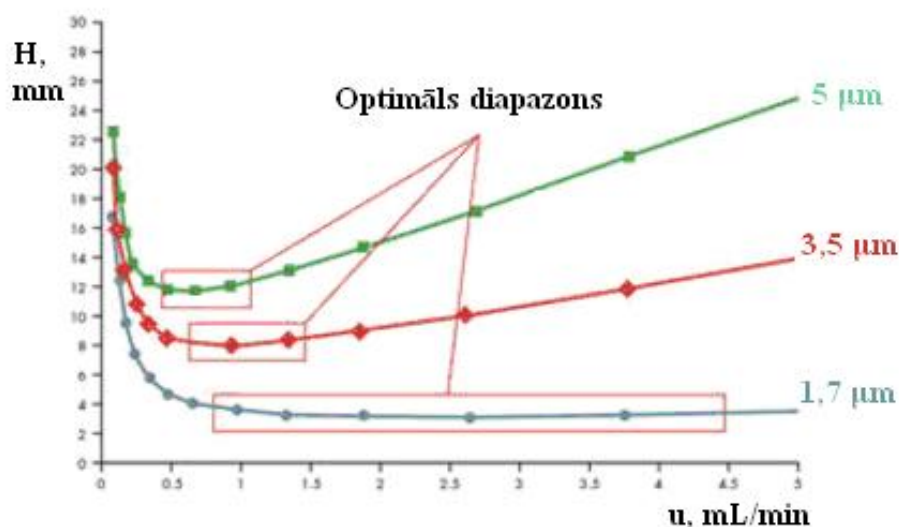
1.3. att. Kustīgās fāzes lineārā ātruma ietekme uz joslas platumu (konstante  $B$ )

Masas pārnese konstante  $C$  ir augoša lineārā teorētiskā šķīvja augstuma  $H$  funkcija no kustīgās fāzes lineārā ātruma  $u$ . Parauga molekulas var nonākt sorbenta porās un pēc tam difundēt atpakaļ kustīgajā fāzē, bet šis process prasa laiku, kurā molekulas, kas nenonāk porās, paspēj pārvietoties tālāk uz priekšu. Tā rezultātā josla paplašinās mazāk, ja nekustīgās fāzes daļiņas ir mazākas. Ja kustīgās fāzes ātrums  $u$  ir liels, tad attālums starp porās imobilizētām parauga molekulām un tām, kas ir pārvietojušās tālāk, ir lielāks, nekā gadījumā, kad ātrums  $u$  ir mazs. No tā izriet, ka joslu paplašinājuma samazināšanai plūsmas ātrumam  $u$  ir jābūt lēnākam (1.4. att.) [37, 40].



1.4. att. Kustīgās fāzes lineārā ātruma ietekme uz uz joslas platumu (konstante C)

Van Demtera līkne veidojas, apvienojot konstantes  $A$ ,  $B$  un  $C$  ieguldījumus. Veicot hromatogrāfisku atdalīšanu, pielietojot kustīgas fāzes ātrumu, kas atbilst līknes zemākajam punktam, iegūst visaugstāko atdalīšanas efektivitāti un izšķirtspēju [37]. Samazinot sorbenta daļiņu diametru  $d_p$ , samazinās konstantes  $C$  slīpums – tas ir pamatprincips, kas darbojas UPLC tehnoloģijās. Sorbents ar daļiņu diametru  $d_p$  1,7  $\mu\text{m}$  nodrošina 2-3 reizes mazāku teorētiskā šķīvja augstumu  $H$  nekā daļiņas ar diametru 3,5  $\mu\text{m}$  (1.5. att.). Turklāt zemākas  $H$  vērtības tiek sasniegtas pie lielāka kustīgas fāzes lineārā ātruma [38, 39]. Ir atrasta informācija, ka UPLC apstākļos samazinot sorbenta daļiņu izmēru 3 reizes, ņemot 3 reizes īsāku kolonnu un palielinot kustīgas fāzes ātrumu 3 reizes, hromatogrāfiska atdalīšana veikta 9 reizēs ātrāk, nekā HPLC apstākļos, ar tādu pašu izšķirtspēju [38]. Šī iemesla dēļ UPLC analīzei izmanto īsas, ar maza izmēra daļiņām piepildītas kolonnas, lai paātrinātu atdalīšanu un uzlabotu efektivitāti.



1.5. att. Van Demtera līknes, sorbenta daļiņu diametra ietekme uz teorētiskā šķīvja augstumu

### 1.3. Augstas izšķirtspējas Orbitrap masspektrometrija

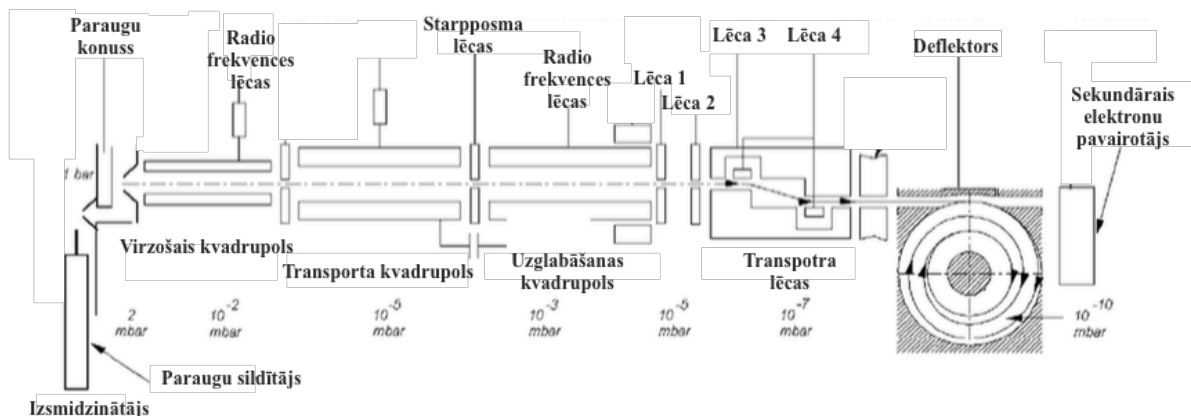
Bez iekriekš apskatītām hromatogrāfiskajām metodēm pēdējo piecpadmit gadu laikā attīstās vēl viena instrumentālā metode, kas dod iespēju veikt vienlaicīgu daudzkomponentu analīzi – augstas izšķirtspējas masspektrometrija (HRMS). Metodes strauja attīstība galvenokārt ir saistīta ar tās jutību, specifiskumu un dažāda veida analizatoru pieejamību. HRMS metodi ir iespējams apvienot ar šķīdumu vai gāzu hromatogrāfiju, kā arī izmantot tiešās infūzijas režīmā. Tiešās infūzijas pieejas novitāte ir saistīta ar iespēju panākt maisījuma komponentu uzticamu strukturālu profilēšanu īsā laikā. Tiešās infūzijas HRMS ir ātra un precīza metode dažādu vielu identificēšanai un kvantificēšanai kompleksos paraugos, tās galvenās priekšrocības ir neliels parauga daudzums un īss analīzes laiks (dažas minūtes uz vienu analīzi) [41-43]. Vēl viena tiešās infūzijas priekšrocība, salīdzinot ar HPLC metodēm, ir stipri hidrofilu un hidrofobu savienojumu identificēšana un kvantificēšana, kas parasti nav iespējama, izmantojot konvencionālu apgrieztās fāzes C18 hromatogrāfiju [44].

Tiešās infūzijas režīma pielietošanai ir instrumentāli ierobežojumi – zemas izšķirtspējas masspektrometri nenodrošina izvairīšanos no matricas efektiem, kas var radīt jonu signālu nomākšanu vai pastiprināšanu. Turklāt zemas izšķirtspējas masspektrometri neļauj izšķirt izobāros savienojumus (ar vienādām nominālām masām, bet atšķirīgām precīzām masām) [41, 42, 45]. HRMS platformas spēj pārvarēt vai vismaz samazināt tos ierobežojumus. HRMS instrumenti, tādi kā FTICR un Orbitrap, savienojumiem ar mazu molekulāro masu (zem 1000 Da) nodrošina ļoti precīzus masas mērījumus ar ppm-kārtas precizitāti [45, 46]. Tomēr FTICR instrumenti nav populāri specīga un dārga magnētiskā lauka nepieciešamības un laikietilpīga optimizācijas procesa dēļ [45].

Orbitrap tiek uzskaitīts par vienu no modernākiem masas analizatoriem. Pirmo Orbitrap masspektrometru kompānija *Thermo Fisher Scientific* izlaidīja tirgū tikai 2005. gadā. Tajā ir apvienoti vairāki vecāko metožu principi: Kingstona jonu slazds, Paula jonu slazds un FTICR [47]. Pēdējo desmit gadu laikā masspektrometri, kuru pamatā ir Orbitrap analizators, nepārtraukti uzlabojas, un to spējas paplašinās. Mūsdienās ir pieejami vairāku veidu Orbitrap detektori, kas atšķiras ar jonu šķelšanas tehnoloģijām (CID, HCD), kā arī jonu šķirošanas soļiem, izmantojot tandēma kvadrupolu. Visus Orbitrap masspektrometrus var iedalīt trīs grupās: LTQ Orbitrap, Q Exactive/Exactive Orbitrap un Orbitrap Fusion. Galvenie Orbitrap masspektrometra elementi ir parādīti 1.6. attēlā.

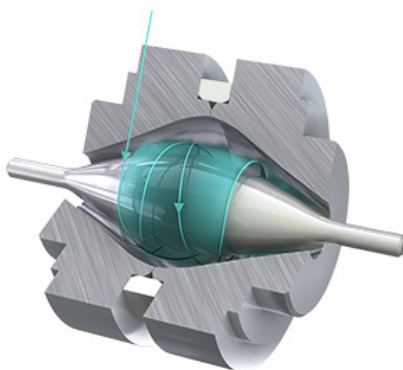
Orbitrap iekārtās izmanto divus jonizācijas avotu veidus: atmosfēras spiediena ķīmiskā jonizācija vai elektroizsmidzināšanas jonizācija [48, 49]. Pēc jonizācijas procesa caur radio frekvences lēcām notiek jonu pārnese uz transporta kvadrupolu. Radio frekvences lēcas un transporta kvadrupols pārvieto jonus ar dažādām masas/lādiņa ( $m/z$ ) attiecībām no atmosfēras

spiediena apstākļiem uz augsta vakuuma zonu [47, 49]. Transporta kvadrupols pilda arī masu filtra funkciju, ar to palīdzību iespējams izvēlēties konkrētu  $m/z$  attiecību vai noteiktu  $m/z$  diapazonu [47].



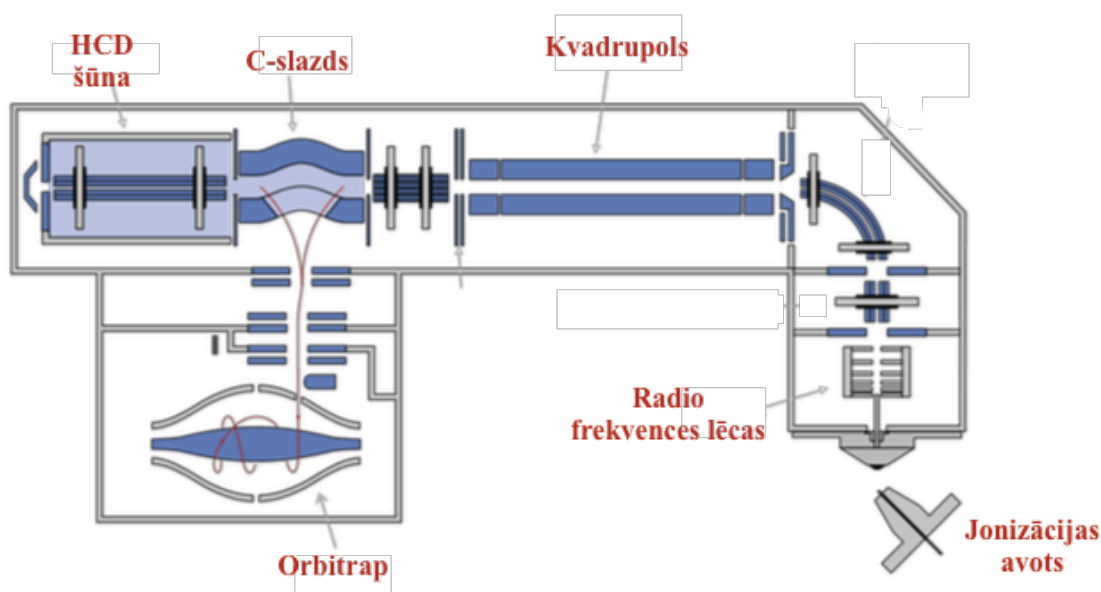
1.6. att. Eksperimentālā Orbitrap masspektrometra principiāla shēma

Uzglabāšanas kvadrupolā jonu pārvietošanas ātrums samazinās sadursmes ar inertu gāzi un elektrisko lauku ietekmes dēļ. Šajā posmā joni tiek uzkrāti un fokusēti izejas virzienā līdz Orbitrap analīzei. Pēc 1. lēcas impulsvēda atvēršanas, telpiski fokusēti jonu kūli īsā laika periodā (100 – 200 ns) tiek stumti uz Orbitrap masas analizatoru. Joni tiek paātrināti ar novirzes lēcu sistēmu un pēc tam ievadīti Orbitrap analizatorā. Joni ar lielāku  $m/z$  attiecību sasniedz Orbitrap vēlāk, nekā joni ar mazāku  $m/z$  attiecību [47, 49]. Orbitrap analizators sastāv no iekšējā un ārējā elektrodiem, kas rada elektrisko lauku (1.7. att.). Joni tajā tiek ievadīti ar salīdzinoši lielu ātrumu perpendikulāri iekšējam elektrodam. Ievadīto jonu kūļu ātrums kombinācijā ar pielikto elektrisko lauku izraisa jonu svarstību ap iekšējo elektrodu ar konstantu trajektoriju. Analizatorā iek fiksēta jonu mijiedarbība ar ārējo elektrodu, kas ir atkarīga no aksiālo oscilāciju frekvencēm. Ātrā Furjē transformācija tiek izmantota, lai iegūtu jonu  $m/z$  vērtības ar dažādām oscilāciju frekvences vērtībām un pārvērstu informāciju masspektā [47].



1.7. att. Orbitrap masas analizators

Modernākie Orbitrap masspektrometri, piemēram Q Exactive, ir aprīkoti ar papildus ierīcēm, tādām kā C-slazds un oktopola sadursmju šūna (1.8. att.). C-Slazds ir uzlabots jonu slazds, kuru var salīdzināt ar jau aprakstīto uzglabāšanas kvadrupolu – no oktopola pārvietoti joni C-slazdā tiek bremsēti. Uzglabāšanas kvadrupola gadījumā Orbitrap veikspēja ir ierobežota, jo kvadrupola kapacitāte lielu jonu skaitu uzglabāšanai ir limitēta. C-Slazda kapacitāte, pateicoties speciālai konstrukcijai, ir lielāka, salīdzinot ar kvadrupolu, līdz ar to paaugstinās Orbitrap jonu uzglabāšanas jauda. C-Slazdā joni tiek akumulēti un to enerģijas tiek līdzsvarotās gāzveida slāpekļa atmosfērā. [50]. Turklāt HCD šūna nodrošina efektīvāku jonu fragmentāciju, kuras rezultātā iegūst kvalitatīvāku masspektu.



1.8. att. Q Exactive Orbitrap masspektrometra shēma

Masu izšķirtspēja – iekārtas spēja iegūt atdalītus signālus joniem ar minimālu masu starpību, – ir svarīgs MS parametrs. Orbitrap tehnoloģiju attīstības rezultātā ir radīti masspektrometri, ar kuriem ir iespējams sasniegt masu izšķirtspēju līdz pat 500000 [47, 51]. Augsta precizitāte (zem 5 ppm) tandēmā ar augstu izšķirtspēju samazina iespējamo ķīmisko struktūru skaitu, kas var ietekmēt kvantitatīvu noteikšanu.

#### 1.4. Prasības farmaceutiskā preparāta analīzes metodes validācijai

Mūsdienās analītisko metožu validācija ir stingri pieprasīta procedūra, kas ir nepieciešama zāļu reģistrācijas procesā. Validācijas praktiskā vērtība ir tāda, ka jau izstrādes procesā var identificēt analīzes metodes trūkumus un novērst tos. Validācijas eksperimentu rezultāti sniedz izpratni par metodoloģiju un parāda, cik svarīgi ir stingri ievērot metodes parametrus. Izmantojot analīzei validēto metodi, būtiski samazinās varbūtība iegūt kļūdainus rezultātus. Prasības un rekomendācijas analītisko metožu validācijai farmaceutiskajiem preparātiem ir aprakstītas vairākos normatīvajos dokumentos, svarīgākie no tiem ir:

- ICH Q2(R1) – Analītisko procedūru validācija: teksts un metodoloģija;
- EudraLex:
  - 3AQ13A – Analītisko procedūru validācija: metodoloģija;
  - 3AQ14A – Analītisko procedūru validācija: definīcijas un terminoloģija;
- USP/Pamatinformācija <1225> – Farmakopejas metožu validācija;
- FDA vadlīnijas rūpniecībai:
  - Hromatogrāfisko metožu validācija;
  - Analītiskās procedūras un metožu validācija.

No harmonizēšanas viedokļa svarīgāka ir ICH vadlīnija [41], kas ir obligāta ASV, Japānā un Eiropas Savienības valstīs.

Katram gatavo zāļu formu analīzes veidam (pamatvielas saturs, piemaisījumu daudzums, identitātes pierādīšana) ir atšķirīgas prasības un parametri validācijai. Pamatvielas satura noteikšanai pieņemts pārbaudīt zemāk aplūkotos parametrus [41].

**Selektivitāte.** Raksturo metodes spēju noteikt analizējamo vielu citu gatavās zāļu formas sastāvdaļu klātbūtnē. Analizējamo vielu noteikšanai nedrīkst traucēt placebo (gatavo zāļu formas neaktīvo komponentu un tehnoloģisko piedevu maisījums) un šķīdināšanas vides signāli.

Piemēram, šķidrums hromatogrāfijas gadījumā selektivitāti var panākt, izvēloties kolonnu ar piemērotu sorbentu un ģeometriju, kā arī regulējot hromatogrāfiskos apstākļus, tādus kā kustīgās fāzes sastāvs un pH, gradienta slīpums, kolonnas temperatūra un detektēšanas viļņa garums [42].

**Linearitāte.** Raksturo sakarību starp detektora signāla intensitāti un analīzējamās vielas koncentrāciju paraugā noteiktā intervāla robežās. Linearitātes pierādījumam atļauts izmantot standartvielu šķīdumus, kas ir pagatavoti, atšķaidot standarta pamatšķīdumu līdz vajadzīgām koncentrācijām, vai katras koncentrācijas šķīdumu pagatavošanai izmantojot atsevišķus iesvarus. Pagatavo vismaz 5 standartšķīdumus (parasti izmanto 80 %, 90 %, 100 %, 110 % un

120 % no darba koncentrācijas. Linearitātes pārbaudē iegūtus rezultātus attēlo grafiski kā signāla intensitātes funkciju no analizējama standartšķīduma koncentrācijas un veic statistisko novērtējumu. Statistiskai datu apstrādei visbiežāk izmanto mazāko kvadrātu metodi, ar to aprēķina taisnes vienādojumu (virziena koeficientu un brīvo locekli), korelācijas koeficientu un noviržu kvadrātu summu. Atbilstoši Eiropas Farmakopejas prasībām korelācijas koeficientam jābūt ne mazākam par 0,99.

**Precizitāte.** Demonstrē sakarības pakāpi starp neatkatīgiem rezultātiem, kuri ir iegūti pie noteiktiem nosacījumiem. Precizitāti ietekmē tikai gadījuma kļūdas. Atbilstoši ICH vadlīniju prasībām novērtēšanu veic trijos līmeņos:

- **Atkārtojamība.** Novērtē viens analītiķis, izmantojot vienu iekārtu, tos pašus reaģentus un šķīdumus, veicot vismaz sešas noteikšanas standartšķīdumam 100 % koncentrācijā.
- **Laboratorijas precizitāte.** Atkarīga no metodes izmantošanas apstākļiem: laiks, analītiķis, iekārta utt. Nav nepieciešams pārbaudīt katru faktoru atsevišķi, bet ieteicams tos novērtēt, veicot piemērotu eksperimentu.
- **Atgūstamība.** Ir nepieciešama, ja ir jāveic analītiskās metodes standartizācija. Novērtē tādā pašā veidā kā atkārtojamību un laboratorijas precizitāti, bet izmantojot starplaboratoriju rezultātus. Dod iespēju veikt metodes pārnesi uz citu laboratoriju bez atsevišķas procedūras.

Katram precizitātes veidam ir jāizvērtē standartnovirze, relatīvā standartnovirze un ticamības intervāls.

**Pareizība.** Parāda rezultātu atbilstību reālam analizējamam vielas saturam paraugā visā darba koncentrāciju diapazonā. Analītiskās metodes pareizība atspoguļo sistemātiskās kļūdas esamību vai neesamību. To novērtē, salīdzinot matricai pieliktos un atgūtos analīzējamās vielas daudzumus. Pareizības pārbaudei gatavo 9 standartšķīdumus trīs koncentrāciju līmeņos, kas aptver visu darba diapazonu (piemēram 80 %, 100 % un 120 % no darba koncentrācijas).

**Robustums.** Raksturo metodes stabilitāti pret nelielām, bet apzinātām novirzēm no metodikā aprakstītajiem eksperimenta nosacījumiem un metodes izmantošanas piemērotību rutīnas darbam. Vērtējot metodes robustumu, analizē informāciju, kas ir iegūta metodes izstrādes laikā, un pievērš uzmanību apstākļiem, kas varētu ietekmēt rezultātus. Robustuma faktori katrai metodei ir specifiski, piemēram, šķīdumu hromatogrāfijas gadījumā tie var būt:

- kustīgās fāzes sastāvs;
- kustīgās fāzes pH;
- dažādas kolonnas (piemēram, atšķirīgas sorbentu sērijas);
- kolonnas temperatūra;
- kustīgās fāzes plūsmas ātrums.

**Sistēmas funkcionēšanas tests** ir hromatogrāfisko analīzes metožu neatņemama daļa, kuru izmanto, lai pierādītu, ka hromatogrāfiskās sistēmas darbības atkārtojamība un izšķirtspēja ir pietiekamas precīzu rezultātu iegūšanai. Tests balstās uz koncepcijas, ka iekārtas, elektronika, analītiskā metode un paraugi veido veselu nedalāmu sistēmu, kuru tā kopā arī ir jāvērtē.

## 2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

### 2.1. Izmantotās iekārtas un reaģenti

#### 2.1.1. Reaģenti

- metanols, tīrs hromatogrāfijai (*Sigma-Aldrich*);
- dejonizēts ūdens, attīrīts ar Milli-Q iekārtu,  $R > 18 \Omega \cdot \text{cm}$ ;
- nātrija heptānsulfonāts (*Merck*);
- sālsskābe, ~37 % (*Stanlab*);
- *orto*-fosforskābe, 85 % (*Acros*);
- *preparāta A* placebo maisījums, izgatavots, ievērojot ražotāja tehnoloģiskos norādījumus;
- *preparāta B* placebo maisījums, izgatavots, ievērojot ražotāja tehnoloģiskos norādījumus.

#### 2.1.2. Standartvielas

- CaD, tīrība 97,1 % (*Merz*);
- CYS, tīrība 99,4 % (*Merz*);
- ABA, tīrība 99,7 % (*Fisher Chemical*);
- THI, tīrība 99,7 % (*Merz*);
- NIC, tīrība 99,9 % (*Sigma-Aldrich*);
- PYR, tīrība 99,6 % (*Acros*);
- RIB, tīrība 98,7 % (*Acros*);
- ASC, tīrība 100,0 % (*Sigma-Aldrich*);

#### 2.1.3. Izmantotā aparatūra, programmatūra un trauki

- augstas izšķirtspējas masspektrometrs (*Thermo Scientific Q Exactive*), kas savienots ar UHPLC sistēmu (*Thermo Accela UHPLC*);
- ultra-efektīvā šķidrumu hromatogrāfiskā sistēma ar UV-VIS detektoru (*Waters Acquity UPLC*);
- analītiskie svāri, sveršanas precizitāte  $\pm 0,01 \text{ mg}$  (*Satorius BP 211 D*);
- pH-metrs, mērījumu precizitāte  $\pm 0,01$  (*WTW pH 540 GLP*);
- termokratītājs (*INFORS AG CH-4103*);
- membrānfiltri,  $0,2 \mu\text{m}$  (*Whatman, Spartan RC*);

- mērkolbas, 100,0 mL, 250,0 mL, 1000,0 mL, 2000,0 mL;
- Mora pipetes, 100,0 mL;
- automātiskā pipete ar maināmo tilpumu, 200-1000 µL (*Gilson*);
- hromatogrāfiskās pudelītes ar šķeltiem korķiem, 2 mL;
- datu apstrādes programmas *Xcalibur 3.0*, *Empower 2* un *Microsoft Excel 2015*.

## 2.2. Šķidrumu hromatogrāfijas apstākļi

- kolonna: 100 x 2,1 mm, C18, 1,8 µm (*Acquity UPLC HSS C18 SB, Waters*);
- detektēšana: 210 nm;
- paraugu uzglabāšanas temperatūra: 4 °C;
- kolonnas temperatūra: 30 °C;
- plūsmas ātrums: 0,5 mL/min.;
- gradients:

Laiks, min.	A, %	B, %
0	100	0
0,45	100	0
1,35	60	40
1,70	60	40
2,35	100	0
3,00	5	95
3,70	5	95
4,50	100	0
7,00	100	0

- injekcijas tilpums: 1 µL;
- analīzes laiks: 7 min.

## 2.3. Tiešās infūzijas augstas izšķirtspējas masspektrometrijas apstākļi

- paraugu ievadīšana masspektrometrā realizēta ar hromatogrāfa injekcijas sistēmas palīdzību, bet neizmantojot hromatogrāfisko kolonnu:
  - kustīga fāze: ūdens:metanols (1:1);
  - plūsmas ātrums: 250 µL/min.;
  - injekcijas tilpums: 5 µL;
  - paraugu nodaļas temperatūra: 4 °C;
- jonizācijas avots: apsildāms elektroizsmidzināšanas (HESI-II):

- *ārēja gāze*: 46 pieņemtas vienības;
- palīggāzes plūsmas ātrums: 11 pieņemtas vienības;
- izsmidzinātāja spriegums: 3,5/-2,5 kV (pozitīvs/negatīvs);
- kapilārā temperatūra: 253 °C;
- S-lēcu līmenis: 50 pieņemtas vienības;
- palīggāzes temperatūra: 406 °C;
- Orbitrap detektors:
  - jonizācija: pozitīva/negatīva;
  - izšķirtspēja: 17500;
  - AGC:  $5 \cdot 10^6$ ;
  - IT: 100;
  - masu diapazons: 100 – 500.

## 2.4. Paraugu raksturojums

Analīzei izmantoja divus vitamīnu saturošus preparātus:

- *preparāts A*, kapsulas ar CYS (20 mg/kapsulā), CaD (60 mg/kapsulā), ABA (20 mg/kapsulā) un THI (60 mg/kapsulā);
- *preparāts B*, dražejas ar CYS (30 mg/dražejā), CaD (3 mg/dražejā), NIC (10 mg/dražejā), PYR (1,2 mg/dražejā), THI (1,2 mg/dražejā), RIB (1,6 mg/dražejā).

Kalibrēšanas un validācijas paraugu pagatavošanai izmantoja ASC, CYS, CaD, NIC, ABA, PYR, THI un RIB standartvielas, kā arī *preparāta A* un *B* placebo paraugus. Placebo paraugus pagatavoja laboratorijas apstākļos, ievērojot ražotāja tehnoloģiskos norādījumus.

## 2.5. Šķīdumu pagatavošana

### Kustīgā fāze A

Mērkolbā (2000,0 mL) iesvēra 680 mg nātrija heptānsulfonāta un izšķīdināja apmēram 500 mL ūdens. Pievienoja 100,0 mL metanola, 400  $\mu$ L 85 % *orto*-fosforskābes, samaisīja un piepildīja kolbu ar ūdeni līdz atzīmei. Pievienoja 85 % *orto*-fosforskābi līdz šķīduma pH ir 2,15.

## Kustīgā fāze B

Mērkolbā (1000,0 mL) iesvēra 340 mg nātrija heptānsulfonāta un izšķīdināja 100 mL ūdens. Pievienoja ~600 mL metanola, samaisīja, ļava atzist un piepildīja kolbu ar metanolu līdz atzīmei. Pievienoja 85 % *orto*-fosforskābi līdz šķīduma pH ir 2,60.

### 0,1 N sālskābes šķīdums

1000 mL ūdens pievienoja 8,4 mL 37 % sālskābes.

## 2.6. Paraugu, standartu un placebo šķīdumu pagatavošana

Iesvēra noteiktu paraugu, standartvielu vai placebo daudzumu 250,0 mL tumšā stikla mērkolbā un pievienoja ~100 mL 0,1 N sālskābes šķīduma. Šķīdumu apstrādāja termokratītājā (40 min., 37 °C, 200 apgr./min.). Tad atdzesēja līdz istabas temperatūrai un piepildīja kolbu ar 0,1 N sālskābi līdz atzīmei. Pirms analīzes filtrēja caur membrānfiltru (pirmo mL neizmantoja analīzei).

## 2.7. Selektivitātes pārbaude

Metodes selektivitāti pārbaudīja, salīdzinot savā starpā zemāk minēto šķīdumu hromatogrammas. Novērtēja analītu smaiļu atdalīšanas kvalitāti, kā arī šķīdinošās vides un placebo maisījuma traucējošo signālu neesamību.

### Šķīdinošā vide

Pagatavoja 0,1 N sālskābes šķīdumu (skat. 2.3. nodaļu).

### Ūdenī šķīstošo komponentu individuālie standartšķīdumi

Pagatavoja katra komponenta individuālo standartšķīdumu. Standartvielu iesvari un iegūtas koncentrācijas apkopotas 2.1. tabulā. Šķīduma pagatavošana aprakstīta 2.6. nodaļā.

2.1. tabula

Komponentu iesvari un standartšķīdumu koncentrācijas

Paraugs	ASC	CYS	CaD	NIC	ABA	PYR	THI	RIB
Iesvars, mg	375	150	30	50	10	6	30	8
Koncentrācija, mg/mL	1,500	0,600	0,120	0,200	0,040	0,024	0,120	0,032

### **Preparāta A placebo šķīdums**

Iesvēra 174 mg *preparāta A* placebo 250,0 mL mērkolbā, pagatavoja šķīdumu atbilstoši 2.6. nodaļā aprakstītajai metodikai.

### **Preparāta B placebo šķīdums**

Iesvēra 3000 mg *preparāta B* placebo 250,0 mL mērkolbā, pagatavoja šķīdumu atbilstoši 2.6. nodaļā aprakstītajai metodikai.

### **Ūdenī šķīstošo komponentu maisījuma standartšķīdums**

Pagatavoja visu komponentu kopējo standartšķīdumu. Standartvielu iesvari un iegūtas koncentrācijas apkopotas 2.1. tabulā. Šķīduma pagatavošana aprakstīta 2.6. nodaļā.

### **Preparāta A ūdenī šķīstošo komponentu un placebo šķīdums**

Iesvēra 174 mg *preparāta A* placebo, 10 mg CYS, 30 mg CaD, 10 mg ABA un 30 mg THI 250,0 mL mērkolbā, pagatavoja šķīdumu atbilstoši 2.6. nodaļā aprakstītajai metodikai.

### **Preparāta B ūdenī šķīstošo komponentu un placebo šķīdums**

Iesvēra 3000 mg *preparāta B* placebo, 375 mg ASC, 150 mg CYS, 15 mg CaD, 50 mg NIC, 6 mg PYR, 6 mg THI un 8 mg RIB 250 mL tumša stikla mērkolbā, pagatavoja šķīdumu atbilstoši 2.6. nodaļā aprakstītajai metodikai.

## **2.8. Šķīdumu stabilitātes pārbaude**

Pagatavoja visu interesējošo vielu saturošu standartšķīdumu. Standartvielu iesvari un iegūtas koncentrācijas apkopotas 2.2. tabulā. Šķīduma pagatavošana aprakstīta 2.6. nodaļā.

2.2. tabula

**Komponentu iesvari un standartšķīdumu koncentrācijas**

<b>Paraugs</b>	<b>ASC</b>	<b>CYS</b>	<b>CaD</b>	<b>NIC</b>	<b>ABA</b>	<b>PYR</b>	<b>THI</b>	<b>RIB</b>
Iesvars, mg	375	94	24	50	10	6	21	8
Koncentrācija, mg/mL	1,500	0,376	0,096	0,200	0,040	0,024	0,084	0,032

Svaigi pagatavotu standartšķīdumu nekavējoties ievadīja hromatogrāfiskajā sistēmā. Stabilitāti pārbaudīja 24 stundu laikā, veicot parauga analīzi reizi 15 minūtēs. Katrai analīzei izmantoja paraugu no jaunas hromatogrāfiskās pudelītes (kopā 96 paraugi). Pārbaudes laikā paraugi tika uzglabāti automātiskajā paraugu ņemšanas ierīcē 4 °C temperatūrā.

Šajā un visos turpmākajos eksperimentos iegūto rezultātu precizitātes nodrošināšanai hromatogrammu integrēšanu veica automātiskajā režīmā, izmantojot *Empower 2* programmu. Papildus aprēķinus veica *Microsoft Excel 2015* programmā. Stabilitātes novērtēšanai katram savienojumam grafiski attēloja smaiļu laukumu atkarību no laika.

## **2.9. Linearitātes, precizitātes un pareizības pārbaude**

Linearitātes, precizitātes un pareizības pārbaudi veica vienā piegājienā, izmantojot vienu paraugu sekvenci. Lineāritāti pārbaudīja divām kalibrēšanas šķīdumu sērijām: bez placebo un *preparāta B* placebo klātbūtnē. *Preparāta A* placebo ietekme netika konstatēta (skat. 3.2.1. nodaļu).

### **2.9.1. Linearitātes pārbaude**

Linearitātes pārbaudei pagatavoja 5 standartšķīdumus dažādos koncentrācijas līmeņos:

- komponentiem, kas ir unikāli katram preparātam (ASC, NIC, ABA, PYR, RIB) – 80 %, 90 %, 100 %, 110 % un 120 % koncentrācijās;
- komponentiem, kas ir kopīgie abiem preparātiem (CYS, CaD un THI), par zemāku robežu ņema 80 % no preparāta ar mazāku analīta saturu, par augstāku robežu – 120 % no preparāta ar lielāku analīta saturu. Pārējie koncentrāciju punkti tika aprēķināti, sadalot iegūto intervālu vienādās daļās.

1. Kalibrēšanas šķīdumu sērija: iesvēra noteiktus standartvielu daudzumus (2.3. tabula) piecās 250,0 mL tumšā stikla mērkolbās un pievienoja ~100 mL 0,1 N sālskābes šķīduma. Šķīdumu apstrādāja termokratītājā (40 min., 37 °C, 200 apgr./min.). Tad atdzesēja līdz istabas temperatūrai un piepildīja kolbas ar 0,1 N sālskābi līdz atzīmei.

2. Kalibrēšanas šķīdumu sērija: piecās 100,0 mL tumšā stikla mērkolbās iesvēra pa 1200 mg *preparāta B* placebo, katru kolbu piepildīja līdz atzīmei ar jau pagatavotiem references šķīdumiem. Tad visas 10 kolbas, lai divu references šķīdumu sēriju pagatavošanas apstākļi neatšķirtos, apstrādāja termokratītājā (20 min., 37 °C, 200 apgr./min.), atdzesēja un pirms analīzes filtrēja caur membrānfiltru (pirmo mL neizmantoja analīzei).

## Komponentu iesvari linearitātes pārbaudei

Savienojums	Iesvari, mg							
	ASC	CYS	CaD	NIC	ABA	PYR	THI	RIB
1. Kalibrēšanas šķīdums	298,24	15,32	11,46	39,34	15,53	4,41	4,73	6,03
2. Kalibrēšanas šķīdums	337,70	57,47	27,13	45,10	17,95	5,37	20,44	7,61
3. Kalibrēšanas šķīdums	374,92	97,82	42,23	52,01	20,82	6,07	37,87	8,06
4. Kalibrēšanas šķīdums	425,66	137,45	56,97	58,76	22,75	6,70	55,58	9,23
5. Kalibrēšanas šķīdums	453,96	182,02	74,15	61,03	24,25	8,13	72,97	10,20

Kalibrēšanas šķīdumus 1. un 5. injicēja hromatogrāfiskajā sistēmā sešas reizes, bet 2., 3. un 4. – trīs reizes.

Standartvielu tīrības korekciju veica saskaņā ar 2.1. vienādojumu:

$$m_{kor} = \frac{m \cdot P}{100} \quad (2.1.),$$

kur

$m_{kor}$  – koriģēts standartvielas iesvars kalibrēšanas šķīdumā, mg;

$m$  – standartvielas iesvars, mg;

$P$  – standartvielas tīrība, %.

Komponentu koncentrācijas kalibrēšanas paraugos aprēķināja saskaņā ar 2.2. vienādojumu:

$$\gamma = \frac{m_{kor}}{2,5} \quad (2.2.),$$

kur

$\gamma$  – savienojuma koncentrācija kalibrēšanas šķīdumā, mg/100 mL;

2,5 – atšķaidīšanas koeficients.

Aprēķināja kalibrēšanas taisņu vienādojumus:

$$y = Bx + A \quad (2.3.),$$

kur

$y$  – savienojuma smailes laukums;

$x$  – savienojuma koncentrācija, mg/100 mL;

$B$  – virziena koeficients;

$A$  – brīvais loceklis.

Kalibrēšanas taisnes korelācijas koeficientu aprēķināja, izmantojot 2.4. vienādojumu:

$$R = \frac{\sum(x - x_{vid})(y - y_{vid})}{\sqrt{\sum(x - x_{vid})^2 \sum(y - y_{vid})^2}} \quad (2.4.),$$

kur

R – korelācijas koeficients.

Aprēķinātās komponentu koncentrācijas kalibrēšanas paraugos:

$$\gamma_{apr} = \frac{\text{Smailes laukums} - A}{B} \quad (2.5.)$$

$\gamma_{apr}$  – aprēķināta koncentrācija

Relatīvā kļūda ( $\Delta\gamma$ , %) aprēķināta, izmantojot 2.6. vienādojumu:

$$\Delta\gamma = (\gamma_{apr} - \gamma) / \gamma \quad (2.6.)$$

Izmantojot iegūtos rezultātus, ar *Empower 2* programmas palīdzību katram savienojumam konstruēja divu sēriju kalibrēšanas taisnes.

### 2.9.2. Precizitātes pārbaude

Precizitātes pārbaudei pagatavoja sešus *preparāta A* un sešus *preparāta B* šķīdumus. Katru šķīdumu injicēja hromatogrāfiskajā sistēmā trīs reizes.

#### *Preparāta A šķīdums*

Atvēra 20 kapsulas, apvienoja to saturu, nosvēra un aprēķināja vienas kapsulas satura vidējo masu. Kapsulu saturu homogenizēja piestā. Iesvēra ~168 mg (precīzi iesvari 2.4. tabulā) 100,0 mL mērkolbā un pagatavoja šķīdumus atbilstoši 2.6. nodaļā aprakstītajai metodikai.

2.4. tabula

#### *Preparāta A* iesvari šķīdumu pagatavošanai precizitātes pārbaudei

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Kapsulu satura iesvars, mg	168,22	168,65	168,86	168,86	168,32	168,26
Kapsulas satura vidējā masa, mg	348,13					

### **Preparāta B šķīdums**

Nosvēra 20 dražejas, aprēķināja vienas dražejas vidējo masu. Samaļa 20 dražejas laboratorijas dzirnaviņās. Iegūto pulveri un dražeju apvalka nesasmalcinātas atliekas pārnesa pietā un vēlreiz homogenizēja. Iesvēra ~1350 mg (precīzi iesvari 2.5. tabulā) iegūta pulvera 100,0 mL tumšā stikla mērkolbā un pagatavoja šķīdumus atbilstoši 2.4. nodaļā aprakstītai metodikai.

2.5. tabula

#### **Preparāta B iesvari šķīdumu pagatavošanai precizitātes pārbaudei**

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Dražeju iesvars, mg	1351,08	1351,71	1351,43	1351,24	1351,25	1351,3
Dražejas vidējā masa, mg	669,59					

Savienojumu saturu vienā kapsulā/dražejā aprēķināja atbilstoši 2.7. vienādojumam:

$$C = \frac{(y - A)m_{\text{vid}}}{BW} \quad (2.7.),$$

kur

C – savienojuma saturs, mg/kapsulā (dražejā);

$m_{\text{vid}}$  – vienas kapsulas satura (dražeja) vidējā masa, mg

W – kapsulu satura (dražeju) iesvars, mg.

Standartnovirzi aprēķināja saskaņā ar 2.8. vienādojumu:

$$S_n = \sqrt{\frac{\sum(C - C_{\text{vid}})^2}{(n - 1)}} \quad (2.8.),$$

kur

n – mērījumu skaits.

$S_n$  – standartnovirze.

Drošības intervāls (2.9. vienādojums):

$$DI = \frac{S_n \cdot t_{n,p}}{\sqrt{n}} \cdot 100\% \quad (2.9.)$$

kur

DI – drošības intervāls, mg;

$t_{n,p}$  - Stjudenta koeficients, sešiem mērījumiem un pie varbūtības 0,95 ir 2,571.

Relatīvo standartnovirzi aprēķināja, izmantojot 2.10. vienādojumu:

$$S_r = \frac{S_n \cdot 100}{C_{vid}} \quad (2.10.),$$

kur

$S_r$  – relatīvā standartnovirze, %.

### 2.9.3. Pareizības pārbaude

Katra preparāta komponentu kvantitatīvās noteikšanas pareizību pārbaudīja, analizējot šķīdumus, kas ir pagatavoti trīs koncentrācijas līmeņos – 80 %, 100 % un 120 %. Katram koncentrācijas līmenim pagatavoja trīs šķīdumus. Katru šķīdumu injicēja hromatogrāfiskajā sistēmā trīs reizes.

#### *Preparāta A komponentu standartšķīdumu pagatavošana*

Deviņās 250,0 mL mērkolbās iesvēra noteiktus standartvielu daudzumus (2.6. tabula) un pagatavoja šķīdumus atbilstoši 2.6. nodaļā aprakstītajai metodikai.

2.6. tabula

#### *Preparāta A komponentu iesvari (mg) šķīdumu pagatavošanai pareizības pārbaudei*

Kompo -nents	80 % *			100 % *			120 % *		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
<b>CYS</b>	16,00	16,00	16,28	21,18	21,73	20,93	23,90	23,95	24,00
<b>CaD</b>	48,73	48,45	48,70	61,25	60,95	61,25	72,28	70,80	70,45
<b>ABA</b>	17,13	17,13	16,30	20,98	20,68	21,58	23,68	23,80	23,80
<b>THI</b>	49,98	48,98	48,80	59,90	60,63	60,68	71,60	70,85	70,80

\* – procenti no darba koncentrācijas

#### *Preparāta B komponentu standartšķīdumu pagatavošana*

Deviņās 250,0 mL mērkolbās iesvēra noteiktus standartvielu daudzumus (2.7. tabula) un pagatavoja šķīdumus atbilstoši 2.6. nodaļā aprakstītajai metodikai.

**Preparāta B komponentu iesvari šķīdumu pagatavošanai pareizības pārbaudei**

Komponents *	80 % *			100 % *			120 % *		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
ASC	301,75	302,30	300,80	375,85	380,40	374,38	449,18	446,75	447,95
CYS	121,33	121,33	120,48	149,88	150,33	149,18	179,38	179,18	178,68
CaD	12,45	12,20	12,00	16,15	15,28	15,93	18,05	18,20	17,90
NIC	40,43	40,73	41,73	50,50	52,13	50,23	60,00	59,75	59,13
PYR	4,93	4,95	4,83	6,45	6,15	6,13	6,95	6,73	7,08
THI	5,00	5,13	4,80	5,93	6,20	6,13	7,25	7,03	7,00
RIB	7,43	6,95	6,53	8,73	8,65	8,23	9,60	9,60	9,45

\* – procenti no darba koncentrācijas

Savienojumu saturu šķīdumā aprēķināja atbilstoši 2.11. vienādojumam:

$$C_{apr} = \frac{(y - A)}{B} \quad (2.11.);$$

Pareizību (atgūstamību) noteica, salīdzinot aprēķinātas komponentu koncentrācijas šķīdumā ar patiesām koncentrācijām (2.12. vienādojums):

$$A = \frac{C_{apr} \cdot 100}{C_{pat}} \quad (2.12.),$$

kur

A – atgūstamība, %;

C<sub>apr</sub> – aprēķināta komponenta koncentrācija, mg/100 mL;

C<sub>pat</sub> – patiesa komponenta koncentrācija, mg/100 mL.

Standartnovirzi aprēķināja saskaņā ar 2.13. vienādojumu:

$$S_n = \sqrt{\frac{\sum(A - A_{vid})^2}{(n - 1)}} \quad (2.13.).$$

Relatīvo standartnovirzi aprēķināja, izmantojot 2.14. vienādojumu:

$$S_r = \frac{S_n \cdot 100}{A_{vid}} \quad (2.14.).$$

**2.9.4. Robustuma pārbaude**

Katram preparātam robustumu pārbaudīja, veicot 2 eksperimentus:

1. eksperiments: izmantoja citu hromatogrāfu un citu kolonnu ar atšķirīgu sorbenta sēriju;
2. eksperiments: analīzi veica cits analītiķis.

Analīzes gaita aprakstīta 2.9.2. nodaļā.

## 2.10. Augstas izšķirtspējas masspektrometriskā analīze

HRMS metodes izstrādei izmantoja tikai *preparātu B*, tā ūdenī šķīstošus komponentus un koncentrācijas diapazonus. Pārbaudīja metodes selektivitāti, linearitāti un precizitāti:

- selektivitātes pārbaudei pagatavoja *preparāta B* placebo šķīdumu (skat. 2.7. nodaļu);
- linearitātes pārbaudei pagatavoja standartšķīdumu ar 150 % koncentrāciju: iesvēra noteiktus standartvielu daudzumus (2.8. tabula) 250,0 mL tumšā stikla mērkolbā un pievienoja ~100 mL 0,1 N sālskābes šķīduma.

2.8. tabula

### *Preparāta B* komponentu iesvari standartšķīdumu pagatavošanai linearitātes pārbaudei

Komponents	ASC	CYS	CaD	NIC	PYR	THI	RIB
Iesvars, mg	562,59	224,98	26,56	74,95	8,99	8,95	12,07

Šķīdumu apstrādāja termokratītājā (40 min., 37 °C, 200 apgr./min.). Tad atdzesēja līdz istabas temperatūrai un piepildīja kolbas ar 0,1 N sālskābi līdz atzīmei. Pagatavoja 80 %, 90 %, 100 %, 110 % un 120 % šķīdumus, tumšā stikla mērkolbā pievienojot noteiktu daudzumu pagatavota 150 % standartšķīduma, *preparāta B* placebo un piepildīja mērkolbu līdz atzīmei (2.9. tabula).

2.9. tabula

### Kalibrēšanas šķīdumu pagatavošana

Koncentrācijas līmenis	80 %*	90 %*	100 %*	110 %*	120 %*
Mērkolba, mL	30,0	25,0	30,0	30,0	30,0
150 % standartšķīdums, mL	16,0	15,0	20,0	22,0	24,0
Placebo, mg	360	288	360	360	360

\* – procenti no darba koncentrācijas

- precizitātes pārbaudei pagatavoja sešus *preparāta B* šķīdumus atbilstoši 2.9.2. nodaļas aprakstam. *Preparāta B* pulvera iesvari un dražejas vidējā masa atspoguļoti 2.10. tabulā.

**Preparāta B iesvari šķīdumu pagatavošanai precizitātes pārbaudei**

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Dražeju iesvars, mg	1351,30	1351,82	1350,95	1351,65	1351,73	1351,08
Dražejas vidējā masa, mg	669,59					

Pirms HRMS analīzes visus iegūtos šķīdumus atšķaidīja 10 reizes ar dejonizētu ūdeni un pēc tam vēl 2 reizes ar metanolu. Katru paraugu analizēja trīs reizes.

### 3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Darbā izpētīta un apkopota literatūra par ūdenī šķīstošo vitamīnu noteikšanas iespējām, no kā secināts, ka vispiemērotāka metode izvērītājiem darba mērķiem ir šķīdumu hromatogrāfija.

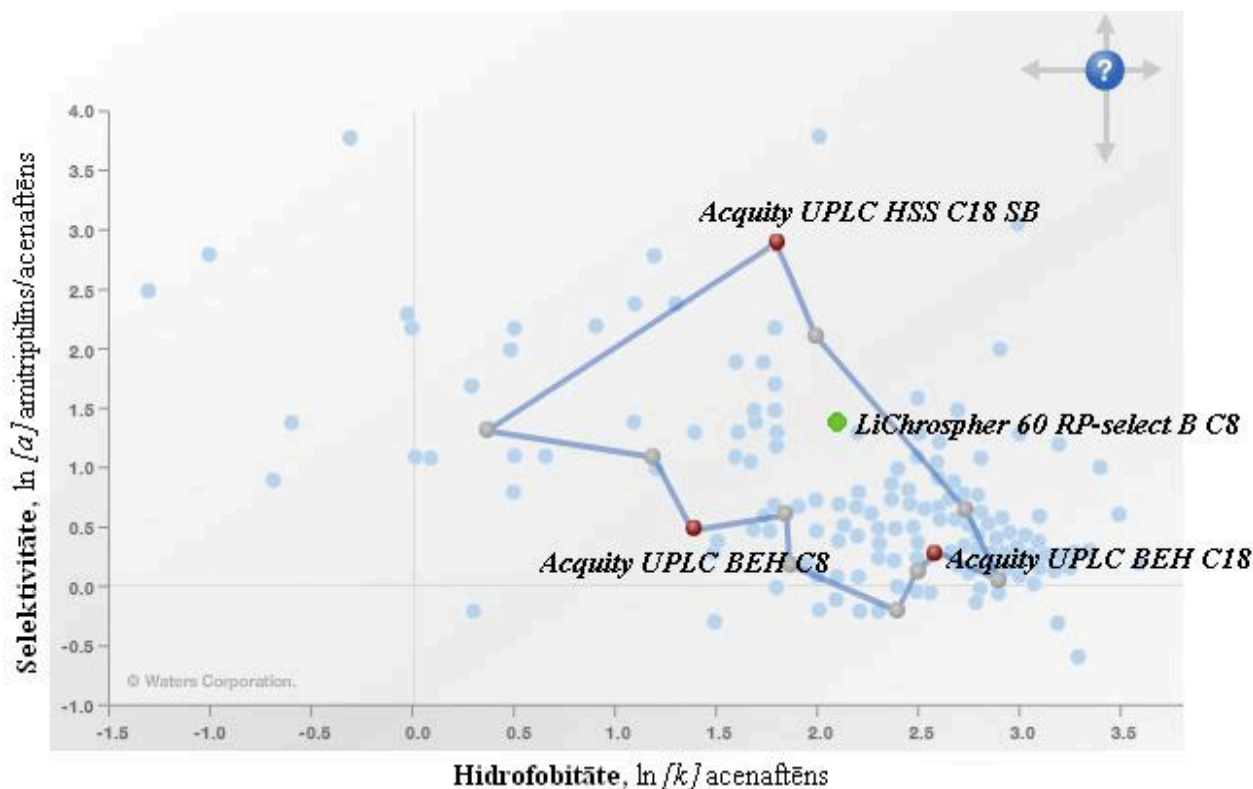
Maģistra darba ietvaros veikta divu farmaceitisko preparātu ūdenī šķīstošo komponentu izvēlētajās hromatogrāfiskās noteikšanas metodes optimizācija un validācija, kā arī tika izstrādāta masspektrometriskā kvantitatīvās noteikšanas metode tiešās infūzijas režīmā.

#### 3.1. Šķīdumu hromatogrāfiskas metodes optimizācija

Balstoties uz kursa darba II [44] iegūtajiem rezultātiem, izvēlēti sākotnējie hromatogrāfijas apstākļi UPLC metodes izstrādei *A* un *B preparātu* ūdenī šķīstošo komponentu noteikšanai.

Vispirms, izmantojot *Waters* apgrieztās fāzes kolonnu selektivitātes diagrammu [45] un, atbilstoši literatūras apskata rezultātiem, fokusējoties tikai uz ar C8 un C18 sorbentu pildītām kolonnām, bija izvēlētas un pārbaudītas trīs UPLC kolonnas (*Acquity UPLC BEH C8*, *Acquity UPLC BEH C18* un *Acquity UPLC HSS C18 SB*), kas selektivitātes un hidrofilītātes ziņā ir tuvākās laboratorijā patlaban izmantotai HPLC kolonnai (*LiChrospher 60 RP-select B C8*) (3.1. att.). Lai nodrošinātu labāku atdalīšanu, izvēlējamies 100 mm garas kolonnas, jo analītu skaits ir liels. Visas kolonnas parādīja atšķirīgu selektivitāti, optimālāku atdalīšanu un smaiļu formu nodrošināja *Acquity UPLC HSS C18 SB* kolonna, kura tika izvēlēta tālākiem eksperimentiem.

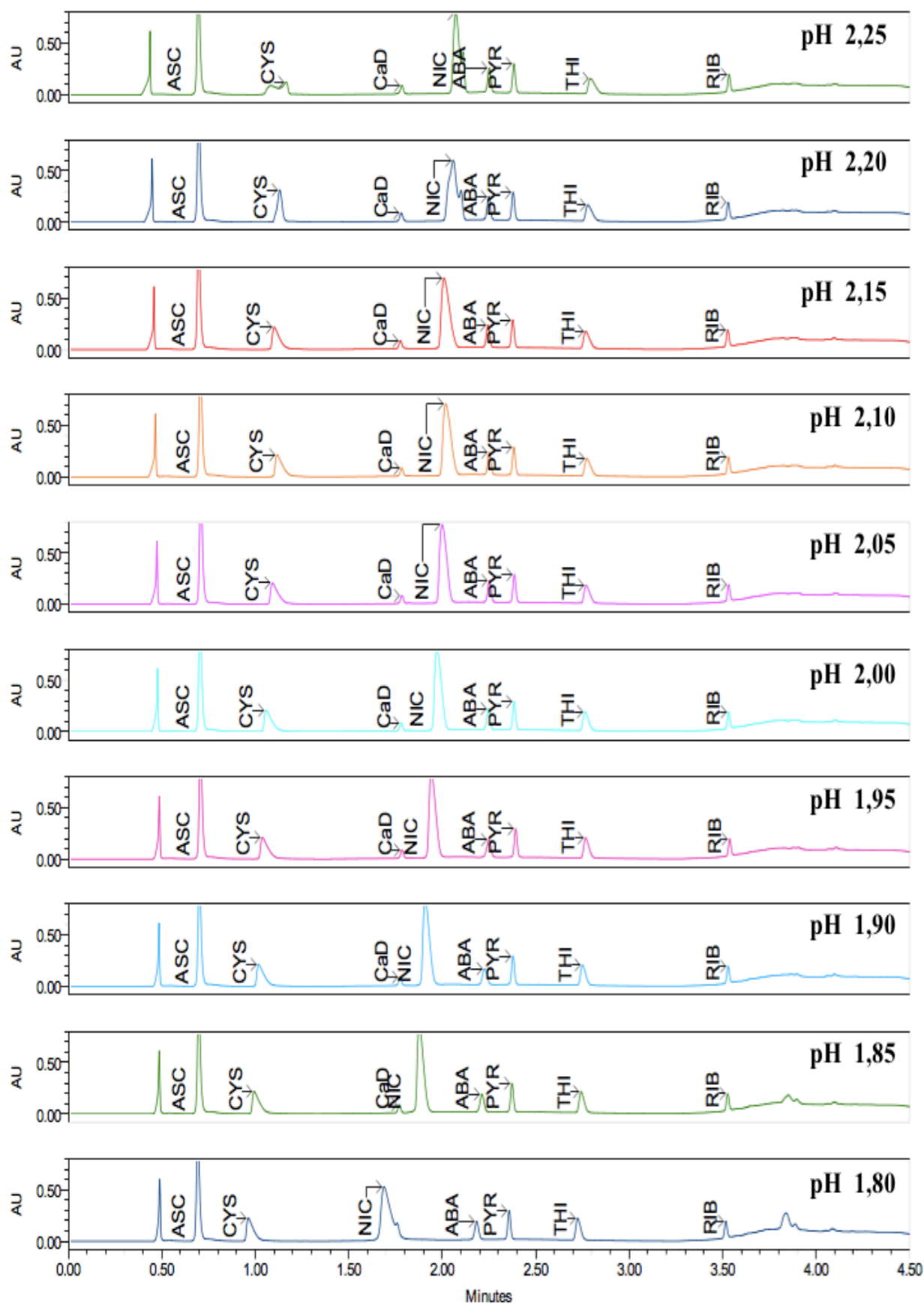
Viens no galvenajiem nosacījumiem efektīvas atdalīšanas sasniegšanai ir optimāla gradienta režīma izvēle. Izmantojot dažādus gradienta profilus, ir iespējams sasniegt labu hromatografisko smaiļu atdalīšanu, kā arī ievērojami samazināt analīzes laiku. Kolonnu pārbaudei gradienta režīms tika pārrēķināts no HPLC apstākļiem uz UPLC, izmantojot *Waters Acquity UPLC Column Calculator* programmu. Pārrēķinātais gradienta režīms nedeva apmierinošus rezultātus, tāpēc piemērotāku apstākļu meklēšanu turpinājām, mainot sākuma izokratiskā posma garumu, gradienta slīpumu un eluēšanas laiku. Konstatēts, ka ir nepieciešama kustīgas fāzes B koncentrācijas paaugstināšana no 40 % līdz 95 % RIB eluēšanas paātrināšanai un kolonnas atbrīvošanai no stipri sorbētām preparātu *A* un *B* palīgvielām. Secināts, ka katras hromatogrāfiskās noteikšanas beigās kolonna ir jālīdzsvaro ar 100 % kustīgo fāzi *A* ap 3,5 minūšu laikā, un ka kolonnas līdzsvarošanas laiks ir kritisks komponentu atdalīšanas atkārtojamībai.



3.1. att. Waters apgrieztās fāzes kolonnu selektivitātes diagramma (ar zilu kontūru apvilktas UPLC kolonnas)

Nolemts noteikšanai izmantots tikai vienu viļņa garumu – 210 nm, jo gan visu analizējamo vielu UV-spektru uzņemšanas (skat. 1. pielikums), gan literatūras dati [57] apliecina, ka šī viļņa garuma izmantošana nodrošina nepieciešamu jutību visu savienojumu noteikšanai.

Lai uzlabotu CYS un NIC smaiļu formas, veikti eksperimenti ar pakāpenisku kustīgās fāzes A pH vērtības pazemināšanu no 2,25 līdz 1,80, pārējiem hromatogrāfiskiem apstākļiem paliekot nemainīgiem (3.2. att.). Izvēloties robežas pH ietekmes pētījumiem, ņemam vērā kolonnas izturības diapazonu (no pH 2 līdz 8) un iepriekš zināmu informāciju par dažu komponentu (CYS un THI) izšķirtspējas pasliktināšanos un smaiļu formu asimetriskumu, izmantojot kustīgo fāzi A ar pH vērtību virs 2,3.



3.2. att. Kustīgas fāzes A pH vērtības maiņas ietekme

Salīdzinot 3.2. attēlā apkopotās hromatogrammas, secināts, ka CYS pie pH vērtības 2,25, NIC pie pH 2,25 un 2,20 eluējās kā dubultsmailes, kā arī konstatēts, ka pazeminoties pH vērtībai, pavājinās CYS un NIC sorbcija, rezultātā samazinās smaīļu aiztures laiki. CYS gadījumā to var izskaidrot ar CYS pastāvēšanu vairākās jonizācijas formās, jo molekulā ir divas karboksil- un divas aminogrupas. NIC dubultsmaile un aiztures laika nobīdes (no 1,70 līdz 2,10 min.) liecina par to, ka skābā vidē NIC pastāv pamatā protonētā formā, bet, pieaugot vides pH vērtībai, protonētā NIC daļa maisījumā samazinās, tāpēc parādās otrā, neprotonētā NIC, smaile. Analizējot iegūto informāciju, secināts, ka optimālākās eluenta A pH robežas apmierinošai komponentu atdalīšanai ir 1,85 – 2,15. Jāatzīmē, ka eluenta pH vērtības paaugstīšanai nedrīkst izmantot nātrija hidroksīda šķīdumu, jo tā ir stipra bāze, kas konkurē ar jonu-pāru reaģentu – notiek jonu-pāru reaģenta darbības nomākšana. Iepējams, eluenta pH vērtības palielināšanai var izmantot vājākas bāzes, piemēram, nātrja formiātu vai acetātu.

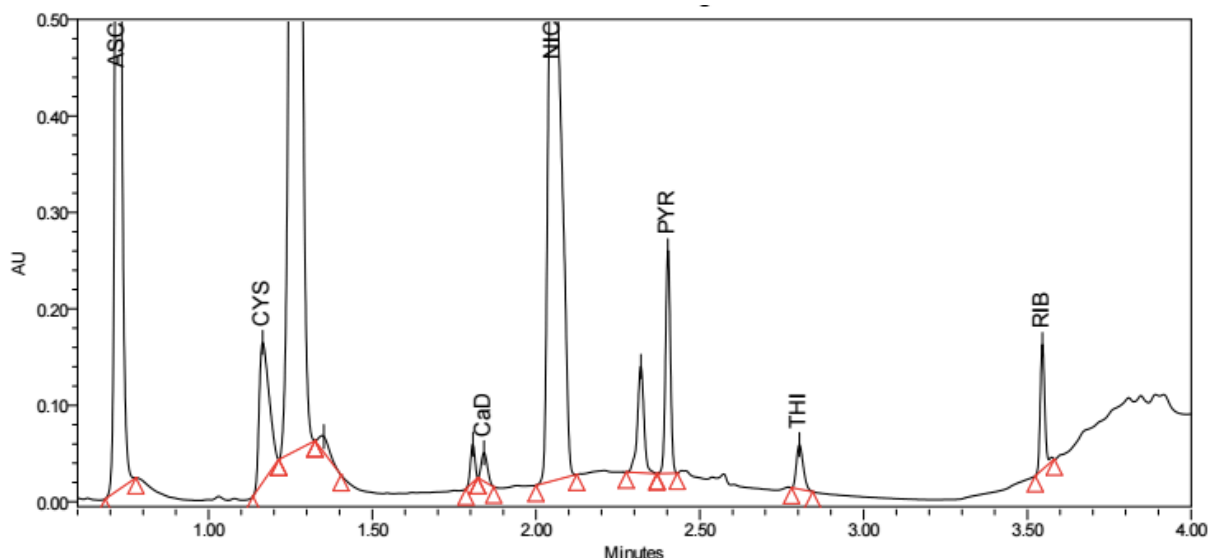
## **3.2. Šķīdumu hromatogrāfiskas metodes validācija**

### **3.2.1. Metodes selektivitātes pārbaude**

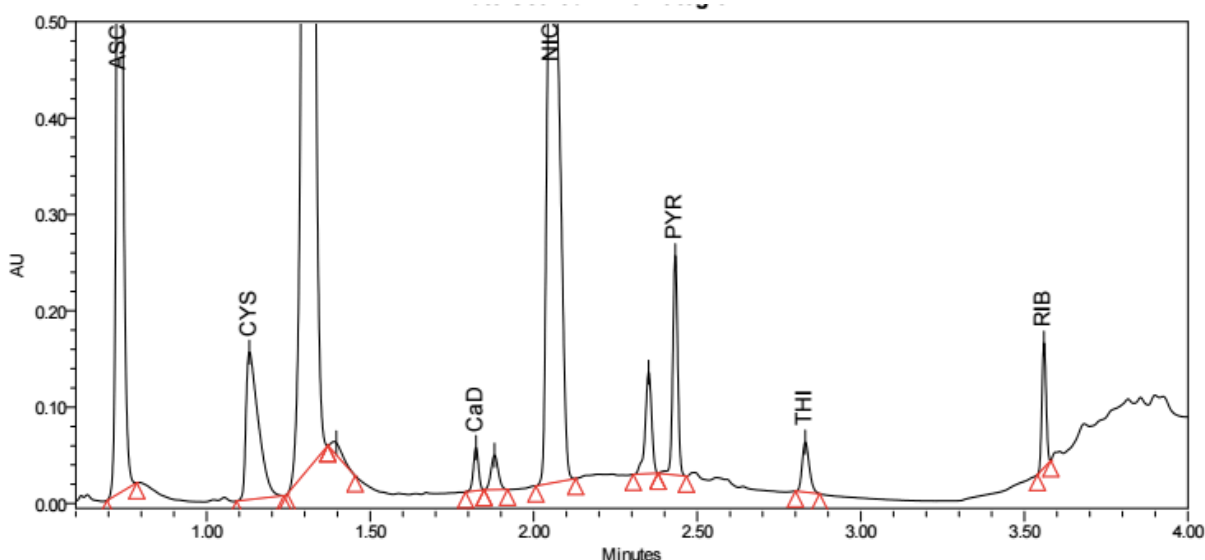
Metodes selektivitāte pārbaudīta vizuāli, salīdzinot sekojošas hromatogrammas (2. pielikums):

- katra komponenta individuālas hromatogrammas;
- visu interesējošo komponentu maisījuma hromatogramma;
- šķīdinošās vides hromatogramma;
- *preparātu A* un *B* placebo hromatogrammas;
- *preparāta A* komponentu un placebo maisījuma hromatogramma;
- *preparāta B* komponentu un placebo maisījuma hromatogramma.

Secināts, ka interesējošo komponentu joslas ir atdalītas, *preparāta A* gadījumā traucējošo signālu interesējošā apgabalā nav, bet *preparāta B* gadījumā konstatētas divas kritiskas vietas: CYS un CaD eluēšanas intervālā detektētas nezināmo placebo komponentu traucējošas smailes. Pēc dažu eksperimentu veikšanas (izokratiska posma garuma, gradienta slīpuma un analīzes laika maiņa) secināts, ka, izmantojot eluentu A ar pH vērtību virs 2,10, izšķiršana starp CYS un CaD ar placebo komponentiem nav pietiekama kvantitatīvai noteikšanai (3.3. att.).



3.3. att. *Preparāta B* hromatogrammas piemērs, izmantojot eluentu A ar pH vērtību 2,15



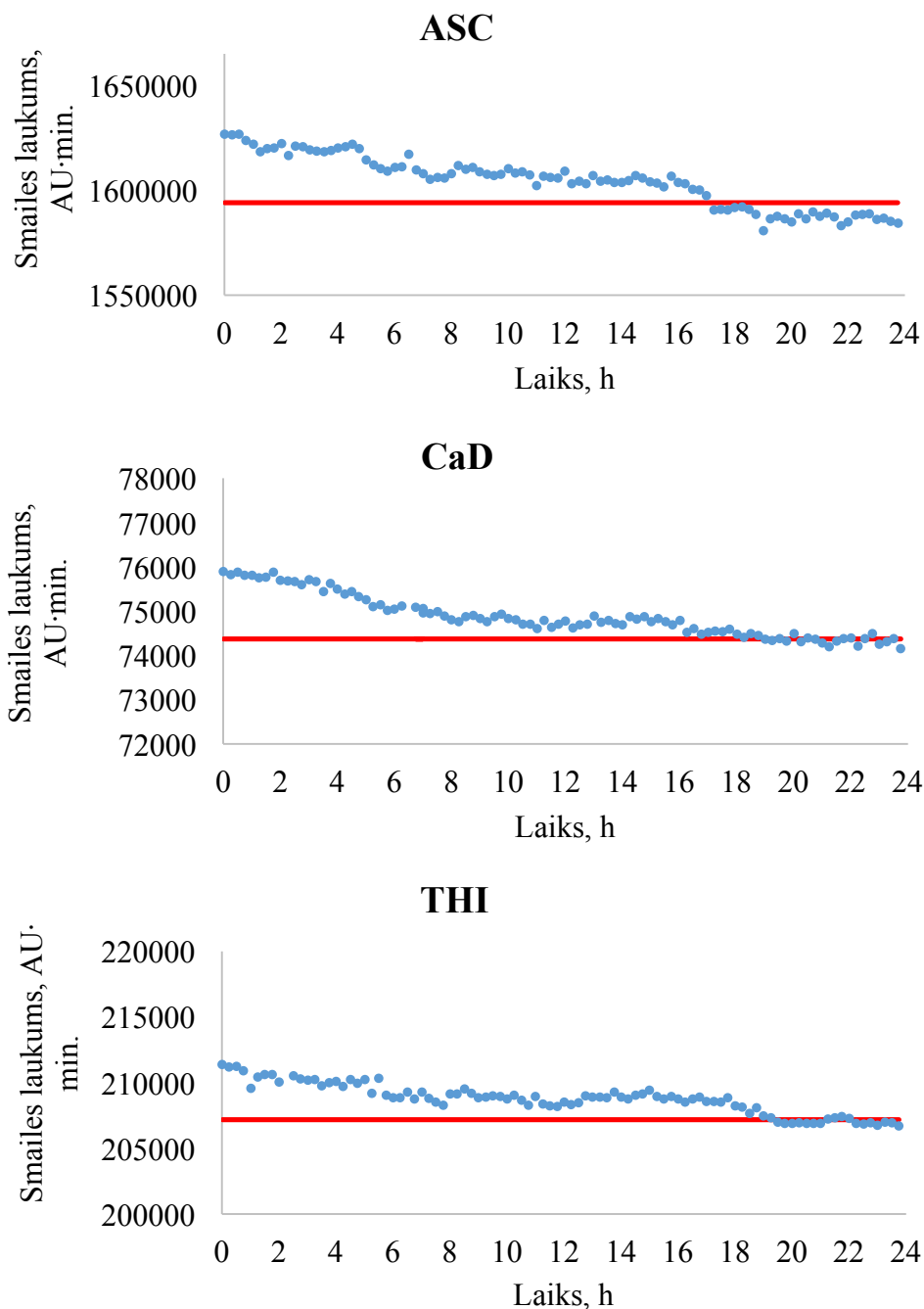
3.4. att. *Preparāta B* hromatogrammas piemērs, izmantojot eluentu A ar pH vērtību 2,05

Bija nolemts pārbaudīt atdalīšanas kvalitāti, izmantojot eluentu A ar pH vērtību 2,05. Eksperiments deva pozitīvo rezultātu (3.4. att.), tāpēc tālākajiem darbiem ir izmantots eluents A ar pH vērtību 2,05.

### 3.2.2. Šķīdumu stabilitātes pārbaude

Interesējošo savienojumu stabilitātes novērtēšanai 0,1 N sālskābes šķīdumā 4 °C temperatūrā veikta standartšķīduma pārbaude, ievadot paraugu hromatogrāfiskajā sistēmā ik pēc 15 minūtēm 24 stundu laikā. Iegūtie dati tika attēloti grafiski kā smailes laukuma funkcija atkarībā no laika.

Par pieņemamu komponentu smaiļu laukumu izmaiņu bija pieņemta to samazināšanās par 2 %, salīdzinot ar sākotnējo (apakšēja robeža atzīmēta ar sarkano līniju). Komponenti CYS, NIC, ABA, PYR, RIB demonstrēja nenozīmīgu koncentrācijas izmaiņu 24 stundu laikā (3. pielikums), bet komponenti ASC, CaD un THI (3.5. att.) uzrādīja ievērojamu atsauces samazināšanos laikā. Bet neskatoties uz zināmo ASC, CaD un THI nestabilitāti, pieņemtajās robežās standartvielu un paraugu šķīdumi ir stabili un var tikt izmantoti analīzei vismaz 16 stundas.



3.5. att. ASC, CaD un THI daudzuma izmaiņas laika gaitā

### 3.2.3. Linearitātes pārbaude

Lai pārlicinātos par atsauces intensitātes un paraugā esošo komponentu daudzumu savstarpējo korelāciju, veikta kalibrēšanas šķīdumu analīze piecu koncentrāciju līmeņos, nodrošinot intervālu no 80 % līdz 120 % no darba koncentrācijām. Ņemot vērā selektivitātes pārbaudes rezultātus, *preparāta B* placebo komponentu ietekmes nozīmīgumu izvērtēšanai linearitātes pārbaudi veicām gan bez placebo, gan *preparāta B* placebo klātbūtnē.

Iegūtie rezultāti liecina, ka atsauces atkarība no analītu koncentrācijām gan ar placebo, gan bez ir labi aprakstāma ar lineāru funkciju, korelācijas koeficienti ir apkopoti 3.1. tabulā un to vērtības atbilst izvirzītajām prasībām (ir lielāki par 0,995), iegūtie dati un aprēķinātie rezultāti ir apkopoti 4. pielikuma 1. un 2. tabulās.

3.1. tabula

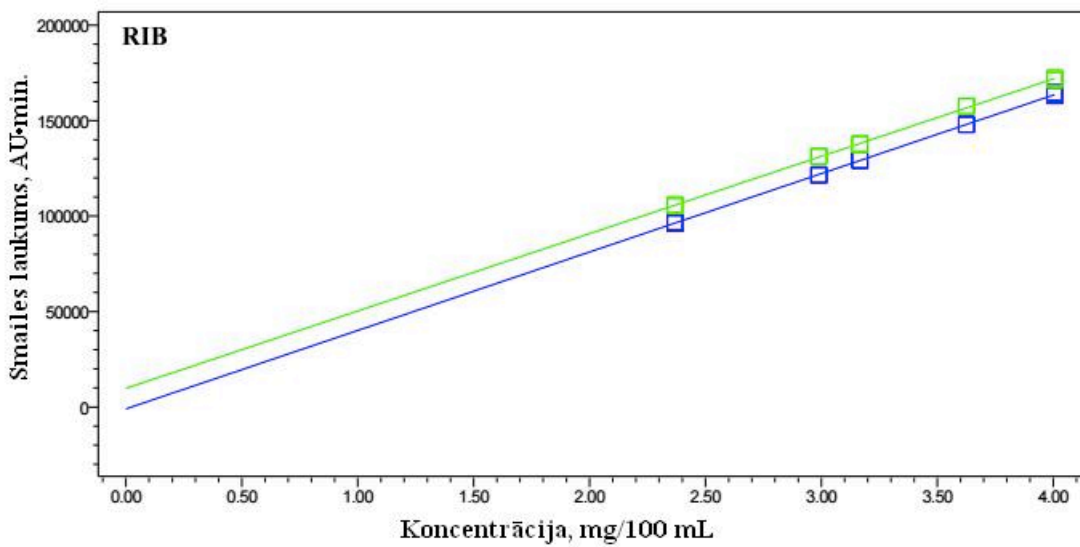
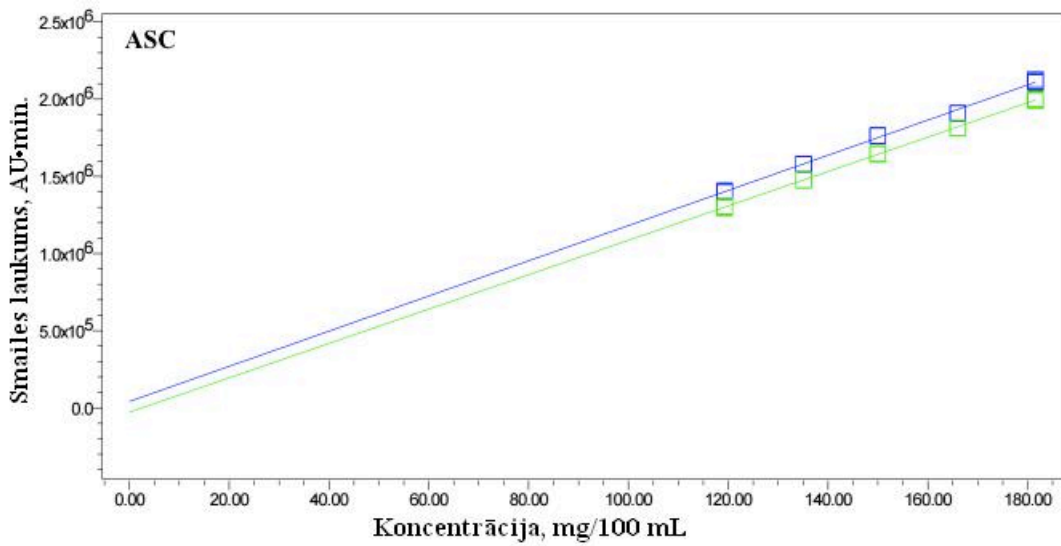
**Kalibrēšanas taisņu korelācijas koeficienti**

	<b>Kalibrēšana bez placebo</b>	<b>Kalibrēšana ar placebo</b>
<b>ASC</b>	0,99915	0,99759
<b>CYS</b>	0,99996	0,99979
<b>CaD</b>	0,99996	0,99995
<b>NIC</b>	0,99971	0,99956
<b>ABA</b>	0,99937	0,99976
<b>PYR</b>	0,99938	0,99952
<b>THI</b>	0,99998	0,99999
<b>RIB</b>	0,99988	0,99979

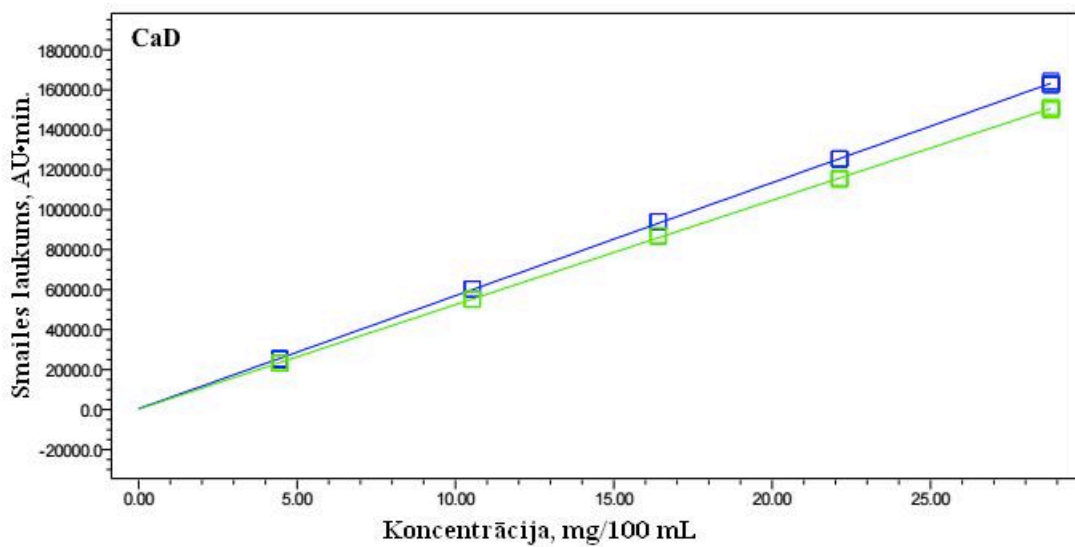
Vizuāli salīdzinot kalibrēšanas taisnes, konstatēts:

1. placebo klātbūtnē ietekmē divu savienojumu noteikšanu – ASC un RIB, jo pie salīdzināma virziena koeficienta tiem atšķirās brīvais loceklis, kas norāda uz placebo efektu (3.6. att.);
2. CaD gadījumā pie salīdzināma brīvā locekļa atšķirās virziena koeficients, kas liecina par iespējamu savienojuma degradāciju hidrolīzes rezultātā (kalibrēšanas tika iegūtas viena pēc otras) (3.7. att.);
3. pārējiem komponentiem kalibrēšanas taisnes sakrīt (5. pielikums).

Tāpēc, lai nodrošinātu precīzāku ASC un RIB kvantificēšanu, nolemts turpmāk, pagatavojot kalibrēšanas paraugus, pievienot tiem divu dražēju iesvaram atbilstošu *preparāta B* placebo daudzumu.



3.6. att. ASC un RIB kalibrēšanas taisņu salīdzinājums (ar un bez placebo)



3.7. att. CaD kalibrēšanas taisņu salīdzinājums (ar un bez placebo)

#### 3.2.4. Precizitātes pārbaude

Lai novērtētu rezultātu precizitāti, pagatavojām un analizējam katra preparāta sešus paralēlus paraugus. Komponentu saturu aprēķināja, izmantojot linearitātes pārbaudē iegūto kalibrēšanas taisņu vienādojumus (placebo klātbūtnē). Metodes precizitāti izsaka kā relatīvo standartnovirzi sešu paraugu rezultātiem.

Visu komponentu iegūtie vidējie rezultāti atrodas preparātu derīguma termiņa specifikācijas robežās. *Preparāta A* gadījumā relatīvā standartnovirze komponentiem sešu paralēlu paraugu analīzē ir no  $\pm 0,32$  līdz  $\pm 1,76$  (1. tabula 6. pielikumā); *preparāta B* gadījumā – no  $\pm 0,55$  līdz  $\pm 2,34$  (2. tabula 6. pielikumā), kas ir labs rādītājs sarežģīta objekta analīzē. Lielākas rezultātu izkliedes novērotas CYS un RIB, ko, visticamāk, var izskaidrot ar sliktāku komponentu šķīdību skābā vidē, salīdzinot ar citiem analītiem. Salīdzinoši lielu ASC un CaD satura izkliedi, iespējams, var izskaidrot ar komponentu zināmo nestabilitāti. Metodes atkārtotamība izvērtēta kopā ar robustumu (3.2.6. nodaļa) un atzīta par pietiekamu.

#### 3.2.5. Pareizības pārbaude

Pareizības pārbaudei, kas raksturo sakarību starp vielas patieso saturu paraugā un analīzes rezultātā iegūto vērtību, katram preparātam tika pagatavoti trīs paralēli standartšķīdumi trīs koncentrācijas līmeņos, katru analizēja trīs reizes.

*Preparāta A* komponentiem atgūstamība ir robežās no 98,1 % līdz 102,1 % (7. pielikums, 1. tabula), *preparāta B* komponentiem – no 97,7 % līdz 101,7 % (7. pielikums, 2. tabula). Relatīvā standartnovirze visos gadījumos ir mazāka par 2,0 %.

Iegūtie rezultāti apliecina, ka metode sniedz pareizus rezultātus visā darba koncentrāciju diapazonā.

#### 3.2.6. Robustuma pārbaude

Ņemot vērā mainīgus faktorus, kuri rutīnas darbā varētu ietekmēt metodes robustumu, veicām divus eksperimentus, mainot:

1. eksperiments: hromatogrāfiskā sistēma (cits hromatogrāfs, cita kolonna ar atšķirīgu sorbenta sēriju);
2. eksperiments: cits analītīķis.

Lai novērtētu metodes robustumu, gatavojām un analizējam katra preparāta sešus paralēlus paraugus, visām pārbaudēm izmantojot vienas un tās pašas *preparātu A* un *B* sērijas. Iegūtie rezultāti ir salīdzināti ar precizitātes pārbaudē iegūtajiem rezultātiem un ir apkopoti

8. pielikumā. Robustuma izvērtēšanai aprēķinātas relatīvās standartnovirzes visiem komponentiem (3.2. tabula).

3.2. tabula

**Metodes precizitāte**

<b>Komponents</b>	<b>ASC</b>	<b>CYS</b>	<b>CaD</b>	<b>NIC</b>	<b>ABA</b>	<b>PYR</b>	<b>THI</b>	<b>RIB</b>
<b>S<sub>r</sub>, % Preparāts A</b>	–	1,92	1,63	–	1,02	–	0,35	–
<b>S<sub>r</sub>, % Preparāts B</b>	1,31	2,34	1,55	1,76	–	1,31	0,75	2,46

Redzams, ka relatīvās standartnovirzes ir robežās no 0,35 līdz 2,46, kas ir labs rezultāts. Atsevišķu komponentu paaugstinātas izkliedes pamatcēloņi ir apspriesti 3.2.4. nodaļā.

Aprēķināts un salīdzināts komponentu saturs vienā kapsulā/dražejā (3.3. un 3.4. tabulas).

3.3. tabula

**Aprēķinātais preparāta A komponentu saturs vienā kapsulā (mg/kaps.)**

<b>Komponents</b>	<b>CYS</b>	<b>CaD</b>	<b>ABA</b>	<b>THI</b>
1. eksperiments	22,47	65,68	20,71	61,83
2. eksperiments	22,19	65,06	20,65	61,60
Precizitātes pārbaudes rezultāti	22,12	65,18	20,64	61,42
S <sub>r</sub> , %	0,83	0,51	0,20	0,34

3.4. tabula

**Aprēķinātais preparāta B komponentu saturs vienā dražejā (mg/draž.)**

<b>Komponents</b>	<b>ASC</b>	<b>CYS</b>	<b>CaD</b>	<b>NIC</b>	<b>PYR</b>	<b>THI</b>	<b>RIB</b>
1. eksperiments	80,42	32,24	4,02	11,21	1,34	1,28	1,08
2. eksperiments	79,05	32,01	3,98	11,01	1,37	1,28	1,09
Precizitātes pārbaudes rezultāti	79,15	32,12	3,98	10,99	1,33	1,25	1,08
S <sub>r</sub> , %	0,96	0,35	0,56	1,08	1,62	1,14	0,98

Robustuma pārbaudē (3 eksperimenti) iegūto rezultātu relatīvā standartnovirze ir robežās no 0,20 % līdz 1,62 % un no tā var secināt, ka visos eksperimentos iegūtie rezultāti savā starpā labi korelē un metode ir robusta.

### 3.3. Augstas izšķirtspējas masspektrometriskā analīze

Meklējot optimālus hromatogrāfiskus apstākļus vienlaicīgai komponentu noteikšanai ar UPLC-VIS metodi, bija pieņemts lēmums izstrādāt jaunu, ātru un uzticamu ūdenī šķīstošo komponentu tiešās infūzijas (bez hromatogrāfiskās sadalīšanas) Orbitrap HRMS noteikšanas metodi. Metodes izstrādes procesā, ievadot paraugu masspektrometrā ar šļirces palīdzību, kura bija izvēlēta kā sākotnēja pieeja, novērota liela izkliede starp mērījumu atkārtojumiem. Tāpēc, lai uzlabotu ievadīšanas precizitāti, kā arī automatizētu procesu nolēmam veikt parauga ievadīšanu HRMS sistēmā ar šķidrums hromatogrāfu bez kolonnas.

Kā sākotnējo detektēšanas veidu pielietoja pozitīvo jonizācijas režīmu (*preparāta B* masspektra piemērs parādīts 3.8. attēlā), jo tajā parasti jonizējas lielāks savienojumu skaits nekā negatīvajā [57]. Konstatēts, ka atsevišķiem savienojumiem (ASC, CYS un CaD) ir novērojamas lielākas signālu intensitātes, veicot mērījumus negatīvajā režīmā. Tas var būt izskaidrojams ar to, ka matricas komponenti labāk jonizējas pozitīvajā režīmā, līdz ar to tajā ir novērojama analītu signālu nomākšana. Galvenā negatīvā jonizācijas režīma priekšrocība ir zemāks fona signālu troksnis [57]. Savukārt THI, RIB un NIC negatīvajā režīmā netika detektēti, jo ir vājas bāzes, bet PYR gadījumā labāka jonizācija novērota pozitīvajā režīmā.

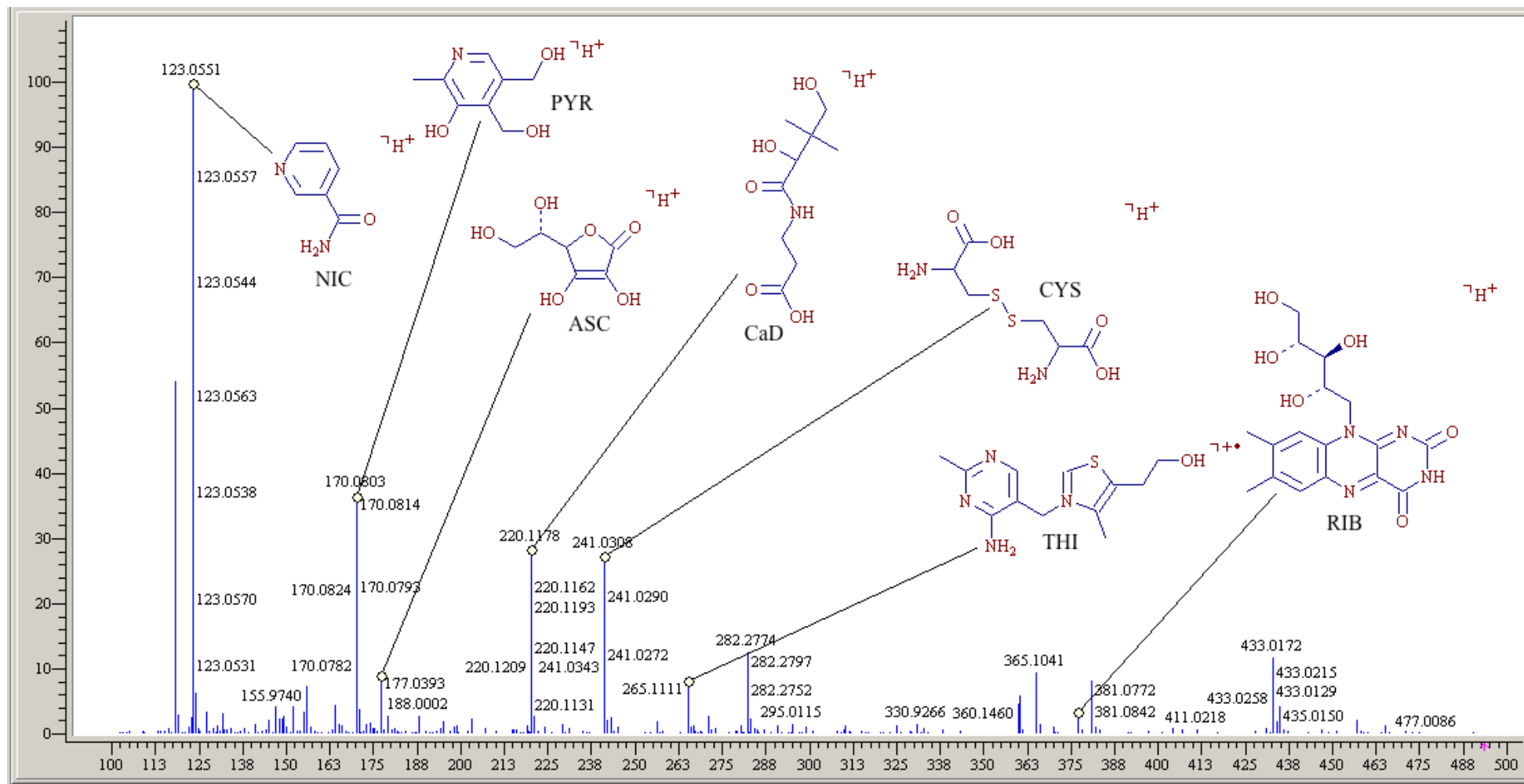
Izstrādātās metodes veiktspēja izvērtēta, pārbaudot linearitāti un precizitāti. Linearitātes novērtēšana veikta placebo klātienē, izmantojot piecu punktu (80 %, 90 %, 100 %, 110 % un 120 % no darba koncentrācijas) kalibrāciju. Korelācijas koeficienti un kalibrēšanas taisņu vienādojumu parametri ir apkopoti 3.5. tabulā.

3.5. tabula

**HRMS metodes linearitātes parametri**

<b>Komponents</b>	<b>Jonizācijas režīms</b>	<b>Virziena koeficients</b>	<b>Brīvais loceklis</b>	<b>R</b>
<b>ASC</b>	negatīvais	152632450	1058137236	0,959
<b>CYS</b>	negatīvais	30446985	368857691	0,980
<b>CaD</b>	negatīvais	190362354	55452593	0,959
<b>NIC</b>	pozitīvais	452567322	934000783	0,980
<b>PYR</b>	pozitīvais	1622679055	360140668	0,990
<b>THI</b>	pozitīvais	1281464282	151092055	0,954
<b>RIB</b>	pozitīvais	278995630	96039291	0,985

Kalibrēšanas taisnes izrādīja linearitāti, korelācijas koeficients visiem komponentiem ir lielāks par 0,95.



3.8. att. Pozitīvajā jonizācijas režīmā uzņemts Preparāta B masspektrs

Metodes precizitāte noteikta, izmantojot sešus *preparāta B* paralēli sagatavotus paraugus, rezultāti apkopoti 3.6. tabulā.

3.6. tabula

**HRMS metodes precizitātes parametri**

N.p.k.	Komponents, mg						
	ASC	CYS	CaD	NIC	PYR	THI	RIB
1.	77,49	34,92	3,73	9,66	1,45	1,27	1,72
2.	83,95	33,47	4,02	9,75	1,37	1,20	1,56
3.	79,80	32,83	3,63	10,25	1,39	1,24	1,67
4.	80,28	28,58	4,00	10,69	1,42	1,29	1,74
5.	75,26	32,40	3,71	10,36	1,42	1,24	1,66
6.	82,08	33,20	4,41	11,32	1,33	1,41	1,63
<b>vidējais</b>	<b>79,81</b>	<b>32,57</b>	<b>3,92</b>	<b>10,34</b>	<b>1,40</b>	<b>1,28</b>	<b>1,66</b>
S <sub>n</sub>	3,12	2,13	0,29	0,62	0,04	0,07	0,06
DI	3,27	2,24	0,30	0,65	0,04	0,08	0,07
S <sub>r</sub> , %	<b>3,9</b>	<b>6,6</b>	<b>7,3</b>	<b>6,0</b>	<b>3,1</b>	<b>5,8</b>	<b>3,9</b>

Iegūtas relatīvās standartnovirzes ir robežās no 3,1 % līdz 7,3 %. HRMS metodes rezultāti salīdzināti ar UPLC-VIS precizitātes pārbaudē iegūtajiem rezultātiem (3.7. tabula) – abos gadījumos pārbaude veikta vienai un tai pašai *preparāta B* sērijai.

3.7. tabula

**HRMS un UPLC-VIS metožu rezultātu salīdzinājums**

Metode	Komponents, mg						
	ASC	CYS	CaD	NIC	PYR	THI	RIB
<b>HRMS</b>	79,81	32,57	3,92	10,34	1,4	1,28	1,66
<b>UPLC-VIS</b>	79,15	32,1	3,98	10,99	1,33	1,25	1,65
$\Delta C$ , %	-0,83	-1,46	1,51	5,91	-5,26	-2,40	-0,61

Tiešās infūzijas HRMS analīzē iegūtie rezultāti atšķiras no UPLC-VIS rezultātiem ne vairāk kā par 5,91 %, no tā var secināt, ka abu metožu rezultāti labi korelē.

Ar HRMS metodi iegūtajiem rezultātiem ir novērojamas diezgan lielas izkliedes, ko var izskaidrot ar neviendabīgas jonu plūsmas ietekmi uz komponentu analītisko signālu intensitātēm. Metodes precizitāti ielānots uzlabot, pielietojot iekšējo standartu metodi.

### 3.4. Metožu salīdzinājums

Patlaban visu interesējošo komponentu noteikšanai laboratorijā izmanto trīs dažādas metodes (3.8. tabula).

3.8. tabula

#### Patlaban izmantotas ūdenī šķīstošu komponentu noteikšanas metodes

Komponents, preparāts	Analīzes metode
CYS, CaD, ABA, THI ( <i>preparāts A</i> ); CaD, NIC, PYR, THI, RIB ( <i>preparāts B</i> )	HPLC-UV
CYS ( <i>preparāts B</i> )	HPTLC-UV
ASC ( <i>preparāts B</i> )	Potenciometriskā titrēšana

Izmantojamās hromatogrāfiskās metodes ir laukietilpīgas: viena HPLC analīze ilgst 60 minūtes, viena HPTLC analīze – 90 minūtes. Savukārt titrēšanas metodei, salīdzinot ar šķidrumu hromatogrāfiskām metodēm, ir priekšrocība – tā ir bezstandarta metode, bet tā kā laboratorijā paraugu skaits ir liels un tas nepārtraukti pieaug, radās nepieciešamība optimizēt komponentu kvantificēšanas procesu – izstrādāt ātrāku metodi, ar kuru būtu iespējams noteikt visus ūdenī šķīstošos komponentus vienlaicīgi, abu preparātu analīzei izmantojot vienu kalibrēšanu.

Ar izstrādātajām UPLC un HRMS metodēm izdevās panākt ievērojamus rezultātus – UPLC analīzes laiks ir 7 minūtes, bet HRMS analīze ilgst 1 minūti. Salīdzinot savā starpā izstrādāto UPLC un HRMS metožu veiktspēju, secināts, ka mūsu gadījumā priekšroka ir UPLC metodei, jo, neskatoties uz to, ka tā ir ilgāka nekā HRMS analīze, iegūtie validācijas rezultāti tai ir labākie.

Savukārt izstrādātā tiešās infūzijas HRMS metode ir laba un ātra skrininga metode ūdenī šķīstošo vitamīnu noteikšanai, kuru ir iespējams izmantot ne tikai farmaceitisko produktu analīzei, bet arī jebkurā citā matricā, piemēram, dažādos pārtikas produktos.

## SECINĀJUMI

1. Izstrādāta un optimizēta ultra efektīvā šķidrumu hromatogrāfijas metode divu farmaceitisko preparātu ūdenī šķīstošo komponentu (8 analīti) vienlaicīgai noteikšanai.
2. Izstrādātā ultra efektīvā šķidrumu hromatogrāfijas metode ir lineārā, precīza un raksturojama ar apmierinošu atgūstamību un pareizību.
3. Izstrādāta jauna tiešās infūzijas augstas izšķirtspējas Orbitrap masspektrometrijas metode ūdenī šķīstošo vitamīnu noteikšanai. Veikta metodes linearitātes un precizitātes pārbaude.
4. Izstrādātās ultra efektīvā šķidrumu hromatogrāfijas un tiešās infūzijas augstas izšķirtspējas Orbitrap masspektrometrijas metodes ievērojami samazina laika un citu resursu ieguldījumu, salīdzinot ar patlaban izmantojamām metodēm.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Antal, I. P.; Bazel, Y. R.; Kormosh, Z. A. Electrochemical Methods for Determining Group B Vitamins. *J. Anal. Chem.* **2013**, *68*, 565-76.
2. Chen, P.; Arkirson, R.; Wolf, R. N. Single Laboratory Validation of a High Performance Liquid Chromatographic Diode-Array Detector, Fluorescence Detector, Mass Spectrometric Method for Simultaneous Determination of Water-Soluble Vitamins in Multivitamin Dietary Tablets. *J. AOAC Int.* **2009**, *92*, 680-687.
3. Sim, H. I.; Kim, B. Y.; Lee, J. H. A Systematic Approach for the Determination of B-Group Vitamins in Multivitamin Dietary Supplements by High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and Mass Spectrometry. *J. AOAC Int.* **2016**, *99*, 1223-1232.
4. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Chapter 1. Pharmaceutical Quality Control. <https://goo.gl/rJ3uZo> (skatīts 02.01.2017).
5. EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Chapter 6. Quality Control. <https://goo.gl/iy04wQ> (skatīts 02.01.2017).
6. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1a(R2). <https://goo.gl/8nJwfC> (skatīts 02.01.2017).
7. Sebečić, B.; Vedrina-Dragoje, I. An improved simple procedure for the determination of thiamine in food. *Die Nahrung.* **1986**, *30*, 527-532.
8. Oni, J.; Westbroek, P.; Nyokong, T. Voltammetric Detection of Vitamin B<sub>1</sub> at Carbon Paste Electrodes and Its Determination in Tablets. *Electroanalysis.* **2002**, *14*, 1165-1168.
9. Shah, H.; Patel, S.; Patel, B.; Solanki, N.; Jivani, N. P.; Kumar, D. B. Development And Validation Of UV-Visible Spectrometric Method For Estimation Of Water Soluble Vitamin Riboflavin. *IJPSR.* **2012**, *9*, 3462-3466.
10. Gu, H. Y.; Yu, A. M.; Chen, H. Y. Electrochemical Behavior and Simultaneous Determination Of Vitamin B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, and C at Electrochemically Pretreated Glassy Carbon Electrode. *Anal. Lett.* **2001**, *34*, 2361-2374.
11. Muszalska, I.; Kiaszewicz, K.; Kson, D.; Sobczak, A. Determination of Nicotinamide (Vitamin B<sub>3</sub>) in Cosmetic Products Using Differential Spectrophotometry and Liquid Chromatography (HPLC). *J. Anal. Chem.* **2012**, *68*, 1007-1013.

12. Hassan, R. O.; Faizullah, A. T. Determination of Nicotinamide by Stopped-Flow Injection Method in Pharmaceutical Formulations. *Arab. J. Chem.* **2013**, *6*, 393-400.
13. Guo, X. Q. Wang, D. Y.; Xu, J. G.; Zhao, Y. B. Determination of Nicotinamide by Photochemical Fluorimetry. *Anal. Lett.* **1996**, *29*, 203-219.
14. Blanco, M.; Coello, J.; Iturriaga, H.; Maspoch, S.; Pagts, J. FIA Fluorimetric Determination of Calcium Pantotbenate. Validation and Quantitation in Multivitamin Preparations. *Anal. Lett.* **1995**, *28*, 821-833.
15. Nirmalchandar, V.; Balasubramanian, N. Spectrophotometric Determination of Pyridoxine Hydrochloride in Pharmaceutical Samples. *Analyst.* **1988**, *113*, 1097-1099.
16. Desai, P. B.; Kotkar, R. M.; Srivastava, A. K. Electrochemical behaviour of pyridoxine hydrochloride (vitamin B<sub>6</sub>) at carbon paste electrode modified with crown ethers. *J. Solid. State Electrochem.* **2008**, *12*, 1067-1075.
17. Shaomin, S.; Yu, Y.; Jinghao, P. Study on molecular recognition of para-aminobenzoic acid species by  $\alpha$ -,  $\beta$ -and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Anal. Chim. Acta.* **2002**, *458*, 305-310.
18. Yamato, C.; Kinoshita, K. A Simple Assay for Measurement of Urinary p-Aminobenzoic Acid in the Oral Pancreatic Function Test. *Anal. Biochem.* **1979**, *98*, 13-17.
19. Perez-Ruiz, T.; Martinez-Lozano, C.; Tomas, V.; Martin, J. Flow Injection Chemiluminescent Method for the Successive Determination of L-cysteine and L-cystine Using Photogenerated Tris(2,2'-bipyridyl) Ruthenium (III). *Talanta.* **2002**, *58*, 987-994.
20. Ensafi, A. A.; Rezaei, B.; Nouroozi, S. Flow Injection Spectrofluorimetric Determination of Cystine and Cysteine. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 288-293.
21. Santhiago, M.; Vieira, I. C. L-Cysteine Determination in Pharmaceutical Formulations Using a Biosensor Based on Laccase from *Aspergillus Oryzae*. *Sens. Actuators, A.* **2008**, *128*, 279-285.
22. Zhao, C.; Zhang, J.; Song, J. Determination of L-Cysteine in Amino Acid Mixture and Human Urine by Flow-Injection Analysis with a Biamperometric Detector. *Anal. Biochem.* **2001**, *297*, 170-176.
23. Patil, S. S.; Srivastava, S. K. Development and Validation of a Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Eight Water-Soluble Vitamins in Multivitamin Formulations and Human Urine. *J. AOAC Int.* **2013**, *96*, 1273-1280.
24. Patil, S. S.; Srivastava, S. K. Development and Validation of Rapid Ion-Pair RPLC Method for Simultaneous Determination of Certain B-Complex Vitamins Along with Vitamin C. *J. AOAC Int.* **2012**, *95*, 74-83.

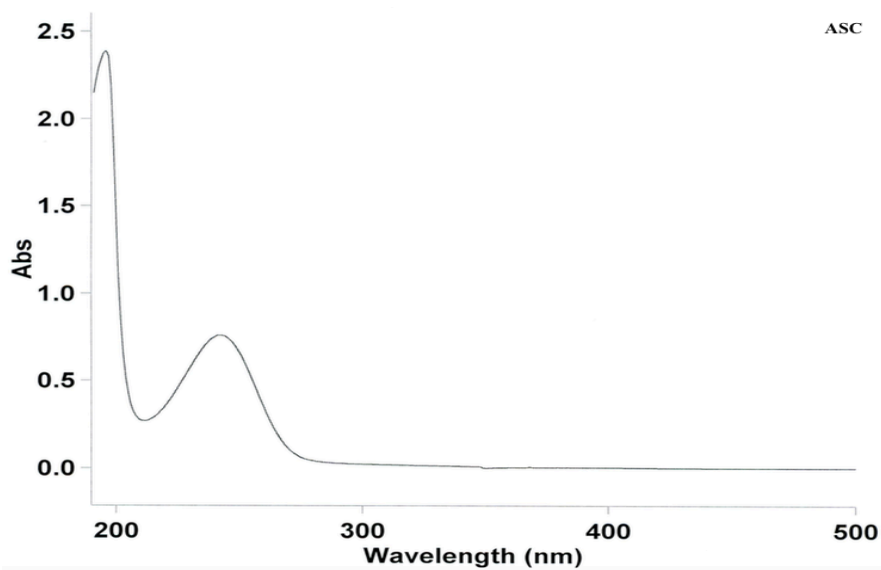
25. Antakli, S.; Sarkees, N.; Sarraf, T. Determination of Water-Soluble Vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub> and C on C18 Column With Particle Size 3 mm in Some Manufactured Food Products by HPLC with UV-DAD/FLD Detection. *Int. J. Pharm.* **2015**, *7*, 219-224.
26. Kumar, T. N.; Sreenivasulu, R.; Mallub, U. R.; Sandeepa, D. Novel RP-HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Thiamine Mononitrate, Calcium Pantothenate, L-Cystine and Para-Aminobenzoic Acid in Multivitamin Dosage Forms. *IJSID.* **2011**, *2*, 226-242.
27. Rudenko, A. O.; Kartsova, L. A. Determination of Water Soluble Vitamin B and Vitamin C in Combined Feed, Premixes, and Biologically Active Supplements by Reversed Phase HPLC. *J. Anal. Chem.* **2010**, *65*, 71-76.
28. Li, K. Simultaneous Determination of Nicotinamide, Pyridoxine Hydrochloride, Thiamine Mononitrate and Ribofavin in Multivitamin with Minerals Tablets by Reversed-Phase Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **2002**, *16*, 504-507.
29. Ivanovic, D.; Popovic, A.; Radulovic, D.; Medenica, M. Reversed-Phase Ion-Pair HPLC Determination of Some Water-Soluble Vitamins in Pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *18*, 999-1004.
30. Amidzic, R.; , Brboric, J.; Udina, O.; Vladimirov, S. RP-HPLC Determination of Vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>, Folic Acid and B<sub>12</sub> in Multivitamin Tablets. *J. Serb. Chem. Soc.* **2005**, *70*, 1229-1235.
31. Apartņeva, D. Ūdenī šķīstošo komponentu analīze Pantovigar kapsulās. Maģistra darbs, Ķīmijas fakultāte, Latvijas Universitāte, Rīga, Latvija, 1999.
32. Hälvin, K.; Paalme, T.; Nisamedtinov, I. Comparison of Different Extraction Methods for Simultaneous Determination of B Complex Vitamins in Nutritional Yeast Using LC/MS-TOF and Stable Isotope Dilution Assay. *Anal Bioanal Chem.* **2013**, *405*, 1213-1222.
33. Hampela, D.; Yorke, E. R.; , Allen, L. H. Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass-Spectrometry (UPLC-MS/MS) for the Rapid, Simultaneous Analysis of Thiamin, Riboflavin, Flavin Adenine Dinucleotide, Nicotinamide and Pyridoxal in Human Milk. *J. Chromatogr. B.* **2012**, *903*, 7-13.
34. Gillotta, N. C.; Euerbyb, M. R.; Johnsonb, C. M.; Barretta, D. A.; Shawa, P. N. Separation of Pharmaceutical Bases from Neutral and Acidic Components by Capillary Electrochromatography. *Anal. Commun.* **1998**, *35*, 217-220.

35. Andersson, M.; Hultin, K.; Sokolowski, A. Effects of Amine Additives on the Resolution of Antipsychotic and Antidepressant Drugs on a Cyanoalkyl HPLC Column. *Chromatographia*. **1998**, *48*, 770-776.
36. Pollie, C. F. *The Essence of Chromatography*; Elsevier: Netherlands, 2003; pp 319-324.
37. Waters Home Page. Guide “The Promise of Small Particles”.  
<https://goo.gl/BRWkQK> (skatīts 06.01.2017).
38. Chawla, G.; Ranjan, C. Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry Journal*, **2016**, *3*, 1-16.
39. Sheliya, K. G.; Shah, K. V. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): A Modern Chromatography Technique. *Pharma Science Monitor*. **2013**, *4*, 78-84.
40. Mekšs, P. AEŠH teotētiskie principi. Lekciju konspekts, Ķīmijas fakultāte, Lavijas Universitāte.  
<https://goo.gl/iu68DT> (skatīts 06.01.2017).
41. Rathahao-Paris, E.; Paris, A.; Bursztyka, J.; Jaeg, J. P.; Cravedi, J. P.; Debrauwer, L. Identification of Xenobiotic Metabolites from Biological Fluids Using Flow Injection Analysis High-Resolution Mass Spectrometry and Post-Acquisition Data Filtering. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **2014**, *28*, 2713-2722.
42. Regazzoni, L.; Arlandini, E.; Garzon, D.; Santagati, N. A.; Beretta, G.; Faccino, R. M. A Rapid Profiling of Gallotannins and Flavonoids of the Aqueous Extract of *Rhus Coriaria* L. by Flow Injection Analysis with High-Resolution Mass Spectrometry Assisted with Database Searching. *J. Pharm. Biomed. Anal*. **2013**, *72*, 202-207.
43. Abdallah, M.; Vergara-Barberan, M.; Lerma-Garcia, M. J.; Herrero-Martinez, J. M.; Simo-Alfonso, E. F.; Guerfel, M. Classification of Tunisian Extra Virgin Olive Oils According to Their Genetic Variety and Maturity Index Using Fatty Acid Profiles Established by Direct Infusion Mass Spectrometry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. **2016**, *118*, 735-743.
44. Loobe, C.; Galozzi, S.; Debor, L.; Julsing, M. K.; Buhler, B.; Schmid, A.; Barkovits, K.; Muller, T.; Marcus, K. Direct Infusion-SIM as Fast and Robust Method for Absolute Protein Quantification in Complex Samples. *EuPA Open Proteomics*. **2015**, *7*, 20-26.
45. Madalinski, G.; Godat, E.; Alves, S.; Lesage, D.; Genin, E.; Levi, F.; Labarre, J.; Tabet, J. C.; Ezan, E.; Junot, C. Direct Introduction of Biological Samples into a LTQ-Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer as a Tool for Fast Metabolome Analysis. *Anal. Chem*. **2008**, *80*, 3291-3303.

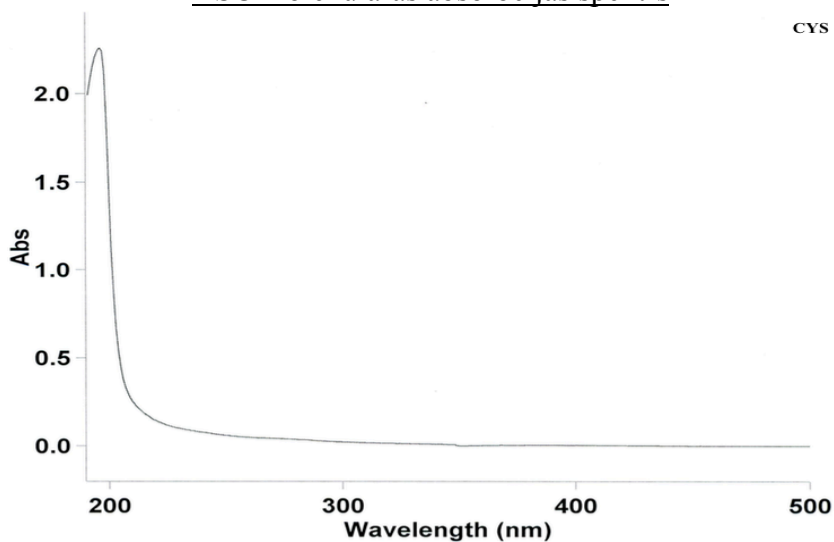
46. Henry, H.; Sobhi, H. R.; Scheibner, O.; Bromirski, M.; Nimkar, S. B.; Rochat, B. Comparison between a High-Resolution Single-Stage Orbitrap and a Triple Quadrupole Mass Spectrometer for Quantitative Analyses of Drugs. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26*, 499-509.
47. Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Cooks, R. G. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 430-443.
48. Virus, A. D.; Sobolevski, T. G.; Rodchenkov. Introduction of HPLC/Orbitrap Mass Spectrometry as Screening Method for Doping Control. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 949-957.
49. Hardman, M.; Makarov, A. Interfacing the Orbitrap Mass Analyzer to an Electrospray Ion Source. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1699-1705.
50. Makarov, A.; Denisov, E.; Kholomeev, A.; Balschun, W.; Lange, O.; Strupat, K.; Horning, S. Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2113-2120.
51. Erve, J. C.; DeMaio, W.; Talaat, E. Rapid Metabolite Identification with Sub Parts-Per-Million Mass Accuracy From Biological Matrices by Direct Infusion Nanoelectrospray Ionization after Clean-up on a ZipTip and LTQ/Orbitrap Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 3015-3026.
52. Ermer, J.; Miller, J. H. *Method Validation in Pharmaceutical analysis*; Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 319-324
53. European Pharmacopoeia 9.0, Section 2.2.46 "Chromatographic separation techniques".
54. Popova, O. Vitamīnus saturošu preparātu ūdenī šķīstošo komponentu šķīdumu hromatogrāfiskās noteikšanas metodes un optimizācijas iespējas. Kurša darbs II, Ķīmijas fakultāte, Latvijas Universitāte, Rīga, Latvija, 2017.
55. *Waters* apgrieztās fāzes kolonnu selektivitātes diegramma.  
<https://goo.gl/BDZDGa> (skatīts 19.02.2017).
56. Lopez-de-Alba, P. L.; Lopez-Martinez, L.; Cerda, V.; Amador-Hernandez, J. Simultaneous Determination and Classification of Riboflavin, Thiamine, Nicotinamide and Pyridoxine in Pharmaceutical Formulations, by UV-Visible Spectrophotometry and Multivariate Analysis. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 715-722.
57. Liigand, P.; Kaupmees, K.; Haav, K.; Liigand, J.; Leito, I.; Girod, M.; Antoine, R.; Kruve, A. Think Negative: Finding the best ESI/MS mode for your analyte. *Anal. Chem.* Publikācijai pieņemts raksts.  
<https://goo.gl/OxR8P5> (skatīts 18.0.2017).

# PIELIKUMI

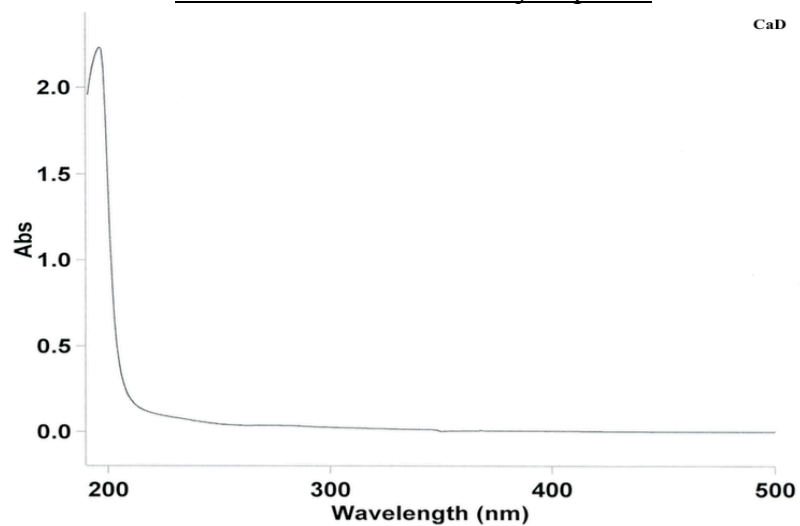
## 1. Pielikums. Analizējamo savienojumu molekulārās absorbcijas spektri



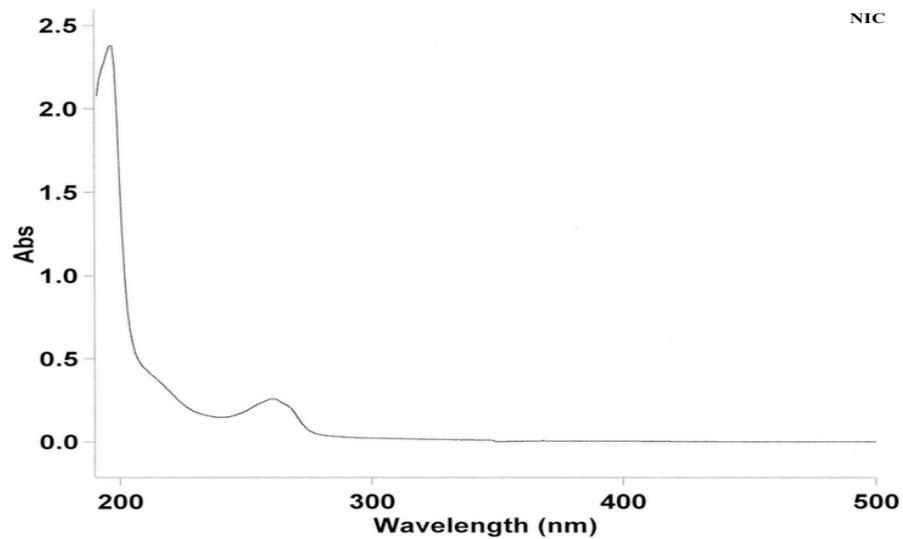
ASC molekulārās absorbcijas spektrs



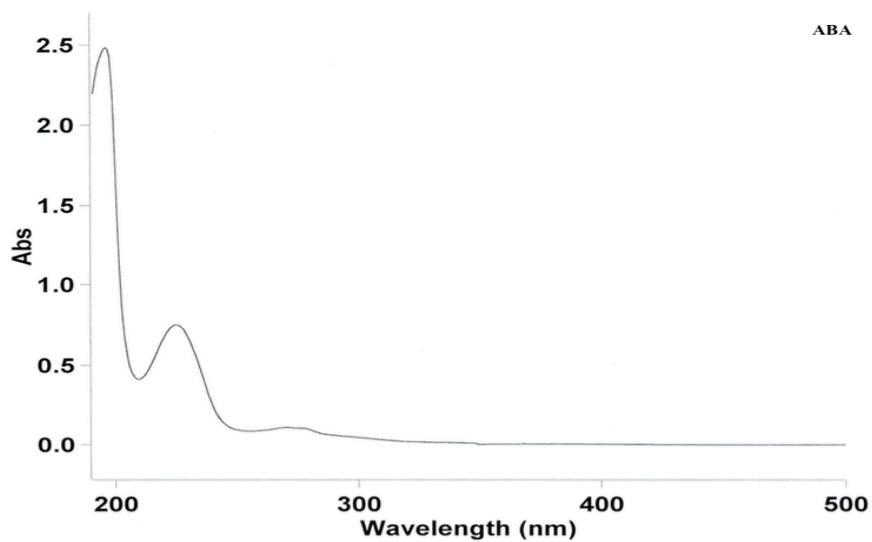
CYS molekulārās absorbcijas spektrs



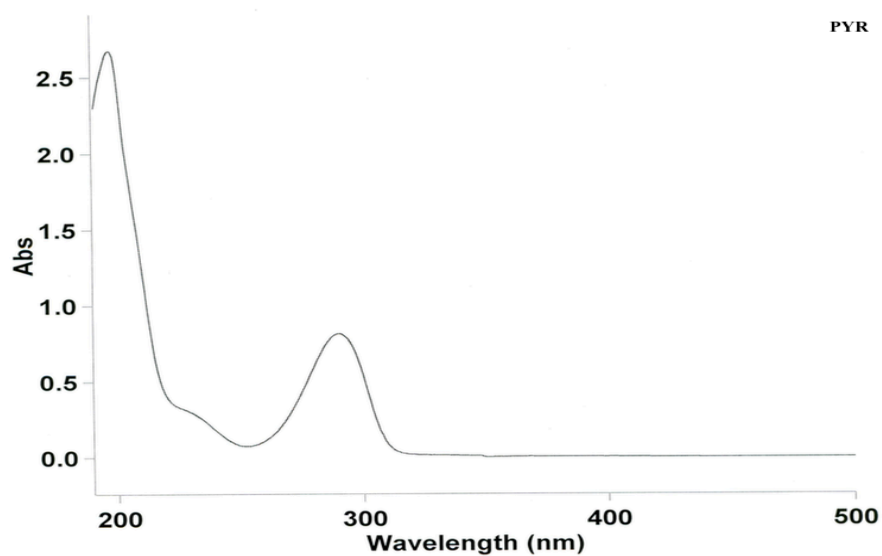
CaD molekulārās absorbcijas spektrs



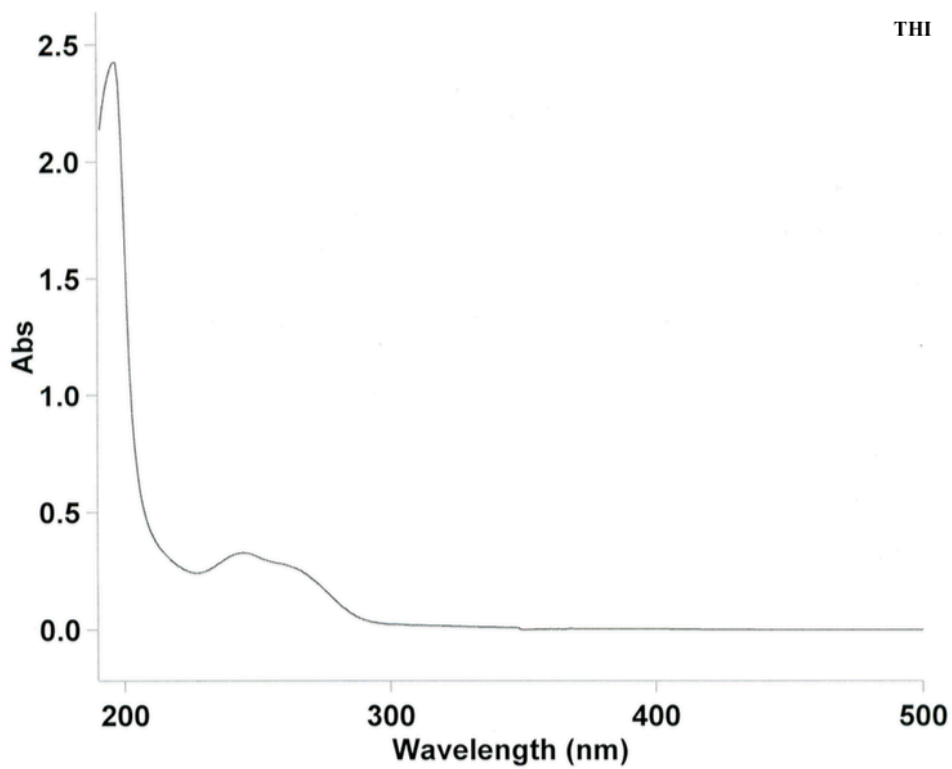
NIC molekularās absorbcijas spektrs



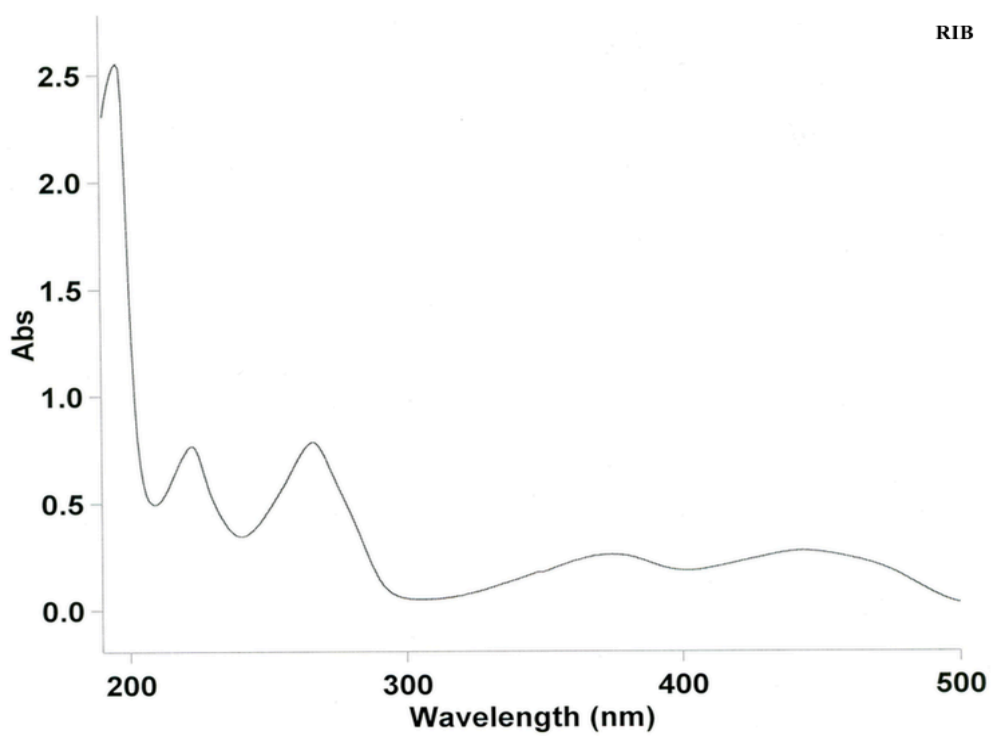
ABA molekularās absorbcijas spektrs



PYR molekularās absorbcijas spektrs

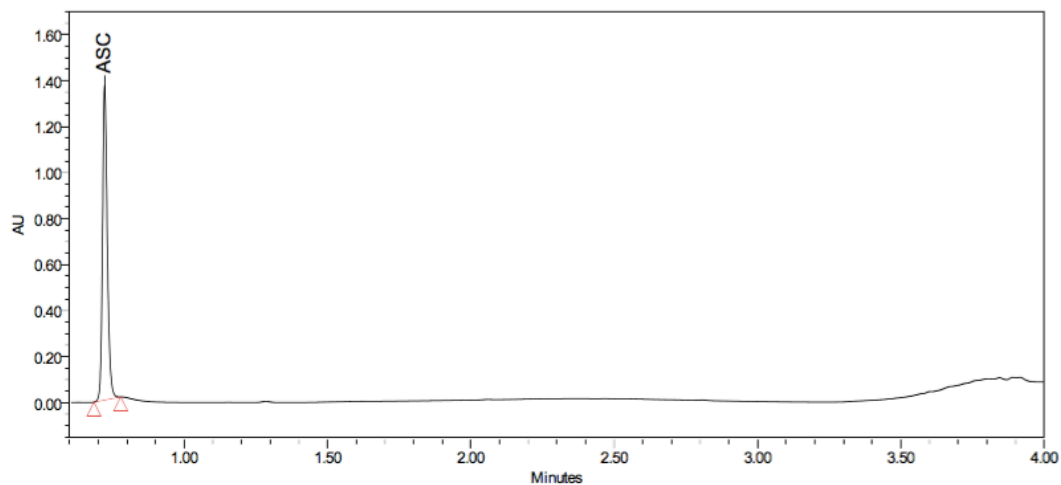


THI molekularās absorbcijas spektrs

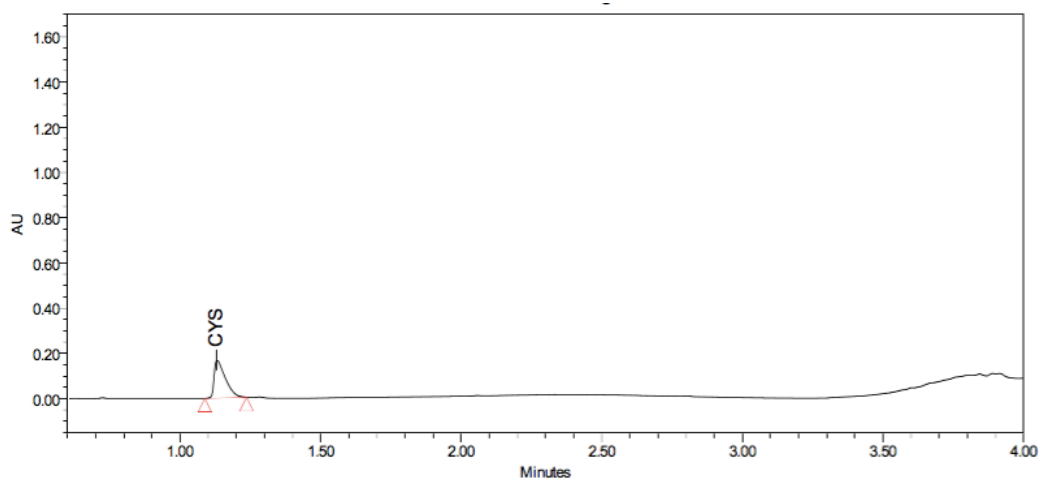


RIB molekularās absorbcijas spektrs

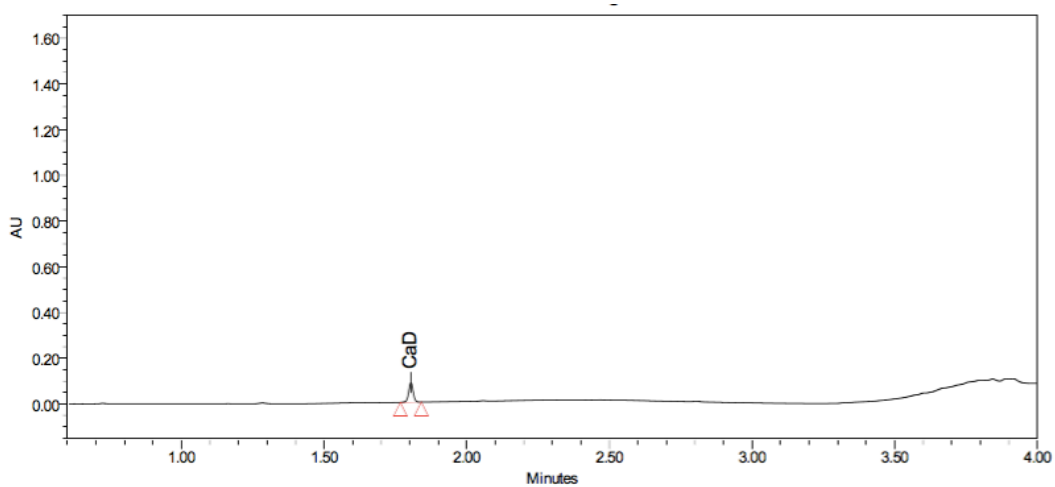
## 2. Pielikums. Selektivitātes pārbaude



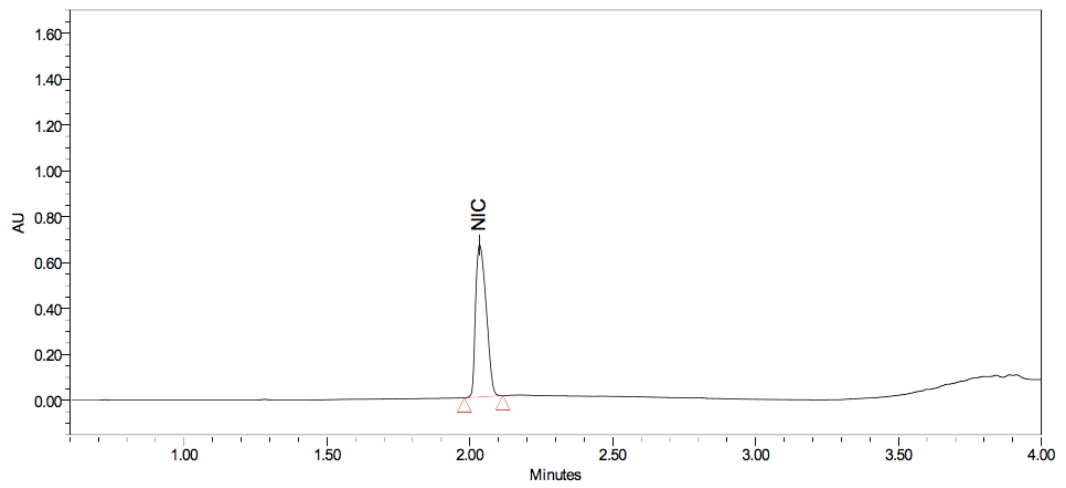
ASC hromatogramma



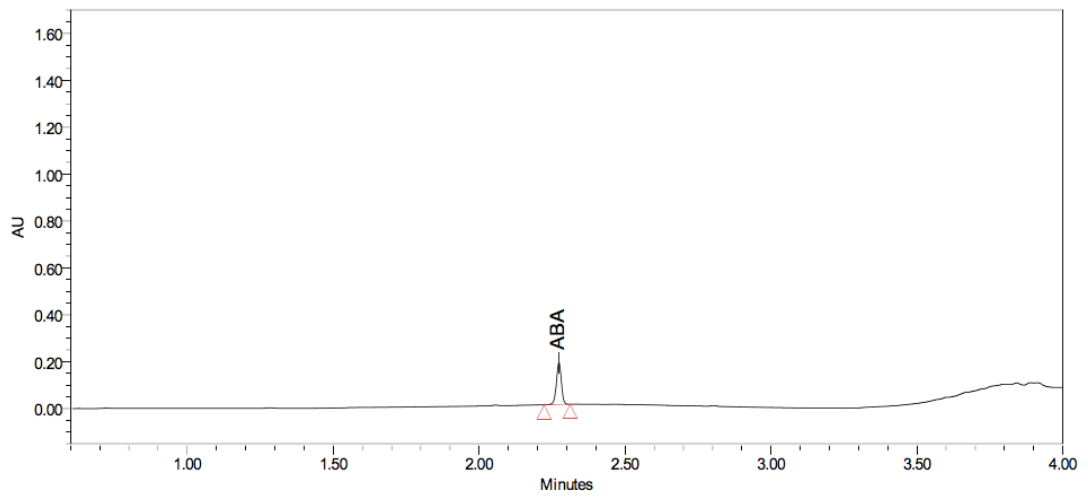
CYS hromatogramma



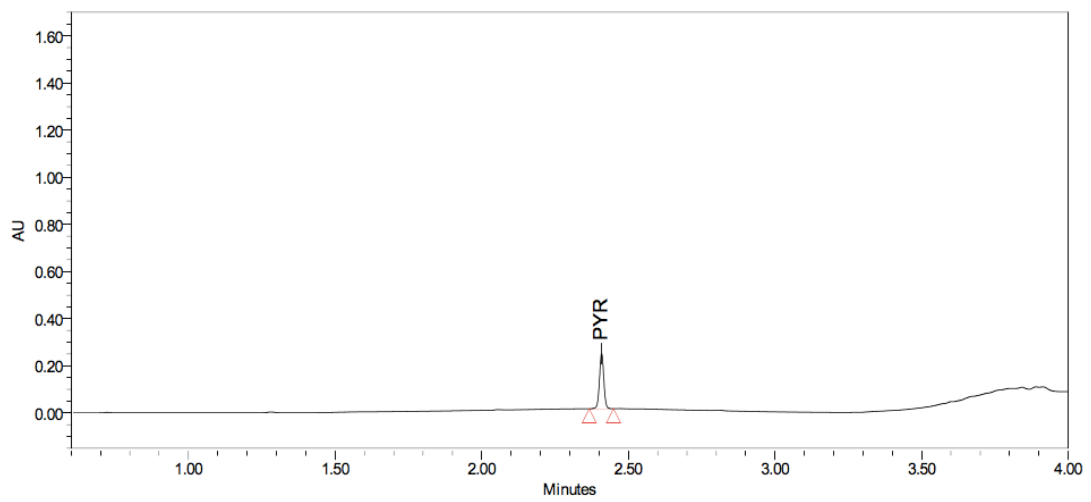
CaD hromatogramma



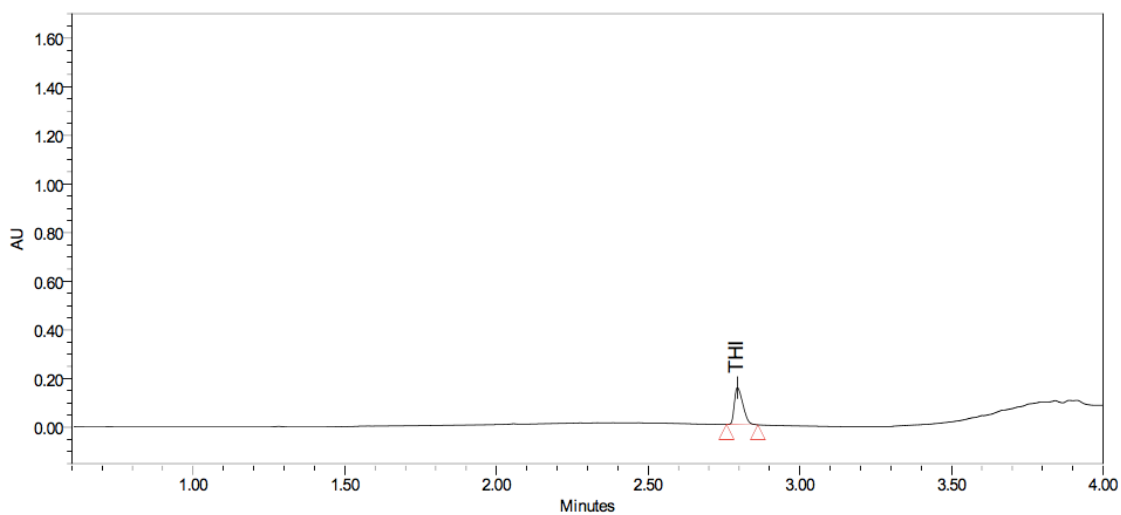
NIC chromatogram



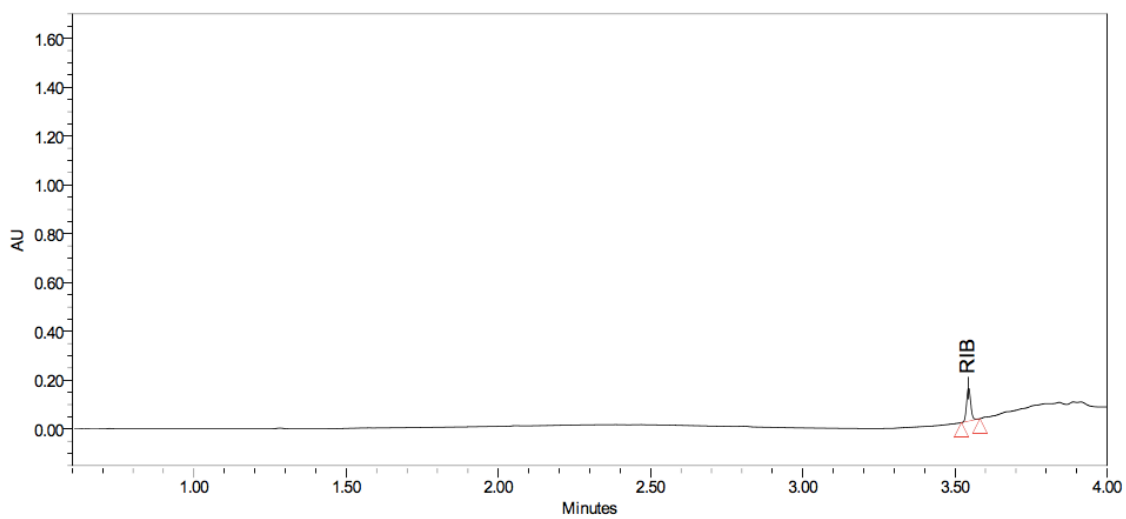
ABA chromatogram



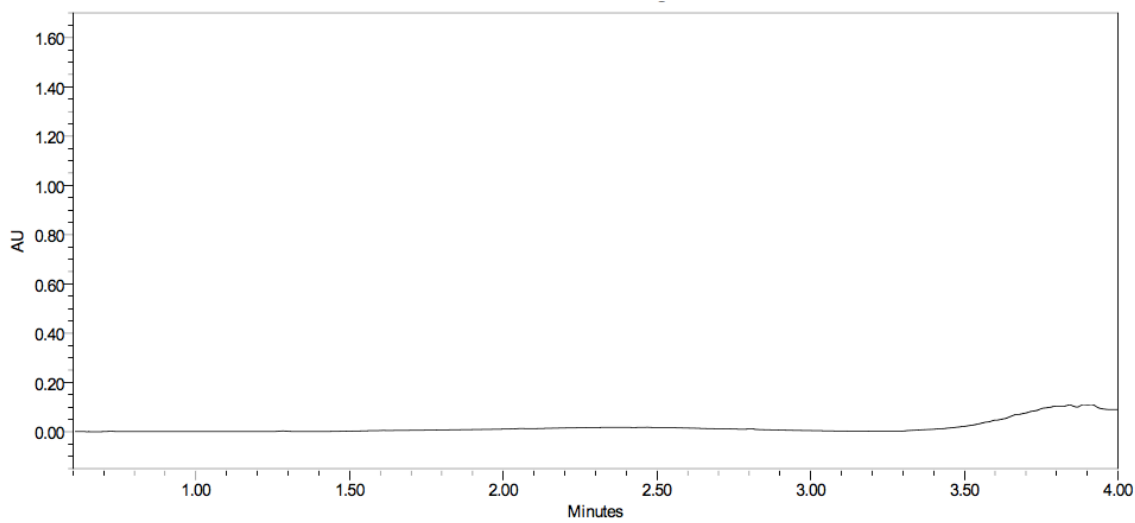
PYR chromatogram



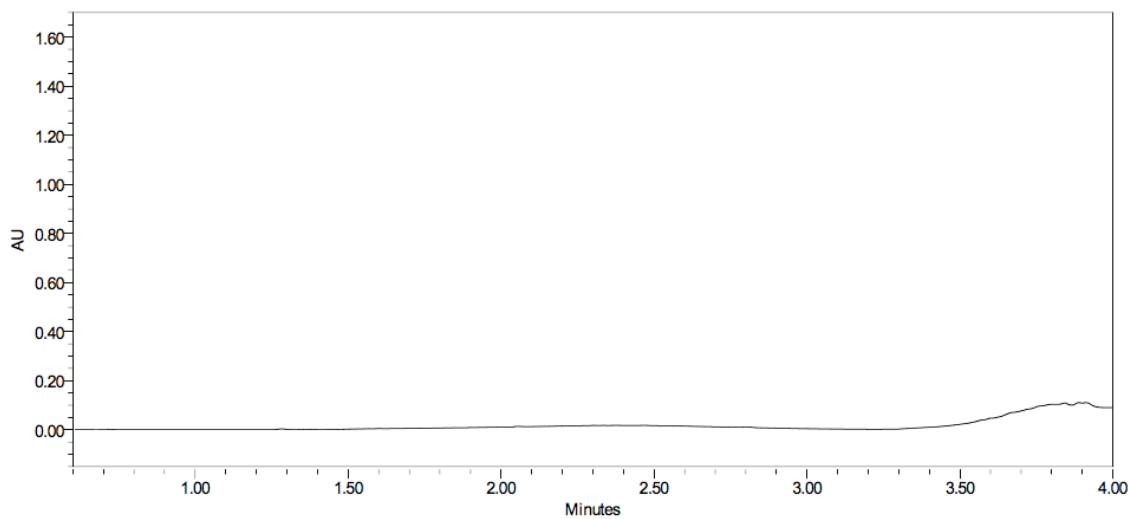
THI hromatogramma



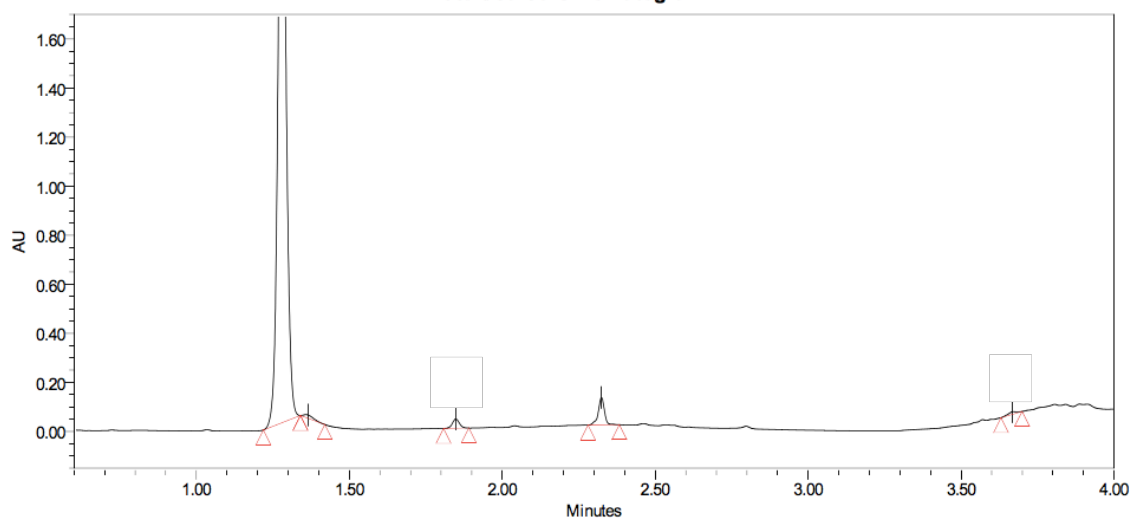
RIB hromatogramma



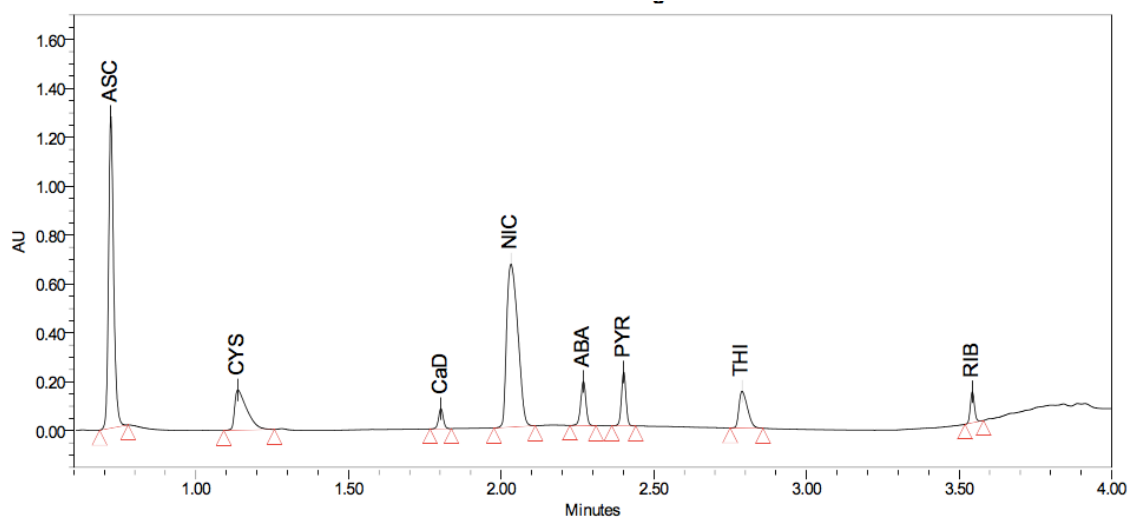
Šķīdinošās vides (0,1 N sālsskābes šķīduma) hromatogramma



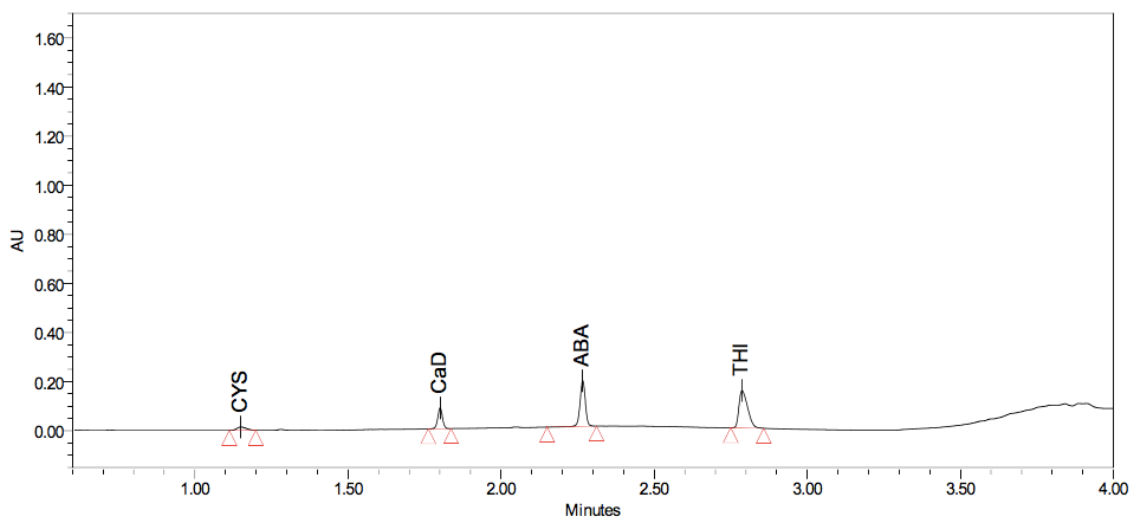
*Preparāta A placebo hromatogramma*



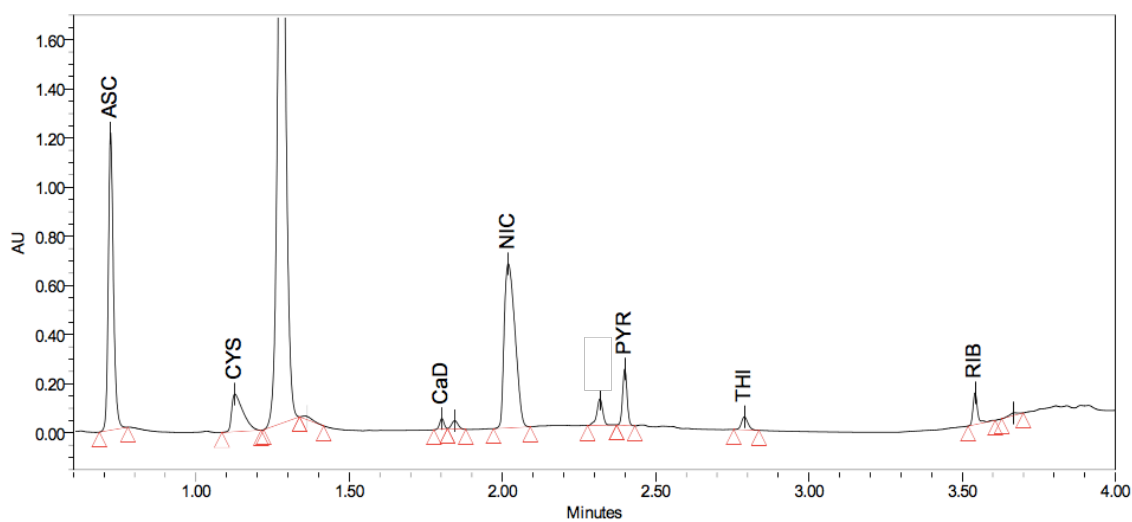
*Preparāta B placebo hromatogramma*



*Preparātu A un B ūdenī šķīstošo komponentu maisījuma hromatogramma*

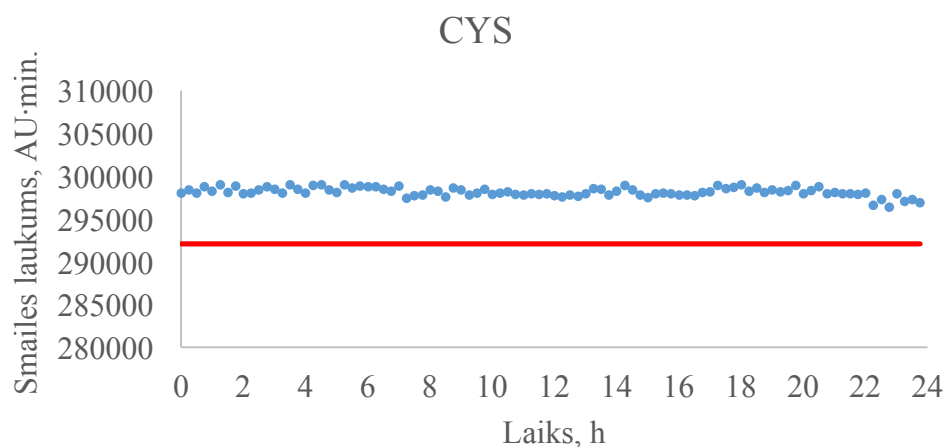


Preparāta A ūdenī šķīstošo komponentu un placebo maisījuma hromatogramma

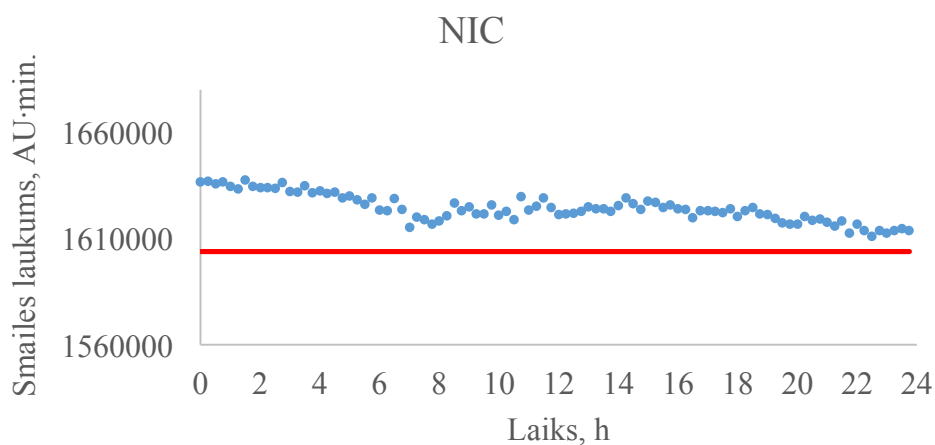


Preparāta B ūdenī šķīstošo komponentu un placebo maisījuma hromatogramma

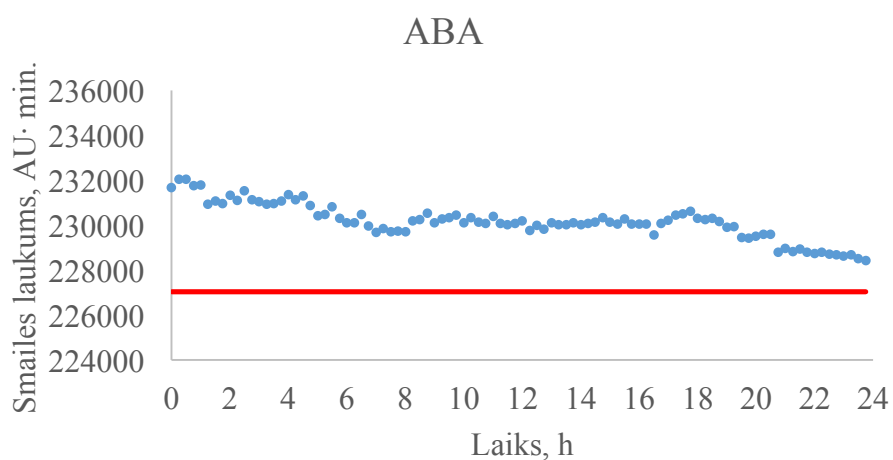
### 3. pielikums. Stabilitātes pārbaude



CYS daudzuma izmaiņa laika gaitā

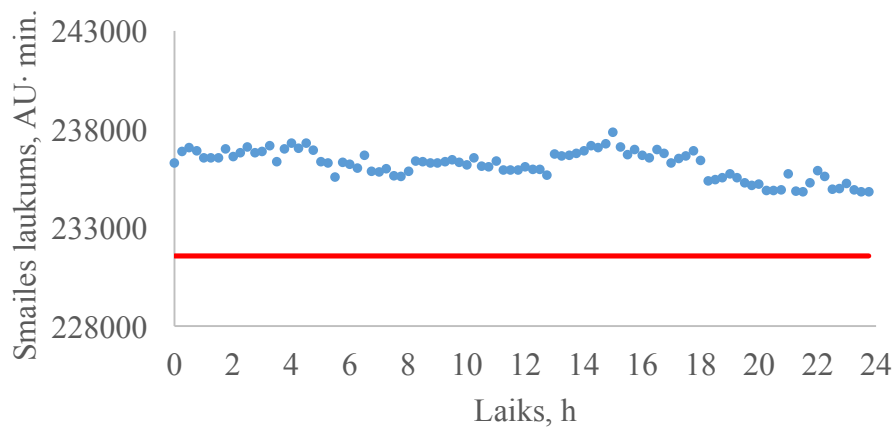


NIC daudzuma izmaiņa laika gaitā



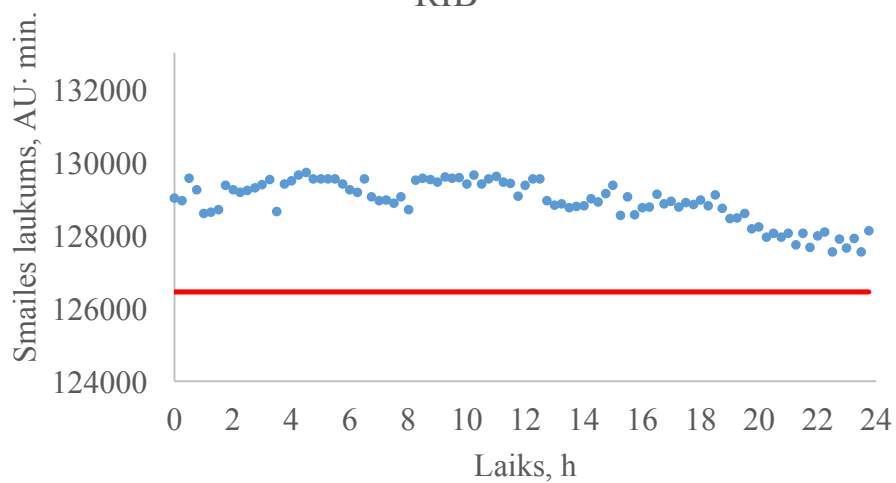
ABA daudzuma izmaiņa laika gaitā

### PYR



PYR daudzuma izmaiņa laika gaitā

### RIB



RIB daudzuma izmaiņa laika gaitā

#### 4. Pielikums. Linearitātes pārbaude

1. tabula

Komponentu linearitātes pārbaudes rezultāti (bez placebo)

Komponents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma$ apr, mg/ 100 mL	$\gamma$ apr.vid., mg/100 mL	$\Delta \gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %	
ABA	1.1.	6,19	288046	-3499	46784	6,232	6,201	0,62	0,018	0,29	
	1.2.		287075			6,211		0,28			
	1.3.		286557			6,200		0,11			
	1.4.		286367			6,196		0,04			
	1.5.		285933			6,187		-0,11			
	1.6.		285812			6,184		-0,15			
	2.1.	7,16	329822			7,125	-0,47	7,130	-0,35	0,005	0,07
	2.2.		330233			7,133	-0,37				
	2.3.		330173			7,132	-0,37				
	3.1.	8,30	385927			8,324	0,25	8,336	0,52	0,011	0,14
	3.2.		386975			8,346	0,42				
	3.3.		386581			8,338	0,42				
	4.1.	9,07	418655			9,023	-0,54	9,018	-0,70	0,008	0,09
	4.2.		417971			9,009	-0,57				
	4.3.		418529			9,021	-0,57				
	5.1.	9,67	447790			9,646	-0,26	9,648	-0,48	0,038	0,40
	5.2.		446753			9,624	-0,50				
	5.3.		446660			9,622	-0,45				
	5.4.		446895			9,627	-0,26				
	5.5.		447787			9,646	0,54				
5.6.	451397		9,723	0,54							

1. tabula

(turpinājums)

Komponents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma_{apr}$ , mg/ 100 mL	$\gamma_{apr.vid.}$ , mg/100 mL	$\Delta \gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
ASC	1.1.	119,30	1407394	41514	11394	119,877	119,28	0,49	0,34	0,29
	1.2.		1402743			119,469		0,14		
	1.3.		1399558			119,189		-0,09		
	1.4.		1398836			119,126		-0,14		
	1.5.		1398824			119,125		-0,14		
	1.6.		1396441			118,916		-0,32		
	2.1.	135,08	1577741			134,828	134,99	-0,19	0,16	0,12
	2.2.		1579488			134,981		-0,07		
	2.3.		1581491			135,157		0,06		
	3.1.	149,97	1761771			150,979	151,16	0,67	0,16	0,11
	3.2.		1765395			151,297		0,89		
	3.3.		1764176			151,190		0,82		
	4.1.	166,00	1910603			164,042	163,91	-1,18	0,12	0,08
	4.2.		1907783			163,794		-1,33		
	4.3.		1908972			163,898		-1,27		
	5.1.	181,58	2114747			181,958	182,08	0,21	0,75	0,41
	5.2.		2108920			181,447		-0,08		
	5.3.		2110629			181,597		0,01		
	5.4.		2110708			181,604		0,01		
	5.5.		2120324			182,448		0,48		
5.6.	2131404		183,420	1,01						

1. tabula  
(turpinājums)

Kompo- nents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma$ apr., mg/ 100 mL	$\gamma$ apr.vid., mg/100 mL	$\Delta \gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
<b>CaD</b>	1.1.	4,45	25386	429	5653	4,415	4,396	-0,81	0,017	0,39
	1.2.		25259			4,392		-1,32		
	1.3.		25184			4,379		-1,62		
	1.4.		25282			4,396		-1,23		
	1.5.		25405			4,418		-0,74		
	1.6.		25173			4,377		-1,66		
	2.1.	10,54	60278			10,587	10,586	0,47	0,009	0,09
	2.2.		60323			10,595		0,55		
	2.3.		60220			10,577		0,38		
	3.1.	16,40	94011			16,554	16,557	0,93	0,003	0,02
	3.2.		94022			16,556		0,94		
	3.3.		94049			16,561		0,97		
	4.1.	22,13	125498			22,124	22,114	-0,01	0,011	0,05
	4.2.		125447			22,115		-0,05		
	4.3.		125376			22,103		-0,11		
	5.1.	28,80	163004			28,759	28,764	-0,14	0,119	0,41
	5.2.		162501			28,670		-0,45		
	5.3.		162520			28,673		-0,44		
	5.4.		162670			28,700		-0,35		
	5.5.		163206			28,795		-0,02		
5.6.	164285		28,986	0,65						

I. tabula  
(turpinājums)

Komponents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma_{apr}$ , mg/ 100 mL	$\gamma_{apr.vid.}$ , mg/100 mL	$\Delta \gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
CYS	1.1.	6,09	38968	-5628	7270	6,134	6,17	0,71	0,06	0,91
	1.2.		38931			6,129		0,62		
	1.3.		38997			6,138		0,77		
	1.4.		38909			6,126		0,57		
	1.5.		39632			6,226		2,21		
	1.6.		39833			6,253		2,66		
	2.1.	22,85	159457			22,708	22,72	-0,62	0,05	0,20
	2.2.		159883			22,766		-0,37		
	2.3.		159228			22,676		-0,76		
	3.1.	38,89	276541			38,813	38,94	-0,21	0,19	0,49
	3.2.		279066			39,160		0,69		
	3.3.		276862			38,857		-0,09		
	4.1.	54,65	389766			54,387	54,35	-0,48	0,05	0,10
	4.2.		389646			54,371		-0,51		
	4.3.		389022			54,285		-0,67		
	5.1.	72,37	521091			72,451	72,48	0,11	0,32	0,45
	5.2.		518471			72,091		-0,39		
	5.3.		521333			72,484		0,16		
	5.4.		519340			72,210		-0,22		
	5.5.		522677			72,669		0,41		
	5.6.		525032			72,993		0,86		

I. tabula  
(turpinājums)

Komponents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma_{apr}$ , mg/ 100 mL	$\gamma_{apr.vid.}$ , mg/100 mL	$\Delta \gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
NIC	1.1.	15,70	1081445	6440	68012	15,806	15,731	0,65	0,043	0,27
	1.2.		1077340			15,746		0,26		
	1.3.		1075768			15,723		0,12		
	1.4.		1074417			15,703		-0,01		
	1.5.		1076069			15,727		0,14		
	1.6.		1073045			15,683		-0,14		
	2.1.	18,00	1221026			17,858	17,878	-0,81	0,019	0,11
	2.2.		1222385			17,878		-0,70		
	2.3.		1223599			17,896		-0,60		
	3.1.	20,76	1422369			20,819	20,832	0,27	0,016	0,08
	3.2.		1423019			20,828		0,32		
	3.3.		1424502			20,850		0,42		
	4.1.	23,46	1594158			23,345	23,335	-0,48	0,015	0,07
	4.2.		1592291			23,317		-0,60		
	4.3.		1593989			23,342		-0,49		
	5.1.	24,36	1659749			24,309	24,324	-0,22	0,102	0,42
	5.2.		1655309			24,244		-0,49		
	5.3.		1655870			24,252		-0,46		
	5.4.		1656019			24,254		-0,45		
	5.5.		1664344			24,377		0,06		
	5.6.		1673096			24,505		0,58		

I. tabula  
(turpinājums)

Kompo- nents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma_{apr}$ , mg/ 100 mL	$\gamma_{apr.vid.}$ , mg/100 mL	$\Delta \gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
PYR	1.1.	1,75	137251	5567	75055	1,755	1,747	0,16	0,004	0,25
	1.2.		136779			1,748		-0,20		
	1.3.		136630			1,746		-0,31		
	1.4.		136462			1,744		-0,44		
	1.5.		136582			1,746		-0,35		
	1.6.		136281			1,742		-0,58		
	2.1.	2,13	163914			2,110	2,113	-1,09	0,003	0,15
	2.2.		164060			2,112		-1,00		
	2.3.		164390			2,116		-0,79		
	3.1.	2,41	189285			2,448	2,454	1,53	0,005	0,21
	3.2.		190025			2,458		1,93		
	3.3.		189871			2,456		1,85		
	4.1.	2,66	205778			2,668	2,665	0,24	0,003	0,11
	4.2.		205326			2,662		0,01		
	4.3.		205580			2,665		0,14		
	5.1.	3,23	247084			3,218	3,221	-0,35	0,016	0,51
	5.2.		246397			3,209		-0,64		
	5.3.		246554			3,211		-0,57		
	5.4.		246549			3,211		-0,57		
	5.5.		247855			3,228		-0,03		
5.6.	249586		3,251	0,68						

1. tabula  
(turpinājums)

Komponents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma_{apr}$ , mg/ 100 mL	$\gamma_{apr.vid.}$ , mg/100 mL	$\Delta \gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
<b>RIB</b>	1.1.	2,37	96994	-994	41088	2,3848	2,3704	0,69	0,0075	0,32
	1.2.		96254			2,3668		-0,07		
	1.3.		96092			2,3629		-0,24		
	1.4.		96367			2,3696		0,04		
	1.5.		96379			2,3699		0,05		
	1.6.		96324			2,3685		0,00		
	2.1.	2,99	121296			2,9763	-0,43	2,9804	0,0069	0,23
	2.2.		121305			2,9765	-0,42			
	2.3.		121791			2,9883	-0,03			
	3.1.	3,17	129182			3,1682	0,07	3,1682	0,0007	0,02
	3.2.		129208			3,1689	0,09			
	3.3.		129149			3,1674	0,05			
	4.1.	3,63	148089			3,6284	0,08	3,6271	0,0023	0,06
	4.2.		147925			3,6244	-0,03			
	4.3.		148094			3,6285	0,08			
	5.1.	4,01	163481			4,0030	-0,09	4,0070	0,0168	0,42
	5.2.		163112			3,9940	-0,31			
	5.3.		163168			3,9954	-0,28			
	5.4.		163223			3,9967	-0,25			
	5.5.		163995			4,0155	0,22			
	5.6.		164890			4,0373	0,77			

1. tabula  
(turpinājums)

Kompo- nents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficient s	$\gamma_{apr}$ , mg/ 100 mL	$\gamma_{apr.vid.}$ , mg/100 mL	$\Delta \gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
THI	1.1.	1,88	41132	-507	21804	1,910	1,898	1,34	0,008	0,43
	1.2.		40676			1,889		0,23		
	1.3.		40663			1,888		0,20		
	1.4.		40961			1,902		0,92		
	1.5.		40852			1,897		0,66		
	1.6.		40915			1,900		0,81		
	2.1.	8,14	175447			8,070	8,076	-0,90	0,006	0,08
	2.2.		175557			8,075		-0,84		
	2.3.		175728			8,083		-0,74		
	3.1.	15,09	329148			15,119	15,138	0,21	0,023	0,15
	3.2.		330134			15,164		0,51		
	3.3.		329430			15,132		0,30		
	4.1.	22,14	482311			22,144	22,139	0,00	0,012	0,05
	4.2.		481926			22,126		-0,08		
	4.3.		482412			22,148		0,02		
	5.1.	29,07	632446			29,029	29,067	-0,14	0,117	0,40
	5.2.		631600			28,990		-0,28		
	5.3.		631639			28,992		-0,27		
	5.4.		631822			29,001		-0,24		
	5.5.		633990			29,100		0,10		
	5.6.		638145			29,291		0,75		

Komponentu linearitātes pārbaudes rezultāti (ar placebo)

Komponents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma_{apr}$ , mg/ 100 mL	$\gamma_{apr.vid.}$ , mg/100 mL	$\Delta \gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
ABA	1.1.	6,19	286076	3275	45348	6,236	6,212	0,69	0,019	0,31
	1.2.		285919			6,233		0,64		
	1.3.		284757			6,207		0,22		
	1.4.		284779			6,208		0,23		
	1.5.		284570			6,203		0,16		
	1.6.		283799			6,186		-0,12		
	2.1.	7,16	324745			7,089	7,101	-0,97	0,011	0,15
	2.2.		325504			7,106		-0,74		
	2.3.		325653			7,109		-0,69		
	3.1.	8,30	379445			8,295	8,312	-0,09	0,029	0,35
	3.2.		379482			8,296		-0,08		
	3.3.		381761			8,346		0,52		
	4.1.	9,07	414517			9,069	9,073	-0,05	0,004	0,05
	4.2.		414893			9,077		0,05		
	4.3.		414790			9,075		0,02		
	5.1.	9,67	440724			9,646	9,636	-0,25	0,027	0,28
	5.2.		441610			9,666		-0,05		
	5.3.		441125			9,655		-0,16		
	5.4.		440693			9,646		-0,26		
	5.5.		438713			9,602		-0,71		
5.6.	438751		9,603	-0,70						

2. tabula  
(turpinājums)

Komponents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma_{apr}$ , mg/ 100 mL	$\gamma_{apr.vid.}$ , mg/100 mL	$\Delta\gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
ASC	1.1.	119,30	1306950	-27940	11137	119,861	119,35	0,47	0,41	0,34
	1.2.		1306392			119,811		0,43		
	1.3.		1299377			119,181		-0,10		
	1.4.		1300180			119,253		-0,04		
	1.5.		1299265			119,171		-0,10		
	1.6.		1295203			118,806		-0,41		
	2.1.	135,08	1472676			134,741	-0,25	134,93	0,17	0,13
	2.2.		1475595			135,004	-0,06			
	2.3.		1476185			135,057	-0,02			
	3.1.	149,97	1642556			149,995	0,02	150,28	0,45	0,30
	3.2.		1643067			150,041	0,05			
	3.3.		1651558			150,803	0,56			
	4.1.	166,00	1813588			165,352	-0,39	165,35	0,03	0,02
	4.2.		1813871			165,378	-0,38			
	4.3.		1813162			165,314	-0,42			
	5.1.	181,58	1997572			181,872	0,16	181,76	0,49	0,27
	5.2.		2000765			182,159	0,32			
	5.3.		2002673			182,330	0,41			
	5.4.		1997626			181,877	0,16			
	5.5.		1989918			181,185	-0,22			
5.6.	1989596		181,156	-0,24						

2. tabula  
(turpinājums)

Kompo- nents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma$ apr, mg/ 100 mL	$\gamma$ apr.vid., mg/100 mL	$\Delta \gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
CaD	1.1.	4,45	23452	275	5222	4,438	4,421	-0,29	0,019	0,43
	1.2.		23499			4,447		-0,08		
	1.3.		23347			4,418		-0,74		
	1.4.		23327			4,414		-0,82		
	1.5.		23323			4,414		-0,84		
	1.6.		23219			4,394		-1,29		
	2.1.	10,54	55210			10,520	10,515	-0,16	0,004	0,04
	2.2.		55169			10,512		-0,24		
	2.3.		55180			10,514		-0,22		
	3.1.	16,40	86729			16,556	16,583	0,94	0,043	0,26
	3.2.		86761			16,562		0,97		
	3.3.		87132			16,633		1,41		
	4.1.	22,13	115491			22,064	22,072	-0,29	0,078	0,35
	4.2.		115961			22,154		0,12		
	4.3.		115153			21,999		-0,58		
	5.1.	28,80	151194			28,901	28,779	0,35	0,105	0,37
	5.2.		150839			28,833		0,11		
	5.3.		151068			28,876		0,27		
	5.4.		150281			28,726		-0,26		
	5.5.		149850			28,643		-0,54		
	5.6.		150120			28,695		-0,36		

2. tabula  
(turpinājums)

Komponents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma_{apr}$ , mg/ 100 mL	$\gamma_{apr.vid.}$ , mg/100 mL	$\Delta \gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
CYS	1.1.	6,09	43092	-2937	7248	6,351	6,22	4,26	0,24	3,87
	1.2.		38978			5,783		-5,06		
	1.3.		42319			6,244		2,51		
	1.4.		43648			6,427		5,52		
	1.5.		43457			6,401		5,08		
	1.6.		41559			6,139		0,79		
	2.1.	22,85	161503			22,688	22,72	-0,71	0,08	0,33
	2.2.		162329			22,802	-0,21			
	2.3.		161290			22,658	-0,84			
	3.1.	38,89	275970			38,481	38,64	-1,06	0,20	0,52
	3.2.		276571			38,563	-0,85			
	3.3.		278745			38,863	-0,08			
	4.1.	54,65	390788			54,322	54,51	-0,60	0,19	0,34
	4.2.		392179			54,514	-0,25			
	4.3.		393478			54,693	0,08			
	5.1.	72,37	537242			74,528	72,50	2,98	1,01	1,40
	5.2.		520012			72,151	-0,30			
	5.3.		521936			72,416	0,06			
	5.4.		519871			72,131	-0,33			
	5.5.		518177			71,898	-0,65			
	5.6.		518016			71,875	-0,68			

2. tabula  
(turpinājums)

Komponents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma$ apr, mg/ 100 mL	$\gamma$ apr.vid., mg/100 mL	$\Delta\gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
NIC	1.1.	15,70	1073738	36801	65713	15,780	15,761	0,48	0,037	0,23
	1.2.		1076411			15,820		0,74		
	1.3.		1071389			15,744		0,25		
	1.4.		1072388			15,759		0,35		
	1.5.		1071862			15,751		0,30		
	1.6.		1069217			15,711		0,04		
	2.1.	18,00	1206460			17,800	17,822	-1,14	0,025	0,14
	2.2.		1207689			17,818		-1,03		
	2.3.		1209698			17,849		-0,86		
	3.1.	20,76	1398316			20,719	20,766	-0,21	0,072	0,35
	3.2.		1398999			20,730		-0,16		
	3.3.		1406882			20,849		0,42		
	4.1.	23,46	1574477			23,400	23,409	-0,24	0,013	0,06
	4.2.		1576060			23,424		-0,14		
	4.3.		1574676			23,403		-0,23		
	5.1.	24,36	1637847			24,364	24,318	0,00	0,062	0,26
	5.2.		1637569			24,360		-0,01		
	5.3.		1638986			24,382		0,08		
	5.4.		1634942			24,320		-0,18		
	5.5.		1629967			24,244		-0,49		
5.6.	1629719		24,241	-0,50						

2. tabula  
(turpinājums)

Kompo- nents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma_{apr}$ , mg/ 100 mL	$\gamma_{apr.vid.}$ , mg/100 mL	$\Delta \gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
PYR	1.1.	1,75	135547	4561	74641	1,755	1,747	0,18	0,006	0,34
	1.2.		135447			1,754		0,11		
	1.3.		134821			1,745		-0,37		
	1.4.		134914			1,746		-0,30		
	1.5.		134770			1,744		-0,41		
	1.6.		134366			1,739		-0,72		
	2.1.	2,13	161922			2,108	-1,16	2,112	0,004	0,17
	2.2.		162238			2,112	-0,96			
	2.3.		162458			2,115	-0,82			
	3.1.	2,41	186384			2,436	1,04	2,442	0,009	0,35
	3.2.		186499			2,438	1,10			
	3.3.		187553			2,452	1,68			
	4.1.	2,66	204501			2,679	0,66	2,680	0,002	0,07
	4.2.		204541			2,679	0,68			
	4.3.		204773			2,682	0,79			
	5.1.	3,23	245158			3,223	-0,18	3,219	0,010	0,30
	5.2.		245618			3,230	0,01			
	5.3.		245462			3,227	-0,05			
	5.4.		244898			3,220	-0,29			
	5.5.		244016			3,208	-0,65			
	5.6.		243956			3,207	-0,68			

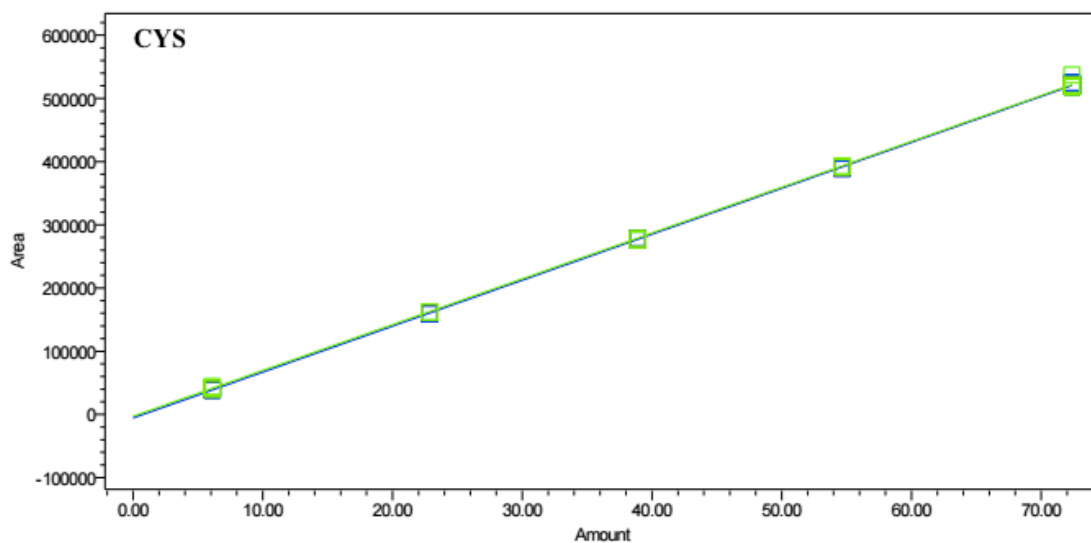
2. tabula  
(turpinājums)

Kompo- nents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziens koeficients	$\gamma_{apr}$ , mg/ 100 mL	$\gamma_{apr.vid.}$ , mg/100 mL	$\Delta\gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
<b>RIB</b>	1.1.	2,37	105740	9773	40511	2,3689	2,3650	0,01	0,0062	0,26
	1.2.		105986			2,3750		0,27		
	1.3.		105443			2,3616		-0,30		
	1.4.		105572			2,3648		-0,16		
	1.5.		105470			2,3622		-0,27		
	1.6.		105281			2,3576		-0,46		
	2.1.	2,99	131346			3,0010	0,39	3,0001	0,0035	0,12
	2.2.		131432			3,0031	0,47			
	2.3.		131155			2,9963	0,24			
	3.1.	3,17	137284			3,1476	-0,58	3,1564	0,0118	0,37
	3.2.		137456			3,1518	-0,45			
	3.3.		138182			3,1697	0,12			
	4.1.	3,63	157403			3,6442	0,51	3,6474	0,0031	0,08
	4.2.		157548			3,6478	0,61			
	4.3.		157653			3,6504	0,68			
	5.1.	4,01	171967			4,0037	-0,07	3,9984	0,0119	0,30
	5.2.		172230			4,0102	0,09			
	5.3.		172208			4,0097	0,08			
	5.4.		171765			3,9987	-0,20			
	5.5.		171224			3,9854	-0,53			
	5.6.		171115			3,9827	-0,60			

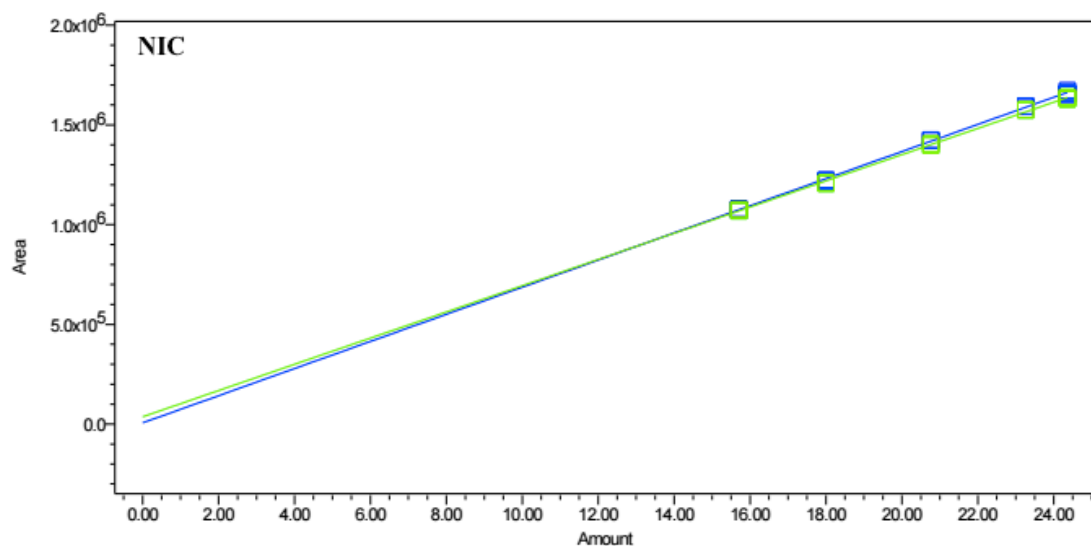
2. tabula  
(turpinājums)

Kompo- nents	N.p.k.	$\gamma$ , mg/ 100 mL	Smailes laukums	Brīvais loceklis	Virziena koeficients	$\gamma_{apr}$ , mg/ 100 mL	$\gamma_{apr.vid.}$ , mg/100 mL	$\Delta\gamma$ , %	$S_n$ , mg/ 100 mL	$S_r$ , %
THI	1.1.	1,88	49388	7889	21642	1,918	1,9006	1,76	0,011	0,55
	1.2.		49208			1,909		1,31		
	1.3.		48964			1,898		0,72		
	1.4.		48898			1,895		0,55		
	1.5.		48869			1,894		0,48		
	1.6.		48803			1,890		0,32		
	2.1.	8,14	182893			8,086	8,0941	-0,70	0,008	0,10
	2.2.		183045			8,093		-0,61		
	2.3.		183248			8,103		-0,50		
	3.1.	15,09	333101			15,027	15,0584	-0,40	0,050	0,33
	3.2.		333225			15,033		-0,36		
	3.3.		335020			15,116		0,19		
	4.1.	22,14	488620			22,213	22,2231	0,32	0,009	0,04
	4.2.		488919			22,227		0,38		
	4.3.		488987			22,230		0,39		
	5.1.	29,07	637491			29,092	29,0541	0,07	0,086	0,30
	5.2.		638766			29,151		0,27		
	5.3.		638064			29,118		0,16		
	5.4.		636908			29,065		-0,02		
	5.5.		634712			28,963		-0,37		
	5.6.		634126			28,936		-0,46		

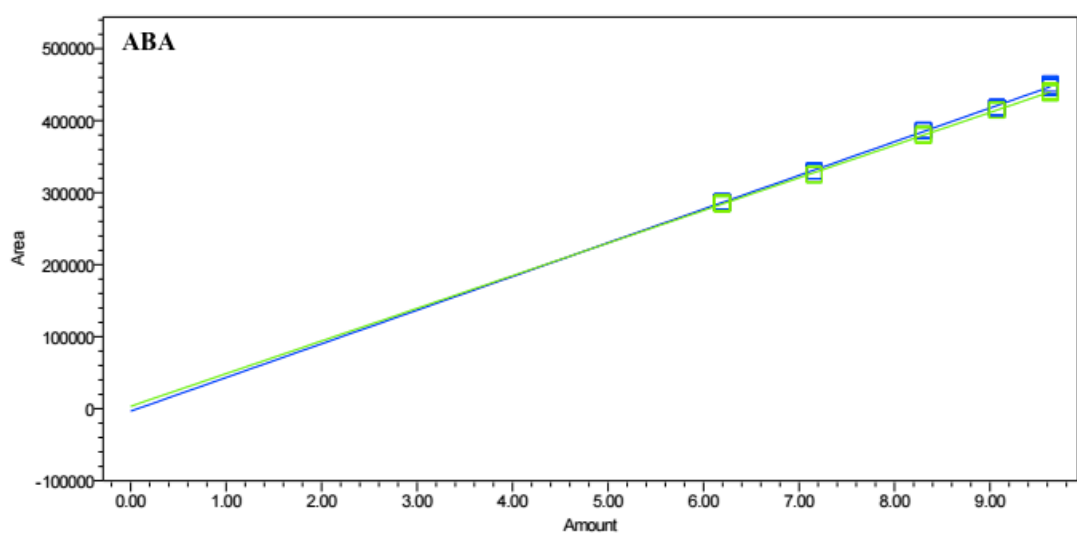
## 5. Pielikums. Kalibrēšanas taisnes



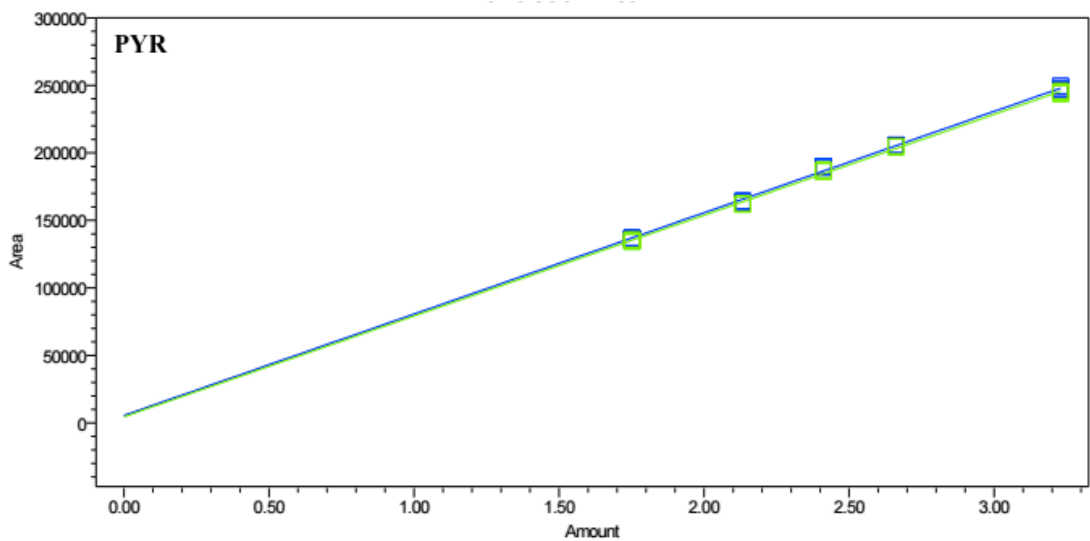
CYS kalibrēšanas taisņu salīdzinājums (ar un bez placebo)



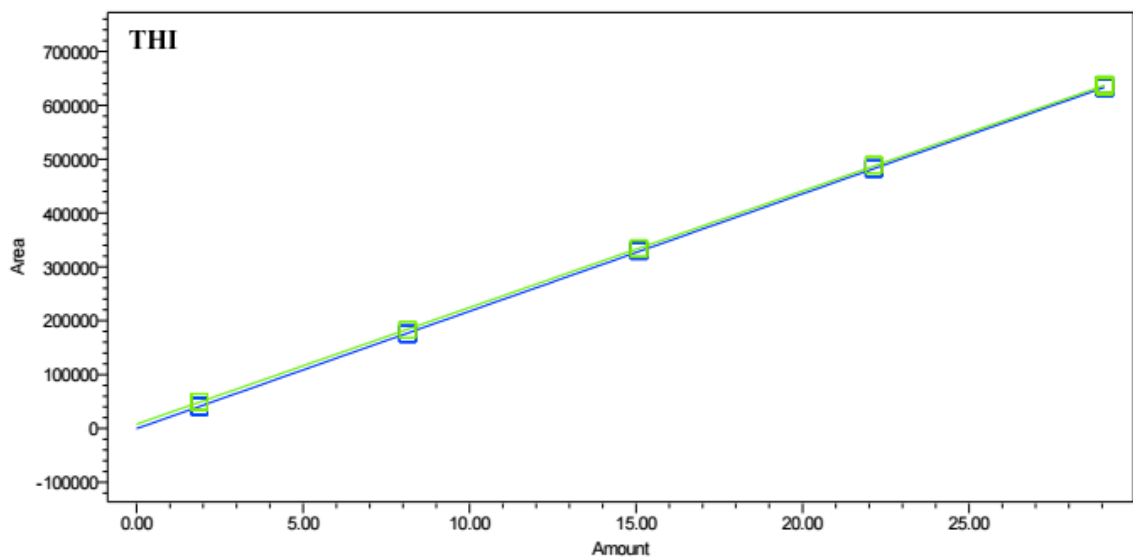
NIC kalibrēšanas taisņu salīdzinājums (ar un bez placebo)



ABA kalibrēšanas taisņu salīdzinājums (ar un bez placebo)



PYR kalibrēšanas taisņu salīdzinājums (ar un bez placebo)



THI kalibrēšanas taisņu salīdzinājums (ar un bez placebo)

6. Pielikums. Precizitātes pārbaude

1. tabula

Preparāta A noteikšanas analīzes precizitātes pārbaudes rezultāti

		C, mg						C <sub>vid</sub> , mg	S <sub>n</sub> , mg	DI, mg	S <sub>r</sub> , %
		1. paraugs	2. paraugs	3. paraugs	4. paraugs	5. paraugs	6. paraugs				
ABA	1.	20,29095	20,72697	20,70442	20,53857	20,47387	20,89087	20,64	0,19	0,20	0,94
	2.	20,37918	20,78294	20,77707	20,50141	20,54565	20,86184				
	3.	20,43324	20,79501	20,80546	20,50289	20,57958	20,86137				
	vidējais	20,368	20,768	20,762	20,514	20,533	20,871				
	S <sub>r</sub> , %	0,35	0,17	0,25	0,10	0,26	0,08				
CaD	1.	63,33551	66,10088	66,01615	64,21413	65,52101	65,24574	65,2	1,1	1,1	1,63
	2.	64,02122	66,20167	66,34457	64,09942	65,45774	65,31338				
	3.	63,66996	66,27657	66,24087	64,06952	65,82099	65,29627				
	vidējais	63,676	66,193	66,201	64,128	65,600	65,285				
	S <sub>r</sub> , %	0,54	0,13	0,25	0,12	0,30	0,05				
CYS	1.	22,46590	21,99803	21,73190	21,67454	21,65446	22,55021	22,0	0,4	0,4	1,76
	2.	22,43896	21,90527	21,71125	21,66921	21,68277	22,66669				
	3.	22,28062	21,93160	21,44008	21,68250	21,99908	22,40909				
	vidējais	22,395	21,945	21,628	21,675	21,779	22,542				
	S <sub>r</sub> , %	0,45	0,22	0,75	0,03	0,88	0,57				
THI	1.	61,50648	61,46125	61,09413	61,41863	61,17268	61,37229	61,42	0,19	0,20	0,32
	2.	61,76428	61,56744	61,36876	61,18472	61,14538	61,40809				
	3.	61,96865	61,59256	61,30182	61,23388	61,52330	61,39360				
	vidējais	61,746	61,540	61,255	61,279	61,280	61,391				
	S <sub>r</sub> , %	0,38	0,11	0,23	0,20	0,34	0,03				

Preparāta B noteikšanas analīzes precizitātes pārbaudes rezultāti

		C, mg						C <sub>vid</sub> , mg	S <sub>n</sub> , mg	DI, mg	S <sub>r</sub> , %
		1. paraugs	2. paraugs	3. paraugs	4. paraugs	5. paraugs	6. paraugs				
ASC		79,17627	79,61405	77,46856	79,15272	79,90166	79,22814	79,2	1,0	1,1	1,31
		79,17486	80,24917	77,34402	79,08873	80,23001	79,21556				
		78,61015	80,30388	77,04982	78,96869	80,31963	79,64064				
	vidējais	<b>78,987</b>	<b>80,056</b>	<b>77,287</b>	<b>79,070</b>	<b>80,150</b>	<b>79,361</b>				
	S <sub>r</sub> , %	0,41	0,48	0,28	0,12	0,27	0,30				
CaD		3,92345	3,90716	4,05322	4,03086	3,98308	3,98778	3,98	0,05	0,06	1,34
		3,91226	3,95251	4,02744	4,01474	4,00731	3,99350				
		3,87360	3,93646	4,02259	4,04438	4,00770	3,98986				
	vidējais	<b>3,903</b>	<b>3,932</b>	<b>4,034</b>	<b>4,030</b>	<b>3,999</b>	<b>3,990</b>				
	S <sub>r</sub> , %	0,67	0,58	0,41	0,37	0,35	0,07				
CYS		31,41574	33,27955	31,78057	32,43995	32,25393	32,34239	32,1	0,8	0,8	2,34
		30,63498	32,45042	31,66536	32,46834	32,37048	32,28755				
		30,40634	32,4474	31,53753	33,42122	32,43581	32,53859				
	vidējais	<b>30,819</b>	<b>32,726</b>	<b>31,661</b>	<b>32,777</b>	<b>32,353</b>	<b>32,390</b>				
	S <sub>r</sub> , %	1,72	1,47	0,38	1,70	0,28	0,41				
NIC		10,99231	11,01750	10,81893	10,99484	11,11362	10,94497	10,99	0,12	0,13	1,08
		10,9779	11,11181	10,79365	11,02583	11,13733	10,94476				
		10,92364	11,12844	10,76863	11,01409	11,15861	11,00133				
	vidējais	<b>10,965</b>	<b>11,086</b>	<b>10,794</b>	<b>11,012</b>	<b>11,137</b>	<b>10,964</b>				
	S <sub>r</sub> , %	0,33	0,54	0,23	0,14	0,20	0,30				

2. tabula  
(turpinājums)

		C, mg						C <sub>vid</sub> , mg	S <sub>n</sub> , mg	DI, mg	S <sub>r</sub> , %
		1. paraugs	2. paraugs	3. paraugs	4. paraugs	5. paraugs	6. paraugs				
<b>PYR</b>		1,32884	1,34026	1,30870	1,33430	1,34970	1,31786	<b>1,332</b>	<b>0,017</b>	<b>0,018</b>	<b>1,31</b>
		1,32994	1,35210	1,30676	1,33779	1,35246	1,31762				
		1,32015	1,35378	1,30318	1,33623	1,35520	1,32842				
	<b>vidējais</b>	<b>1,326</b>	<b>1,349</b>	<b>1,306</b>	<b>1,336</b>	<b>1,352</b>	<b>1,321</b>				
	S <sub>r</sub> , %	0,40	0,55	0,21	0,13	0,20	0,47				
<b>RIB</b>		1,62742	1,65160	1,66766	1,68524	1,60038	1,64957	<b>1,65</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>1,63</b>
		1,61360	1,62892	1,64780	1,67220	1,60693	1,65026				
		1,64186	1,65558	1,65324	1,69963	1,61133	1,64769				
	<b>vidējais</b>	<b>1,628</b>	<b>1,645</b>	<b>1,656</b>	<b>1,686</b>	<b>1,606</b>	<b>1,649</b>				
	S <sub>r</sub> , %	0,87	0,87	0,62	0,81	0,34	0,08				
<b>THI</b>		1,25674	1,25614	1,24949	1,24938	1,24197	1,24061	<b>1,250</b>	<b>0,007</b>	<b>0,007</b>	<b>0,55</b>
		1,25313	1,26411	1,24471	1,24705	1,24957	1,23483				
		1,24109	1,26861	1,25123	1,2504	1,25192	1,25183				
	<b>vidējais</b>	<b>1,250</b>	<b>1,263</b>	<b>1,248</b>	<b>1,249</b>	<b>1,248</b>	<b>1,242</b>				
	S <sub>r</sub> , %	0,66	0,50	0,27	0,14	0,42	0,70				

## 7. Pielikums. Pareizības pārbaude

1. tabula

### Preparāta A noteikšanas analīzes pareizības pārbaudes rezultāti

CYS								
Koncentrācijas līmenis	Nr.p.k.	C <sub>apr</sub> , mg	A, %	A', %	A <sub>vid</sub> , %	S <sub>n</sub> , %	DI, %	S <sub>r</sub> , %
80 %	1.1.	6,35639	99,92	<b>98,62</b>	<b>98,1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>
	1.2.	6,27058	98,57					
	1.3.	6,19353	97,36					
	2.1.	6,24070	98,10	<b>97,89</b>				
	2.2.	6,27294	98,61					
	2.3.	6,16886	96,97					
	3.1.	6,34365	98,03	<b>98,59</b>				
	3.2.	6,39285	98,79					
	3.3.	6,40222	98,94					
100 %	1.1.	8,36440	99,35	<b>98,72</b>				
	1.2.	8,24698	97,95					
	1.3.	8,32267	98,85					
	2.1.	8,49646	98,36	<b>98,42</b>				
	2.2.	8,44898	97,81					
	2.3.	8,55892	99,09					
	3.1.	8,09345	97,28	<b>97,42</b>				
	3.2.	8,14079	97,85					
	3.3.	8,07992	97,12					
120 %	1.1.	9,30858	97,96	<b>98,00</b>				
	1.2.	9,27644	97,62					
	1.3.	9,35316	98,43					
	2.1.	9,29025	97,56	<b>97,41</b>				
	2.2.	9,22936	96,92					
	2.3.	9,30846	97,75					
	3.1.	9,46283	99,17	<b>98,21</b>				
	3.2.	9,35003	97,98					
	3.3.	9,30244	97,49					

1. tabula  
(turpinājums)

CaD								
Koncentrācijas līmenis	Nr.p.k.	C <sub>apr</sub> , mg	A, %	A', %	A <sub>vid</sub> , %	S <sub>n</sub> , %	DI, %	S <sub>r</sub> , %
80 %	1.1.	19,15230	101,20	<b>101,23</b>	<b>102,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>
	1.2.	19,13042	101,09					
	1.3.	19,18957	101,40					
	2.1.	19,27312	102,42	<b>102,46</b>				
	2.2.	19,22592	102,17					
	2.3.	19,34254	102,79					
	3.1.	19,29887	102,03	<b>101,99</b>				
	3.2.	19,29170	101,99					
	3.3.	19,28325	101,95					
100 %	1.1.	24,26668	102,01	<b>102,41</b>				
	1.2.	24,32422	102,25					
	1.3.	24,50040	102,99					
	2.1.	24,12197	101,90	<b>101,93</b>				
	2.2.	24,13563	101,95					
	2.3.	24,13429	101,95					
	3.1.	24,41627	103,14	<b>102,52</b>				
	3.2.	24,23514	102,37					
	3.3.	24,15893	102,05					
120 %	1.1.	28,74834	102,41	<b>102,20</b>				
	1.2.	28,65244	102,07					
	1.3.	28,66619	102,12					
	2.1.	28,06836	102,07	<b>102,01</b>				
	2.2.	28,05094	102,01					
	2.3.	28,03874	101,96					
	3.1.	27,98591	102,28	<b>102,10</b>				
	3.2.	27,89373	101,94					
	3.3.	27,93113	102,08					

1. tabula  
(turpinājums)

ABA								
Koncentrācijas līmenis	Nr.p.k.	C <sub>apr</sub> , mg	A, %	A', %	A <sub>vid</sub> , %	S <sub>n</sub> , %	DI, %	S <sub>r</sub> , %
80 %	1.1.	6,97144	102,08	<b>102,33</b>	<b>101,2</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>
	1.2.	6,99907	102,48					
	1.3.	6,99595	102,44					
	2.1.	6,80567	99,65	<b>99,69</b>				
	2.2.	6,82561	99,94					
	2.3.	6,79435	99,49					
	3.1.	6,57510	101,15	<b>101,05</b>				
	3.2.	6,57526	101,15					
	3.3.	6,55540	100,85					
100 %	1.1.	8,40312	100,46	<b>100,71</b>				
	1.2.	8,41865	100,64					
	1.3.	8,45018	101,02					
	2.1.	8,42661	102,20	<b>102,55</b>				
	2.2.	8,47319	102,77					
	2.3.	8,46564	102,67					
	3.1.	8,81524	102,45	<b>102,11</b>				
	3.2.	8,76713	101,89					
	3.3.	8,77408	101,98					
120 %	1.1.	9,52572	100,89	<b>100,76</b>				
	1.2.	9,51700	100,80					
	1.3.	9,49846	100,60					
	2.1.	9,51719	100,27	<b>99,99</b>				
	2.2.	9,46707	99,74					
	2.3.	9,48707	99,95					
	3.1.	9,64134	101,58	<b>101,88</b>				
	3.2.	9,68321	102,02					
	3.3.	9,68651	102,06					

1. tabula  
(turpinājums)

THI								
Koncentrācijas līmenis	Nr.p.k.	C <sub>apr</sub> , mg	A, %	A', %	A <sub>vid</sub> , %	S <sub>n</sub> , %	DI, %	S <sub>r</sub> , %
80 %	1.1.	19,67394	98,81	<b>99,04</b>	<b>99,1</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b>
	1.2.	19,74199	99,16					
	1.3.	19,73969	99,14					
	2.1.	19,33986	99,12	<b>98,98</b>				
	2.2.	19,35541	99,20					
	2.3.	19,24486	98,63					
	3.1.	19,23338	98,93	<b>98,83</b>				
	3.2.	19,23542	98,94					
	3.3.	19,17548	98,63					
100 %	1.1.	23,43376	98,20	<b>98,50</b>				
	1.2.	23,51639	98,54					
	1.3.	23,57087	98,77					
	2.1.	24,04657	99,56	<b>99,78</b>				
	2.2.	24,12407	99,88					
	2.3.	24,13035	99,91					
	3.1.	24,09657	99,68	<b>99,30</b>				
	3.2.	23,93855	99,03					
	3.3.	23,97649	99,19					
120 %	1.1.	28,30494	99,23	<b>99,23</b>				
	1.2.	28,32101	99,28					
	1.3.	28,29016	99,18					
	2.1.	28,18089	99,84	<b>99,86</b>				
	2.2.	28,14898	99,72					
	2.3.	28,23217	100,02					
	3.1.	27,75660	98,40	<b>98,69</b>				
	3.2.	27,87483	98,82					
	3.3.	27,87787	98,83					

## Preparāta B noteikšanas analīzes pareizības pārbaudes rezultāti

ASC								
Koncentrācijas līmenis	Nr.p.k.	C <sub>apr</sub> , mg	A, %	A', %	A <sub>vid</sub> , %	S <sub>n</sub> , %	DI, %	S <sub>r</sub> , %
80 %	1.1.	116,97578	96,91	<b>96,65</b>	<b>97,7</b>	<b>1,1</b>	<b>0,9</b>	<b>1,2</b>
	1.2.	116,97578	96,55					
	1.3.	116,97578	96,49					
	2.1.	116,97578	97,14	<b>96,81</b>				
	2.2.	116,97578	96,87					
	2.3.	116,97578	96,42					
	3.1.	116,97578	95,87	<b>96,16</b>				
	3.2.	116,97578	96,29					
	3.3.	116,97578	96,32					
100 %	1.1.	116,97578	98,40	<b>97,99</b>				
	1.2.	116,97578	97,71					
	1.3.	116,97578	97,86					
	2.1.	116,97578	97,85	<b>97,57</b>				
	2.2.	116,97578	97,74					
	2.3.	116,97578	97,13					
	3.1.	116,97578	97,13	<b>97,43</b>				
	3.2.	116,97578	97,59					
	3.3.	116,97578	97,58					
120 %	1.1.	116,97578	99,05	<b>98,81</b>				
	1.2.	116,97578	98,89					
	1.3.	116,97578	98,49					
	2.1.	116,97578	100,01	<b>99,87</b>				
	2.2.	116,97578	100,08					
	2.3.	116,97578	99,52					
	3.1.	116,97578	97,74	<b>97,69</b>				
	3.2.	116,97578	97,57					
	3.3.	116,97578	97,78					

2. tabula  
(turpinājums)

CYS								
Koncentrācijas līmenis	Nr.p.k.	C <sub>apr</sub> , mg	A, %	A', %	A <sub>vid</sub> , %	S <sub>n</sub> , %	DI, %	S <sub>r</sub> , %
80 %	1.1.	47,85526	99,20	<b>99,11</b>	<b>99,9</b>	<b>0,7</b>	<b>0,6</b>	<b>0,7</b>
	1.2.	47,96504	99,43					
	1.3.	47,61250	98,70					
	2.1.	49,33239	102,27	<b>100,01</b>				
	2.2.	47,29526	98,04					
	2.3.	48,09836	99,71					
	3.1.	47,23200	98,60	<b>98,98</b>				
	3.2.	47,32594	98,80					
	3.3.	47,67921	99,54					
100 %	1.1.	59,41209	99,70	<b>99,41</b>				
	1.2.	59,06757	99,12					
	1.3.	59,23208	99,40					
	2.1.	60,24877	100,80	<b>101,17</b>				
	2.2.	60,37948	101,02					
	2.3.	60,78254	101,70					
	3.1.	59,73799	100,72	<b>100,88</b>				
	3.2.	59,89669	100,99					
	3.3.	59,86828	100,94					
120 %	1.1.	71,24356	99,89	<b>99,87</b>				
	1.2.	71,14534	99,76					
	1.3.	71,29664	99,97					
	2.1.	70,94325	99,58	<b>99,63</b>				
	2.2.	71,07644	99,77					
	2.3.	70,90452	99,53					
	3.1.	70,87453	99,77	<b>99,64</b>				
	3.2.	70,84334	99,72					
	3.3.	70,63452	99,43					

2. tabula  
(turpinājums)

CaD								
Koncentrācijas līmenis	Nr.p.k.	C <sub>apr</sub> , mg	A, %	A', %	A <sub>vid</sub> , %	S <sub>n</sub> , %	DI, %	S <sub>r</sub> , %
80 %	1.1.	4,86241	100,55	<b>101,02</b>	<b>100,7</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,3</b>
	1.2.	4,88753	101,07					
	1.3.	4,90447	101,42					
	2.1.	4,87742	102,93	<b>102,90</b>				
	2.2.	4,89971	103,40					
	2.3.	4,85101	102,37					
	3.1.	4,70053	100,85	<b>100,48</b>				
	3.2.	4,66233	100,03					
	3.3.	4,68705	100,56					
100 %	1.1.	6,36924	101,54	<b>101,57</b>				
	1.2.	6,35632	101,33					
	1.3.	6,38716	101,83					
	2.1.	5,98208	100,83	<b>100,99</b>				
	2.2.	6,04959	101,97					
	2.3.	5,94256	100,16					
	3.1.	6,2256	100,65	<b>100,55</b>				
	3.2.	6,22952	100,72					
	3.3.	6,20211	100,27					
120 %	1.1.	7,1224	101,59	<b>101,65</b>				
	1.2.	7,1214	101,58					
	1.3.	7,13424	101,76					
	2.1.	6,94952	98,31	<b>98,27</b>				
	2.2.	6,94834	98,29					
	2.3.	6,94096	98,19					
	3.1.	6,94279	99,86	<b>99,37</b>				
	3.2.	6,88559	99,04					
	3.3.	6,89724	99,21					

2. tabula  
(turpinājums)

NIC								
Koncentrācijas līmenis	Nr.p.k.	C <sub>apr</sub> , mg	A, %	A', %	A <sub>vid</sub> , %	S <sub>n</sub> , %	DI, %	S <sub>r</sub> , %
80 %	1.1.	16,21336	100,47	<b>100,66</b>	<b>101,7</b>	<b>0,9</b>	<b>0,7</b>	<b>0,8</b>
	1.2.	16,21596	100,49					
	1.3.	16,30445	101,03					
	2.1.	16,34602	100,54	<b>100,25</b>				
	2.2.	16,31052	100,33					
	2.3.	16,23562	99,87					
	3.1.	16,82635	101,02	<b>101,40</b>				
	3.2.	16,91669	101,56					
	3.3.	16,92821	101,63					
100 %	1.1.	20,72361	102,80	<b>102,44</b>				
	1.2.	20,60015	102,19					
	1.3.	20,62979	102,33					
	2.1.	21,20893	101,93	<b>101,69</b>				
	2.2.	21,19866	101,88					
	2.3.	21,07021	101,26					
	3.1.	20,32181	101,36	<b>101,74</b>				
	3.2.	20,42544	101,87					
	3.3.	20,44626	101,98					
120 %	1.1.	24,53078	102,42	<b>102,14</b>				
	1.2.	24,48611	102,23					
	1.3.	24,37854	101,78					
	2.1.	24,51087	102,76	<b>102,68</b>				
	2.2.	24,53790	102,87					
	2.3.	24,42487	102,40					
	3.1.	24,21910	102,61	<b>102,69</b>				
	3.2.	6,88559	99,04					
	3.3.	6,89724	99,21					

2. tabula  
(turpinājums)

PYR								
Koncentrācijas līmenis	Nr.p.k.	C <sub>apr</sub> , mg	A, %	A', %	A <sub>vid</sub> , %	S <sub>n</sub> , %	DI, %	S <sub>r</sub> , %
80 %	1.1.	1,94730	99,54	<b>99,25</b>	<b>99,9</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>
	1.2.	1,93957	99,15					
	1.3.	1,93775	99,06					
	2.1.	1,97344	100,37	<b>100,01</b>				
	2.2.	1,96663	100,02					
	2.3.	1,95877	99,63					
	3.1.	1,91063	99,69	<b>100,07</b>				
	3.2.	1,92053	100,21					
	3.3.	1,92247	100,31					
100 %	1.1.	2,61629	102,12	<b>101,76</b>	<b>99,9</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>
	1.2.	2,60042	101,50					
	1.3.	2,60436	101,66					
	2.1.	2,40851	98,60	<b>98,36</b>				
	2.2.	2,40698	98,53					
	2.3.	2,39235	97,94					
	3.1.	2,40116	98,70	<b>99,07</b>				
	3.2.	2,41351	99,21					
	3.3.	2,41593	99,30					
120 %	1.1.	2,75817	99,91	<b>99,751</b>	<b>99,9</b>	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>
	1.2.	2,75798	99,91					
	1.3.	2,74483	99,43					
	2.1.	2,67686	100,21	<b>100,07</b>				
	2.2.	2,67823	100,26					
	2.3.	2,66441	99,75					
	3.1.	2,83595	100,92	<b>100,95</b>				
	3.2.	2,83395	100,85					
	3.3.	2,84049	101,08					

2. tabula  
(turpinājums)

THI								
Koncentrācijas līmenis	Nr.p.k.	C <sub>apr</sub> , mg	A, %	A', %	A <sub>vid</sub> , %	S <sub>n</sub> , %	DI, %	S <sub>r</sub> , %
80 %	1.1.	1,93731	97,25	<b>96,65</b>	<b>98,3</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,3</b>
	1.2.	1,92010	96,39					
	1.3.	1,91833	96,30					
	2.1.	2,04919	100,36	<b>100,04</b>				
	2.2.	2,04043	99,93					
	2.3.	2,03824	99,83					
	3.1.	1,90850	99,80	<b>98,38</b>				
	3.2.	1,91634	100,21					
	3.3.	1,81906	95,12					
100 %	1.1.	2,35565	99,79	<b>98,93</b>	<b>98,3</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,3</b>
	1.2.	2,32576	98,53					
	1.3.	2,32406	98,46					
	2.1.	2,42168	98,04	<b>98,23</b>				
	2.2.	2,43039	98,39					
	2.3.	2,42681	98,25					
	3.1.	2,40338	98,49	<b>98,96</b>				
	3.2.	2,42082	99,21					
	3.3.	2,42004	99,17					
120 %	1.1.	2,89923	100,37	<b>100,01</b>	<b>98,3</b>	<b>1,3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,3</b>
	1.2.	2,88359	99,83					
	1.3.	2,88336	99,83					
	2.1.	2,70883	96,79	<b>97,19</b>				
	2.2.	2,72026	97,20					
	2.3.	2,73157	97,60					
	3.1.	2,69418	96,61	<b>96,66</b>				
	3.2.	2,68523	96,29					
	3.3.	2,70734	97,08					

2. tabula  
(turpinājums)

RIB								
Koncentrācijas līmenis	Nr.p.k.	C <sub>apr</sub> , mg	A, %	A', %	A <sub>vid</sub> , %	S <sub>n</sub> , %	DI, %	S <sub>r</sub> , %
80 %	1.1.	2,90828	99,72	<b>99,50</b>	<b>99,9</b>	<b>1,7</b>	<b>1,3</b>	<b>1,7</b>
	1.2.	2,89781	99,36					
	1.3.	2,89960	99,42					
	2.1.	2,66328	97,56	<b>97,24</b>				
	2.2.	2,65570	97,28					
	2.3.	2,64516	96,89					
	3.1.	2,56604	100,12	<b>100,53</b>				
	3.2.	2,58199	100,74					
	3.3.	2,58140	100,72					
100 %	1.1.	3,44074	100,40	<b>100,08</b>				
	1.2.	3,42262	99,87					
	1.3.	3,42675	99,99					
	2.1.	3,47337	102,23	<b>102,00</b>				
	2.2.	3,47227	102,19					
	2.3.	3,45092	101,57					
	3.1.	3,13733	97,11	<b>97,42</b>				
	3.2.	3,15460	97,64					
	3.3.	3,14990	97,50					
120 %	1.1.	3,80774	100,98	<b>101,54</b>				
	1.2.	3,89304	103,24					
	1.3.	3,78631	100,41					
	2.1.	3,83094	101,59	<b>101,41</b>				
	2.2.	3,83079	101,59					
	2.3.	3,81005	101,04					
	3.1.	3,68582	99,30	<b>99,48</b>				
	3.2.	3,68843	99,37					
	3.3.	3,70331	99,77					

## 8. Pielikums. Robustuma pārbaude

1. tabula.

### Preparāta A robustuma pārbaudes rezultāti

	Nr. p. k.	CYS	CaD	ABA	THI
1. eksperiments	1.	22,60	65,68	20,44	61,96
	2.	22,94	66,19	20,87	61,90
	3.	21,83	66,20	20,81	61,68
	4.	22,48	65,13	20,76	61,87
	5.	22,64	65,60	20,63	61,93
	6.	22,34	65,29	20,77	61,66
	<b>vidējais</b>	<b>22,47</b>	<b>65,68</b>	<b>20,71</b>	<b>61,83</b>
	S <sub>r</sub> , %	1,66	0,68	0,76	0,21
2. eksperiments	1.	22,23	64,26	20,27	61,74
	2.	22,54	66,26	20,87	61,94
	3.	21,98	66,24	20,82	61,65
	4.	21,68	64,13	20,64	61,44
	5.	22,04	64,44	20,67	61,48
	6.	22,67	65,02	20,65	61,37
	<b>vidējais</b>	<b>22,19</b>	<b>65,06</b>	<b>20,65</b>	<b>61,60</b>
	S <sub>r</sub> , %	1,67	1,50	1,02	0,35
Pareizības pārbaudē iegūtie rezultāti	1.	22,40	63,68	20,37	61,75
	2.	21,94	66,19	20,77	61,54
	3.	21,63	66,20	20,76	61,25
	4.	21,68	64,13	20,51	61,28
	5.	22,54	65,60	20,53	61,28
	6.	22,54	65,29	20,87	61,39
	<b>vidējais</b>	<b>22,12</b>	<b>65,18</b>	<b>20,64</b>	<b>61,42</b>
	S <sub>r</sub> , %	1,92	1,63	0,94	0,32
S <sub>r</sub> (n = 18), %	1,79	1,32	0,87	0,40	

**Preparāta B robustuma pārbaudes rezultāti**

	<b>Nr. p. k.</b>	<b>ASC</b>	<b>CYS</b>	<b>CaD</b>	<b>NIC</b>	<b>PYR</b>	<b>THI</b>	<b>RIB</b>
1. eksperiments	1.	79,58	31,53	3,99	11,24	1,35	1,28	1,06
	2.	80,75	32,33	4,03	11,26	1,34	1,27	1,10
	3.	79,99	32,46	4,02	11,27	1,33	1,28	1,05
	4.	80,56	32,33	4,03	11,31	1,35	1,28	1,09
	5.	81,25	32,78	4,04	11,06	1,33	1,27	1,11
	6.	80,36	31,99	4,01	11,12	1,32	1,27	1,05
	<b>vidējais</b>	<b>80,42</b>	<b>32,24</b>	<b>4,02</b>	<b>11,21</b>	<b>1,34</b>	<b>1,28</b>	<b>1,08</b>
	S <sub>r</sub> , %	0,73	1,34	0,43	0,88	0,88	0,38	2,27
2. eksperiments	1.	78,79	31,57	3,89	10,75	1,39	1,29	1,13
	2.	79,55	32,45	3,95	10,99	1,35	1,26	1,12
	3.	79,25	32,06	4,05	11,04	1,37	1,27	1,07
	4.	78,70	31,95	3,96	11,32	1,38	1,28	1,08
	5.	77,98	31,97	4,04	11,10	1,36	1,28	1,10
	6.	80,02	32,09	4,01	10,88	1,39	1,27	1,06
	<b>vidējais</b>	<b>79,05</b>	<b>32,01</b>	<b>3,98</b>	<b>11,01</b>	<b>1,37</b>	<b>1,28</b>	<b>1,09</b>
	S <sub>r</sub> , %	0,91	0,88	1,55	1,76	1,16	0,75	2,46
Pareizības pārbaudē iegūtie rezultāti	1.	78,99	30,82	3,90	10,96	1,33	1,25	1,06
	2.	80,06	32,73	3,93	11,09	1,35	1,26	1,10
	3.	77,29	31,66	4,03	10,79	1,31	1,25	1,05
	4.	79,07	32,78	4,03	11,01	1,34	1,25	1,09
	5.	80,15	32,35	4,00	11,14	1,35	1,25	1,11
	6.	79,36	32,39	3,99	10,96	1,32	1,24	1,05
	<b>vidējais</b>	<b>79,15</b>	<b>32,12</b>	<b>3,98</b>	<b>10,99</b>	<b>1,33</b>	<b>1,25</b>	<b>1,08</b>
	S <sub>r</sub> , %	1,31	2,34	1,34	1,08	1,31	0,55	2,27
S <sub>r</sub> (n = 18), %		1,24	1,57	1,22	1,52	1,73	1,10	2,34